

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
(KIRIKKALE ÜNİV. ORT. PROG.)**

**PİLİÇ BOYUN DERİSİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
PREVALANSININ BELİRLENEREK İZOLATLARIN
KARAKTERİZASYONU VE LİTİK BAKTERİYOFAJLAR
İLE PİLİÇ BUT GIDA MODELİNDE
BİYOKONTROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Gizem ÇUFAOĞLU**

**Danışmanlar
Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU
Prof. Dr. Naim Deniz AYAZ**

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
tarafından 114R104 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Gizem ÇUFAOĞLU

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Piliç Boyun Derisinde *Listeria monocytogenes* Prevalansının Belirlenerek İzolatların Karakterizasyonu ve Litik Bakteriyofajlar ile Piliç But Gıda Modelinde Biyokontrolünün Araştırılması” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Gizem ÇUFAOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Naim Deniz AYZAZ

Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Aylın KASIMOĞLU ve **Prof. Dr. Naim Deniz AYAZ** danışmanlığında Gizem ÇUFAOĞLU tarafından hazırlanan “**Piliç Boyun Derisinde *Listeria monocytogenes* Prevalansının Belirlenerek İzolatların Karakterizasyonu ve Litik Bakteriyofajlar ile Piliç But Gıda Modelinde Biyokontrolünün Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / /

JÜRİ

İmza

Danışman: Prof. Dr. Aylın KASIMOĞLU

(Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknoloji ABD)

Üye : Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN

(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknoloji ABD)

Üye : Prof. Dr. Murat YILDIRIM

(Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD)

Üye : Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM

(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknoloji ABD)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Serhat AL

(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknoloji ABD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana olan desteğini sürekli hissettiğim Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU'na, doktora eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olup bana her konuda yol gösteren Prof. Dr. Naim Deniz AYZ'a, çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN'a, Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, Doç. Dr. Nurhan ERTAŐ ONMAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Serhat AL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Aldığım tüm kararlarda yanımda olan sevgili aileme ve değerli eşim Abdullah ÇUFAOĞLU'na teşekkür ederim.

Gizem ÇUFAOĞLU

Temmuz 2018

**PİLİÇ BOYUN DERİSİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* PREVALANSININ
BELİRLENEREK İZOLATLARIN KARAKTERİZASYONU VE LİTİK
BAKTERİYOFAJLAR İLE PİLİÇ BUT GIDA MODELİNDE
BİYOKONTROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Gizem ÇUFAOĞLU

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Temmuz 2018**

Danışmanlar:

Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU

Prof. Dr. Naim Deniz AYAZ

ÖZET

Bu tez çalışmasında, Şubat 2016 – Ocak 2017 tarihleri arasında iki farklı kanatlı mezbahasından toplanan 120 piliç boyun derisi örneğinden *Listeri monocytogenes*, 60 mezbaha atık suyu örneğinden ise *L. monocytogenes*'e litik bakteriyofaj izolasyonu yapılarak, izolatların karakterizasyonlarının yapılması ve en geniş spektrumda litik etki gösteren fajlardan oluşan bir kokteyl ile piliç butlarında *L. monocytogenes*'in biyokontrolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Analiz edilen piliç boyun derisi örneklerinin 20'sinden (% 16,7) 31 şüpheli *L. monocytogenes* kolonisi izole edilerek, izolatlar PCR ile doğrulanmıştır. Multipleks PCR ile yapılan serotiplendirmede izolatların tamamının 1/2a (3a) olduğu tespit edilmiştir. Real Time RT-PCR analizi ile tüm izolatlarda *L. monocytogenes*'in başlıca virülens genlerinden olan *hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *fbpA* ve *fri* genleri tespit edilmiş ve virülens faktörlerinin yüksek düzeyde eksprese edildiği izolatlar genetik potansiyel açısından yüksek virulent olarak tanımlanmıştır. İzolatların DNA parmak izi analizi ve aralarındaki klonal ilişki ERIC-PCR ile belirlenmiş olup, 7 farklı DNA profiline sahip oldukları saptanmıştır. Çalışmada, toplanan 60 mezbaha atık suyu örneğinden *L. monocytogenes*'e litik etkili 5 listeriyofaj izole edilmiştir. Faj DNA'ları *ClaI* ve *SacI* restriksiyon enzimleriyle muamele edilerek aynı DNA profiline

sahip oldukları belirlenmiştir. Bu analizler göz önüne alınarak M117, M119 ve M135 kodlu fajlar kokteyl oluşturmak amacıyla seçilmiş ve piliç butlarında *L. monocytogenes*'in biyokontrolü amacıyla kullanılmıştır. Faj kokteylinin piliç butlarına uygulanmasıyla 4°C muhafazada inkübasyonun 3. saatinde *L. monocytogenes* sayısında 3,30 log kob/ml'a varan bir redüksiyon sağlanmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, piliç etlerinin *L. monocytogenes* açısından potansiyel bir risk kaynağı olabileceğinin ortaya konmasının yanı sıra, çalışmada elde edilen 3 fajdan oluşan kokteylin kanatlı mezbahalarında son yıkama ya da soğutma aşamasında piliç karkasları veya parça etlerindeki *L. monocytogenes*'lerin dekontaminasyonunda uygulanabilir olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *L. monocytogenes*; piliç boyun derisi; bakteriyofaj; piliç but; biyokontrol.

**A STUDY ON THE PREVELANCE AND CHARACTERIZATION OF
LISTERIA MONOCYTOGENES IN CHICKEN NECK SKIN, AND
BIOCONTROL OF THE ISOLATES BY LYTIC BACTERIOPHAGES ON
CHICKEN LEG FOOD MODEL**

Gizem CUFAOGLU

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Food Hygiene and Technology
PhD Thesis, July 2018**

Supervisors:

Prof. Dr. Aylin KASIMOGLU

Prof. Dr. Naim Deniz AYAZ

ABSTRACT

In this thesis study, it was aimed to isolate *L. monocytogenes* from 120 chicken neck samples and to isolate lytic bacteriophages from 60 slaughterhouse wastewater from two different poultry slaughterhouses between February 2016 and January 2017, to characterize the isolates and to investigate the biocontrol of *L. monocytogenes* in broiler chicken legs with a cocktail consisting of phages that showed the broadest lytic activities.

Thirty-one suspected *L. monocytogenes* colonies were isolated from 20 (16,7 %) chicken neck samples and the isolates were confirmed by PCR. By multiplex PCR, it has been determined that all of the isolates were belonged to serotype 1/2a (3a). Real-time RT-PCR analysis revealed that all the isolates were harbored the major virulence genes of *L. monocytogenes* (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *fbpA* ve *fri*) and the isolates which expressed the virulence factors highly were identified as genetic potentially high virulent. DNA fingerprint analysis of the isolates and their clonal relationships were determined by ERIC-PCR and were found to have 7 different DNA profiles. In the study, 5 listeriophages with lytic effect on *L. monocytogenes* were isolated from 60 slaughterhouse wastewater samples. Phage DNAs were treated with *ClaI* and *SacI* restriction enzymes and were found to have the same DNA profiles. Taking these analyzes into consideration, phages encoded as M117, M119 and M135

were selected for the cocktail and used for biocontrol of *L. monocytogenes* in chicken legs. The application of the phage cocktail on chicken legs achieved a reduction up to 3,30 log cfu/ml in *L. monocytogenes* count at 3 hours of incubation at 4°C.

In conclusion, this study suggests that chicken meat can be a potential risk source for *L. monocytogenes*, and on the other hand the use of the cocktail which consisted 3 phages obtained from this study can be applicable in chicken slaughter process at final wash or at cooling stage for chicken carcasses, as well as in decontamination of chicken meat parts.

Keywords: *L. monocytogenes*; chicken neck skin; bacteriophage; chicken leg; biocontrol.

İÇİNDEKİLER

PİLİÇ BOYUN DERİSİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* PREVALANSININ BELİRLENEREK İZOLATLARIN KARAKTERİZASYONU VE LİTİK BAKTERİYOFAJLAR İLE PİLİÇ BUT GIDA MODELİNDE BİYOKONTROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK	iii
KABUL VE ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR	xiii
TABLolar LİSTESİ	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Tarihçesi ve Taksonomisi	1
2.2. <i>L. monocytogenes</i> 'in Etiyolojisi, Biyokimyasal Özellikleri ve Gıdalarda Gelişimini Etkileyen Faktörler.....	9
2.3. <i>L. monocytogenes</i> 'in Patojenitesini Etkileyen Faktörler	13
2.4. <i>L. monocytogenes</i> 'in Gıda Hijyeni ve Halk Sağlığı Açısından Önemi	19
2.5. Gıdalarda <i>L. monocytogenes</i> 'in Kontrolü.....	26
2.6. Bakteriyofajlar Hakkında Genel Bilgi.....	33
2.7. <i>Listeria monocytogenes</i> Biyokontrolünde Virü lent Bakteriyofaj Kullanımı	46
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	8
3.1. Gereç	8
3.1.1. Ön Çalışma.....	8
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Kültürleri	8
3.1.3. <i>L. monocytogenes</i> 'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasallar.....	53
3.1.4. <i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar.....	59
3.1.5. Bakteriyofajların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri	65
3.1.6. Bakteriyofajların Restriksiyon Enzim Analizinde Kullanılan Kimyasallar.....	66
3.2. <i>L. monocytogenes</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	66
3.2.1. Ön zenginleştirme	67

3.2.2. İmmuno Manyetik Separasyon (IMS) ve Katı Besiyerine Ekim	68
3.2.3. <i>L. monocytogenes</i> İdentifikasyonu.....	68
3.2.4. <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının PCR ile Doğrulanması	71
3.2.5. Multipleks PCR ile <i>L. monocytogenes</i> 'lerin Serotiplerinin Belirlenmesi.....	73
3.2.6. Piliç Orjinli <i>L. monocytogenes</i> Serotiplerinin Başlıca Virülens Genlerinin Varlığının ve Ekspresyon Düzeylerinin Real Time Reverse Transcription PCR (Real Time RT-PCR) ile Belirlenmesi	73
3.2.7. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) Parmak İzi Analizi.....	76
3.3. <i>L. monocytogenes</i>'e Litik Etkili Bakteriyofaj İzolasyonu ve Faj Duyarlılıklarının Tespiti.....	76
3.4. <i>L. monocytogenes</i> Bakteriyofajlarının Plak Karakterizasyonu.....	78
3.5. Restriksiyon Enzimleriyle Faj DNA'larının Karşılaştırılması	78
3.6. Bakteriyofajlardan <i>L. monocytogenes</i>'in Başlıca Virülens Genlerinin Tespiti	78
3.7. Bakteriyofajların Asidik pH Değerlerini Tolere Etme Özelliklerinin Belirlenmesi. 78	
3.8. Bakteriyofajların Çeşitli Sıcaklık Derecelerini Tolere Etme Özelliklerinin Belirlenmesi	79
3.9. Bakteriyofaj Konak Spesifite ve Litik Etki Spektrumunun Belirlenmesi	79
3.10. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111 Suşunda Nalidiksik Asit (NA) Direncinin Geliştirilmesi.....	80
3.11. Faj Kokteyli için Seçilen Bakteriyofajların In-Vitro Litik Etkinliklerinin Tespiti	80
3.12. Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması ve Optimizasyonu	81
3.13. <i>L. monocytogenes</i> Kültürlerinin Hazırlanması.....	82
3.14. Piliç Butlarında <i>L. monocytogenes</i>'in Bakteriyofaj Kokteyli ile Biyokontrolü	82
3.15. Deney Örneklerinde <i>L. monocytogenes</i> Sayısının ve Varlığının Belirlenmesi.....	83
3.16. <i>L. monocytogenes</i> Sayısındaki Redüksiyonun Belirlenmesi ve İstatistiksel Analizler	84
4. BULGULAR.....	53
4.1. Örneklerde <i>L. monocytogenes</i> Varlığı.....	53
4.2. Mevsimsel Farklılık	87
4.3. PCR Sonuçları.....	87
4.3.1. Konvansiyonel PCR Sonuçları	87
4.3.2. Multipleks PCR Sonuçları	88
4.3.3. Real Time RT-PCR Sonuçları	88
4.3.4. ERIC-PCR Sonuçları	91
4.4. Bakteriyofaj İzolasyonu ve Plak Karakterizasyonu	94
4.5. Restriksiyon Enzimleriyle Faj DNA'larını Karşılaştırılması	97
4.6. Bakteriyofajlardan <i>L. monocytogenes</i>'in Başlıca Virülens Genlerinin Tespiti Sonuçları	97
4.7. Bakteriyofajların Asidik pH Değerlerini ve Çeşitli Sıcaklık Derecelerini Tolere Etme Özellikleri	97
4.8. Bakteriyofaj Konak Spesifite ve Litik Etki Spektrumunun Belirlenmesi	99
4.9. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111 Suşunda Nalidiksik Asit (NA) Direncinin Geliştirilmesi.....	99
4.10. Faj Kokteyli için Seçilen Bakteriyofajların In-Vitro Litik Etkinliklerinin Tespiti	99
4.11. Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması.....	100

4.12. Piliç Butlarında <i>L. monocytogenes</i> 'in Bakteriyofaj Kokteyli ile Biyokontrolü	101
4.13. İstatistiksel Analizler	103
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	86
6. KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ	138



KISALTMALAR

Real time RT-PCR	: Real time reverse transcription - polymerase chain reaction
ERIC-PCR	: Enterobacterial repetitive intergenic consensus - polymerase chain reaction
TEM	: Transmission electron microscopy
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention - Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
EFSA	: European Food Safety Authority - Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	: US Food and Drug Administration - ABD Gıda ve İlaç İdaresi
GRAS	: Genel Olarak Güvenli - Generally Recognized as Safe
FAO	: Food and Agriculture Organization – Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
WHO	: World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü
MOI	: Multiplicity of Infection- İnfeksiyon Çokluğu
NA	: Nalidiksik asit
NA-MOX	: Nalidiksik asit içeren Modifiye Oxford Agar
NA-LM	: Nalidiksik aside dirençli hale getirilmiş <i>L. monocytogenes</i>
OD	: Optik dansite
kob	: Koloni oluşturan birim
pob	: Plak oluşturan birim

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Yıllara göre dünya ve seçilmiş ülkelerde tavuk eti üretimi.

Tablo 2.1.1. *L. monocytogenes*'in serotipleri, somatik (O) ve flagellar (H) antijenleri.

Tablo 2.2.1. *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri.

Tablo 2.3.1. *Listeria monocytogenes*'in başlıca virülens genleri.

Tablo 2.3.2. *L. monocytogenes*'in bazı önemli stres proteinleri.

Tablo 2.4.1. 2000-2017 yıllarında *L. monocytogenes*'in neden olduğu gıda kaynaklı vakalar.

Tablo 2.6.1. Bakteriyofajların klasifikasyonu.

Tablo 2.6.2. Faj infeksiyon tipleri.

Tablo 3.1. *Listeria* spp. için biyokimyasal testleri ve tür ayrımı şeması.

Tablo 3.2. *Listeria monocytogenes* izolatlarında real time RT-PCR ile tespit edilen virülens genleri ve bu genlere özgü primer dizilimleri.

Tablo 4.1. Tez çalışması süresince piliç boyun derisi örneklerinden elde edilen *L. monocytogenes*'lerin dağılımı.

Tablo 4.2. Bazı *L. monocytogenes* izolatlarının real time RT-PCR gen ekspresyonu sonuçları.

Tablo 4.3. Piliç boyun derisi örneklerinden elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının dağılımı ve karakterizasyonu.

Tablo 4.4. Mezbaha atık sularından izole edilen *L. monocytogenes*'e litik etkili bakteriyofajlar.

Tablo 4.5. Bakteriyofajların litik etki profilleri.

Tablo 4.6. Listeriyofajların asidik pH değerlerini ve yüksek sıcaklık derecelerini tolere etme sonuçları.

Tablo 4.7. NA-LM19111'in yapılan seri dilüsyonlarına göre 600 nm'de ölçülen OD değerleri.

Tablo 4.8. Belirli saatlerde yapılan NA-LM19111 sayımı ve bakteriyofaj sayımı sonuçları.

Tablo 4.9. Piliç but gıda modelinde kontrol ve deney gruplarında muhafaza sürelerine göre *L. monocytogenes* sayım sonuçları.

Tablo 4.10. Piliç but gıda modelinde *L. monocytogenes* sayısında görülen redüksiyon miktarları.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.6.1. Solda T4 fajı TEM görüntüsü ve sağda T4 fajı şematığı.

Şekil 2.6.2. Bakteriyofaj gruplarının morfolojisi.

Şekil 2.6.3. Tipik bir litik bakteriyofajın yaşam döngüsü.

Şekil 2.6.4. T4 fajının infeksiyon şematığı

Şekil 3.1. *Listeria monocytogenes*'in izolasyon şeması.

Şekil 3.2. Piliç but gıda modelinde *L. monocytogenes*'in bakteriyofaj kokteyli ile biyokontrolü çalışması görüntüleri.

Şekil 4.1. *hlyA* geni tespit edilmiş *L. monocytogenes* izolatlarının elektroforez görünümü.

Şekil 4.2. *L. monocytogenes* izolatlarının 1/2a serotipi için 691 bp'da elde edilen elektroforez görüntüsü.

Şekil 4.3. *L. monocytogenes* izolatlarının ERIC-PCR analizi jel elektroforez görüntüsü.

Şekil 4.4. *L. monocytogenes* izolatlarının ERIC-PCR analizi sonucu dendrogramı.

Şekil 4.5. Faj kokteylinde kullanılan listeriyofajların plak görüntüsü.

Şekil 4.6. Fajların asidik pH ve çeşitli sıcaklık değerlerini tolere etme özelliklerinin araştırıldığı çalışmaya ilişkin plak görüntüsü.

Şekil 4.7. Piliç but gıda modelinde MOI 4,18 ve 6,46 log [pob/kob]/ml kontaminasyon düzeylerinde tespit edilen redüksiyon miktarları.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Listeria monocytogenes Gram pozitif, hücre içi, sporsuz, çubuk formunda, fakültatif anaerob, gıda kaynaklı zoonoz bir bakteri olup, sebep olduğu listeriozis ile özellikle risk grubu bireylerde ölümle sonuçlanabilmektedir (1). Doğada yaygın olarak bulunması ve çevresel koşullara yüksek direnci sebebiyle *L. monocytogenes*'in gıdalarda kontrol altına alınması oldukça güçtür (2). *L. monocytogenes*'in Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yılda yaklaşık 1600 vakaya sebep olduğu ve bu vakalarda 260 kişinin öldüğü bildirilmiştir (3). Bunun yanı sıra, 2014 yılında Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde toplam 2161 listeriozis vakası rapor edilmiştir (4).

L. monocytogenes'in yıllık infeksiyon insidensi diğer önemli gıda kaynaklı patojenlerden olan *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* ve *Shigella* gibi bakterilerle kıyaslandığında düşük seyretmekle birlikte, vakalarda ölüm oranının yüksek olması (~ % 30) bu patojenin önemli gıda kaynaklı patojenler arasında yer almasına neden olmaktadır. Avrupa'da, 2010 yılı boyunca 1601 listeriosis vakası rapor edilmiş ve en fazla etkilenenlerin % 17 mortalite oranı ile 65 yaş üstü (vakaların % 60,2'si) kişilerin olduğu tespit edilmiştir (5). Dokuz Avrupa ülkesinin 2006 yılındaki listeriozis insidensi her 100,000 kişi için 0,52 olarak bildirilmiştir (6).

Listeria monocytogenes'in toplam 13 serotipi bulunmakla birlikte (7), bunlardan insanlarda listeriozise sebep olan başlıcaları 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b'dir (8). ABD'de 2011 yılında 147 kişinin hastalandığı ve 33 kişinin öldüğü bir listeriozis vakasında 1/2a ve 1/2b serotiplerinin infeksiyonlardan sorumlu olduğu tespit edilmiştir (9). Yine ABD'de 1998-2008 yılları arasında 24 listeriozis salgını meydana gelmiş ve toplamda 612 kişinin etkilendiği ve 38 kişinin öldüğü bu salgınlara en fazla 4b serotipinin sebep olduğu bildirilmiştir (10).

Listeria monocytogenes önemli bir gıda patojeni olmasına karşın, farklı virülense ve patojeniteye sahip suşları bulunmaktadır. Çoğu *L. monocytogenes* suşu, virülensine bağlı olarak yüksek düzeyde morbidite ve mortaliteye neden olabilirken bazı suşları virulent karakterde olmayıp memelilerde infeksiyon oluşturmamaktadır (11, 12). Etken patojenitesini sahip olduğu virülens faktörleriyle sağladığından (13), virülens gen dağılımının ve bunların ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi özellikle gıdalarda *L. monocytogenes*'in risk analizi açısından önem taşımaktadır. Real time reverse transcription PCR (real time RT-PCR), floresan prob veya boyalar kullanılarak floresan ışımının DNA ile doğru orantılı arttığı, dolayısıyla gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu metot, nükleik asit amplifikasyon ve saptama aşamalarının tek seferde gerçekleşmesine olanak vermekte ve amplifikasyon ürünlerini tespit etmek için jel elektroforezine olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır (14). Real time RT-PCR'in, gen ekspresyonu için klasik yöntemlerden çok daha hassas, güvenilir ve zahmetsiz olduğu belirtilmektedir (15).

Günümüzde *L. monocytogenes* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda kullanılan pek çok teknik bulunmaktadır. Bunların içerisinde son yıllarda yapılan çalışmalarda, tek bir bakteri türünde net bir DNA parmak izinin oluşturulmasını sağlayan enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) parmak izi metodu kullanılmaya başlanmıştır. Yöntemin pratik, ekonomik ve yüksek güvenilirliğe sahip olması gibi avantajları nedeniyle DNA analizlerinde kullanılabileceği bildirilmiştir (16-18).

Dengeli ve sağlıklı beslenme için bir insanın alması gereken günlük protein ihtiyacının yaklaşık % 50'si hayvansal proteinlerden sağlanmalıdır (19). Kanatlı eti dendiğinde akla ilk gelen tavuk eti, hayvansal protein kaynakları içerisinde ekonomik, lezzetli ve mutfakta hazırlama kolaylığı olması sebebiyle tüketiciler tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Derisiz tavuk etinin kırmızı ete oranla daha fazla doymamış yağ asidi ve daha az kolesterol içermesinin yanı sıra, içerdiği proteinlerin (% 20-22) biyolojik değerliğinin yüksek olması, mineraller ve özellikle B vitaminleri bakımından zengin olması gibi nedenler dolayısı ile tavuk eti sağlıklı beslenmenin vazgeçilmez bir parçası olarak kabul edilmektedir (20).

Türkiye’de kanatlı eti, üretim açısından özellikle son on yıl içerisinde büyük artış göstererek ülkenin kanatlı eti ihtiyacını karşılamanın ötesinde, modern üretim teknikleri ile yüksek standartlarda üretim yaparak hayvansal üretimde en önemli ihracat kalemlerinden biri haline gelmiştir (21). Türkiye’de 2016 yılı verilerine göre kanatlı eti üretimi 2 102 000 ton, kanatlı eti ihracatı ise 336 931 tona ulaşarak her geçen yıl artan bir grafik göstermektedir (22). Yıllara göre dünya ve seçilmiş ülkelerde tavuk eti üretimi Tablo 1.1’de belirtilmiştir (22, 23).

Tablo 1.1. Yıllara göre dünya ve seçilmiş ülkelerde tavuk eti üretimi.

Ülke/Kıta	Üretim Miktarı (milyon ton)							
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Türkiye	1,18	1,41	1,64	1,71	1,79	1,94	1,97	1,95
ABD	16,3	16,9	17,1	17,0	17,3	17,7	18,4	18,7
AB*	9,30	9,60	9,90	10,3	10,4	11,0	11,4	11,9
Avrupa**	13,1	13,7	14,4	15,3	15,8	16,7	17,4	18,0
Afrika***	4,20	4,50	4,60	4,87	5,10	5,20	5,40	5,50
Asya****	27,7	28,9	30,3	32,2	33,9	34,7	35,2	36,6
Dünya	83,0	87,2	90,8	94,0	97,6	100,6	103,8	107,1

*: 28 AB üyesi ülke. **: 39 Avrupa ülkesi. ***: 53 Afrika ülkesi. ****: 50 Asya ülkesi.

Kanatlı hayvanların mikrobiyotasında ve çevresel kaynaklarda bulunan insanlar için patojen mikroorganizmaların, hijyenik önlemlerin alınmamasına bağlı olarak çiftlikten sofraya kadar geçen aşamalarda son ürünü kontamine etmesi, kümes hayvanlarını insanlarda oluşan gıda kaynaklı hastalıkların oluşumunda önemli bir risk faktörü haline getirmektedir (24, 25). Kanatlı etleri ve ürünlerinde *L. monocytogenes*'in varlığının öncelikli olarak kesim ve işleme esnasındaki kontaminasyondan kaynaklandığı ve bazı *L. monocytogenes* suşlarının tavukçuluk işleme tesislerinde kolonize olarak birkaç ay mevcudiyetini sürdürdüğü bildirilmektedir (26, 27).

Kanatlı kesim sürecinde, kafeslerdeki hayvanların hareket halinde bulunan bandın üzerindeki askılara ayak bileklerinden asılması ve tüm kesim sürecini baş aşağı şekilde tamamlaması söz konusudur (28). Bu durum, kanatlı karkası üzerinde bulunabilecek muhtemel patojenlerin boyun derisinde toplanmasına neden olmaktadır. Yapılan

çalışmalar, kanatlı boyun derisinin önemli bir kontaminasyon bölgesi olduğunu göstermektedir (29-33).

ABD’de tüketime hazır gıdalarda 25 gram gıdada “sıfır tolerans” kuralı uygulanmakla birlikte, AB’de *L. monocytogenes* üremesini desteklemeyen tüketime hazır gıdaların 25 gramında 100 kob/gr’dan az olma şartı aranmaktadır (34, 35). Türkiye’de ise ABD’de olduğu gibi gıdanın 25 gramında *L. monocytogenes* için sıfır tolerans limiti belirlenmiştir (36). Bu durum, *L. monocytogenes*’in çiftlikten sofraya her aşamada elimine edilebilmesi için bir takım antimikrobiyel veya biyolojik alternatif yöntemlerin kullanımını ön plana çıkarmaktadır.

Bakteriyofajlar ilk kez 1900’lerin başında bakteri yiyen virüsler olarak tanımlanmışlardır. Doğada oldukça fazla sayıda (10^{30} - 10^{32}) ve çeşitlilikte bulunan bakteriyofajlar; deniz suları, tatlı sular, toprak, hayvan ve insanların gastrointestinal ve genito-üriner kanalları, deri, süt gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir (37). Hücre dışı formu (virion) cansız olan ve büyüklükleri 1 μ m’nin altında olan (bakterilerin geçemediği 0,22 μ m milipor filtrelerden geçebilen) bakteriyofajlar, protein bir kılıf içinde (kapsid) DNA veya RNA barındırmaktadır. Birçoğu, bu genetik materyali bakteri hücrelerine aktarmakta işlev gören kuyruğa sahiptir (38). Antibiyotikler ve antiseptikler gibi antibakteriyel ajanlara kıyasla bakteriyofajları farklı ve fonksiyonel kılan durum, bakterilere karşı olan yüksek seçici toksisitesi sebebiyle canlı dokulara zarar vermeden uygulanabilir olmasıdır (39). Oldukça yüksek konak spesifitesine (bir tür veya aynı genus içinde bir kaç tür) sahip olan bakteriyofajların iki temel tipi ortaya konmuştur. Bunlardan ilki, ılımlı (lizojenik) bakteriyofajlar olarak bilinen, genetik materyallerini bakteriye aktarmalarını takiben profaj halinde kalarak, bakteri çoğaldıkça çoğalan ve lizojenik siklus gösteren tiptir (40). İkinci tip ise, litik (virulent) tip olarak adlandırılan, bakteriye tutunarak genetik materyalini aktaran, bakteri içerisinde çoğalan ve bakteriyi yaklaşık 30 dakika içinde parçalayarak terk edip, yeni bakterileri infekte eden fajlardır (41).

İlk kez d’Herelle tarafından 1919’da ağır dizanteri hastası bir çocukta etkin olarak uygulanan bakteriyofaj terapisi (42), günümüzde gıdalarda patojen bakterilerin biyokontrolünde de kullanılmaktadır. Virulent bakteriyofajlar farklı çevrelerden elde edilmekte ve bu durum *L. monocytogenes*’in gıdalarda kontrol altına alınmasında gün geçtikçe daha da önem arz etmektedir (43).

Listeriyofajların karakterlerinin morfolojik olarak belirlenmesinde Transmission Electron Microscopy (TEM) ve plak karakterizasyonu önemli bir basamaktır. TEM görüntüleri sayesinde bakteriyofajların hangi cinse ve familyaya ait olduklarının tespiti mümkün olmakta, plak karakterizasyonu sayesinde ise iç ve dış faktörlere direncin belirlenmesinde asit-sıcaklık etkisinin fajların plak oluşturması üzerindeki etkisi ortaya konabilmektedir (43). Ayrıca, bakteriyofajların gıdalarda kullanımının insan sağlığı açısından olumsuz bir etki göstermediğini belirten in vivo toksisite (akut toksisite) testleri de yapılmaktadır (44).

Restriksiyon enzimleri, çift zincirli DNA molekülündeki belli nükleotit dizilerini tanıyan ve her iki zinciri birlikte kesen enzimlerdir (45). İlk restriksiyon enzimi olan *HindIII*'ün (46) saflaştırılmasından sonra pek çok başka restriksiyon enzimi keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir (47). Moleküler DNA karakterizasyon ve izolatların genetik yakınlığının belirlenmesi amacıyla fajların DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesilip ardından jel elektroforezi ile ayrıştırılması hızlı ve güvenilir bir yöntem olması sebebiyle tercih edilmektedir (48).

Bu çalışmada;

- Kanatlı kesimhanelerinden Şubat 2016 - Ocak 2017 tarihleri arasında toplanan piliç boyun derisi örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyonu yapılarak izolatların identifikasyonunun yapılması,
- İzolatların PCR ile doğrulanması ve serotiplerinin saptanması,
- Başlıca virülens genlerinin varlığının ve ekspresyon düzeylerinin real time reverse transcription PCR ile belirlenmesi,
- Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) parmak izi analizlerinin yapılarak aralarındaki klonal ilişkinin belirlenmesi,
- Kanatlı kesimhanelerinden mezbahanın atık sularından *L. monocytogenes*'lere litik etki gösteren bakteriyofaj izolasyonunun yapılarak izolatların karakterizasyonlarının, spesifitelerinin ve konak litik etki profillerinin belirlenmesi,
- *L. monocytogenes*'e spesifik ve analiz edilen *L. monocytogenes*'lere en geniş spektrumda litik etki gösteren bakteriyofajlar arasından 2-5 listeriyofajın seçilerek bakteriyofaj kokteylinin hazırlanması ve optimize edilmesi,

- Son olarak ise *L. monocytogenes*'in bakteriyofaj kokteyliyle biyokontrolünün piliç but gıda modelinde araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Listeria monocytogenes*'in Tarihçesi ve Taksonomisi

Listeria monocytogenes, ilk olarak 1924 yılında İngiltere'de laboratuvar tavşanlarının mononükleer lokositoz sebebiyle aniden ölmesi ile keşfedilmiş ve yaptığı hastalığa atfen *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırılmıştır (49). Yıl 1927 olduğunda, Pirie tarafından Güney Afrika'daki ginepig'lerden izole edilen bu bakteri, bakteriyoloji ile yakından ilgilenen doktor Lord Lister'e adanarak *Listerella hepatolytica* adını almıştır (50). Etkene, 1929 yılında *Bacterium monocytogenes hominis* (51), 1934'de *Corynebacterium parvulum* (52), 1937'de *Listerella ovis* (53) gibi çeşitli isimler verilmiştir. Bugünkü ismi olan *Listeria monocytogenes*'i ise, Murray ve Pirie tarafından izole edilen mikroorganizmaların benzer olduklarının Lister Enstitüsü Ulusal Tıp Koleksiyonun'da belirlenmesi üzerine 1940 yılında almıştır (54,55).

Listeria'nın 1970'lere kadar diğer bakterilerle olan ilişkisi net olarak ortaya konmamıştır (55). Bergey's Manual'de 1934'de *Listeria*, *Corynebacteriaceae* ailesi içine dahil edilmiş (56) ve en son 1986'de *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* ve *Caryophanon*'lar ile birlikte "düzgün, sporsuz, Gram pozitif çubuklar" sınıfında yer almıştır (57).

L. monocytogenes uzun süre *Listeria* soyunun tek türü kabul edildikten sonra 1961'de bu soya *L. denitrificans* (58), 1966'da *L. grayi* (59), 1971'de *L. murrayi* (60), 1981'de *L. innocua* (61), 1983'de *L. welshimeri* ve *L. seeligeri* (62), 1984'de *L. ivanovii* (63) dahil olmuştur. Daha sonraları *L. denitrificans*, *Jonesia* soyuna dahil edilmiş (64), *L. murrayi* ise *L. grayi*'nin bir alt türü olarak sınıflandırmada yerini almıştır (65).

Son zamanlarda geliştirilen moleküler analizlerin etkin bir şekilde kullanılmasıyla *Listeria* soyunun bilinen 6 türüne ek olarak 12 yeni tür daha bildirilmiştir. Çeşitli gıdalardan ve çevresel kaynaklardan izole edilen bu türler; *L. marthii* (66), *L. rocourtiae* (67), *L. weihenstephanensis* (68), *L. fleischmannii* (69), *L. cornellensis*, *L.*

riparia, *L. grandensis*, *L. aquatica*, *L. floridensis* (70), *L. newyorkensis*, *L. booriae* (71) ve *L. thailandensis* (72)'dir.

Listeria türleri içerisinde *L. monocytogenes*, insanlar ve hayvanlar için tek patojen tür olup, *L. ivanovii* hayvanlar için patojendir (55). Bununla birlikte, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri* ve *L. grayi*'nin nadiren de olsa insanlarda listeriozise neden olduğu bildirilmiştir (73). Yapılan çalışmalar sonucunda son keşfedilen *L. thailandensis* dışında diğer 11 yeni *Listeria* türünün de insanlar için patojen olmadığı bildirilmiştir (74). En son keşfedilen tür olması sebebiyle *L. thailandensis*'in patojenitesi hakkında yayımlanmış bir çalışma henüz mevcut değildir.

Listeria monocytogenes'in bilinen 13 serotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7) vardır (7) ve bunlar Somatik (O) ve Flagellar (H faktör) antijenlerine göre belirlenmektedir (75). Pek çok listeriozis vakasının sporadik olduğu 1980'lere kadar düşünülmesine rağmen, son 25-30 yılda epidemik vakalara sıklıkla rastlanılmıştır (55). İnsanlarda şekillenen listeriozis vakalarının % 95'inden 1/2a, 1/2b ve 4b serotipleri sorumlu bulunmuştur (55). ABD'de 2014 yılı boyunca 675 listeriozis vakası rapor edilmiş ve bunlardan en yaygın serotipler 4b (% 57), 1/2a (% 26) ve 1/2b (% 13) olarak bildirilmiştir (76).

Listeria monocytogenes, üç büyük filogenetik soy olarak sınıflandırılmaktadır. Soy I; 1/2b, 3b, 3c ve 4b serotiplerinden, soy II; 1/2a, 1/2c ve 3a serotiplerinden oluşurken daha küçük bir soy olan soy III; 4a ve 4c serotiplerinden oluşmaktadır. *Listeria monocytogenes* suşları, hastalığa neden olma potansiyeline sahip, yakından ilişkili suşlar olan epidemik klonlar halinde gruplandırılmaktadır (77) ve virülens genlerinin varlığı somatik ve flagellar antijenlerin varlığı ile paralellik göstermektedir (78). Serotip 1/2a gıdalardan en sık izole edilen serotip olmasına karşın, insanlardaki listeriozise sıklıkla sebep olan serotipin ise 4b olduğu bildirilmiştir (79). Bu nedenle, *L. monocytogenes*'de serotip tayini virülens potansiyeli ile ilişkilendirilmektir (78). *L. monocytogenes*'in serotipleri, somatik (O) ve flagellar (H) antijenleri Tablo 2.1.1.'de verilmiştir (80, 81).

Tablo 2.1.1. *Listeria monocytogenes*'in serotipleri, somatik (O) ve flagellar (H) antijenleri.

Serotip	O-Antijen	H-Antijen
1/2a	I, II, (III)	AB
1/2b	I, II, (III)	ABC
1/2c	I, II, (III)	BD
3a	II, (III), IV	AB
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	ABC
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	BD
4a	(III), (V), VII, IX	ABC
4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	ABC
4b	(III), V, VI	ABC
4c	(III), V, VII	ABC
4d	(III), (V), VI, VIII	ABC
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	ABC
7	(III), XII, XIII	ABC

2.2. *L. monocytogenes*'in Etiyolojisi, Biyokimyasal Özellikleri ve Gıdalarda Gelişimini Etkileyen Faktörler

Listeria monocytogenes Gram pozitif, küçük, çubuk formunda, 0,5 µm eninde ve 1-2 µm boyunda bir bakteridir. Psikotrof özellikte olup 0-45°C aralığında üreyebilen etken, 20-25°C'lerde peritrik flagellaları ile kuvvetli hareketli, 37°C'de ise hareketsizdir. Fakültatif anaerob olması ile birlikte aerob, anerob ve mikroaerofilik ortamlarda çoğalabilmekte, geniş pH aralığında (4,3-9,6), yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 10) ve 0,92 a_w değerinde üreyebilmektedir (24, 82).

Listeria türleri katalaz pozitif, oksidaz negatif, Voges-Proskauer ve Metil Red pozitif, indol ve H₂S negatiftirler (82). Oda sıcaklığında hareketli olma özelliğinden ötürü oksijenin yeterli olduğu ortamda, örneğin Sulphate Indol Motility (SIM) mediumda şemsiye tarzında üreme gösterirler. Sellobioz, fruktoz, mannoz, salisin, maltoz, dekstrin, alfa-metil-D-glikosid ve gliserolden asit üretirler fakat gaz meydana getirmezler. Üreyi hidrolize edemez ve indol üretmezler (83).

Diğer *Listeria* türlerinden *L. monocytogenes*'in ayırt edilmesinde karbonhidrat fermantasyon ve CAMP testleri sıklıkla tercih edilmektedir. *Listeria monocytogenes*

ramnozu fermente ederek asit oluştururken, ksiloz ve mannitolü fermente edemez (84). At, koyun, sığır, ginepig, domuz veya insan kanından elde edilen kanlı agarlarda beta hemoliz oluşturur. Christie Atkins Munch Petersen (CAMP) testinde *Staphylococcus aureus* ile pozitif, *Rodococcus equi* ile genellikle negatif sonuç gösterir (83). Bununla birlikte bazı çalışmalarda *R. equi* ile pozitif sonuç veren izolatların da olduğu bildirilmiştir (85, 86). *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 2.2.1.'de verilmiştir (84).

Tablo 2.2.1. *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri.

	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.grayi</i>
CAMP test:						
<i>Rhodococcus equi</i>	-/+	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	+
L-Rhamnoz	+	d	-	-	d	+
D-Xylose	-	-	+	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	d	-	-	ND	ND	-
Eskulin	+	+	+	+	+	+
Hippurat	+	+	+	ND	ND	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
Metil red test	+	+	+	+	+	+
β Hemoliz	+	-	+	+	-	-
D-alanin	-	+	+	+	+	+
Lizin	-	+	+	+	+	+
Nitrat	-	-	-	-	-	e

d: değişken reaksiyon verir (% 16-84 pozitif). e: *Listeria grayi subsp. murrayi* nitratı nitrite indirger. ND: belirlenmedi.

Etken, çevrede yaygın olarak bulunan bir patojen olup ekipman, aletler, çalışanlar, gıda ürünleri veya tedarikçiler yoluyla besin zincirini kontamine edebilmektedir (34).

Dondurucu koşullarda canlı kalabilmesi, geniş bir pH aralığında, düşük a_w değerlerinde ve yüksek tuz konsantrasyonunda üreyebilmesi ile biyofilm oluşturarak olumsuz koşullarda dahi varlığını sürdürmesi etkenin gıdalarda kontrolünü zorlaştırmaktadır. Bunun yanı sıra, *L. monocytogenes*'in en dikkat çekici ve tehlikeli özelliğinin fakültatif intrasellüler olması ve düşük sıcaklıklarda üreyebilmesi olduğunu söylemek mümkündür (87).

Etken, optimum 30-37°C'de üremesine rağmen psikotrofik özellikte olmasından ötürü buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen gıdalarda çoğalabilmektedir (24). *Listeria monocytogenes*'in virüent özelliğinin düşük üreme sıcaklığında daha fazla olduğu belirtilmektedir (82). Etkenin soğuğa adaptasyon özelliğinin *cspA*, *cspB*, *cspC* ve *cspD* genleri (88) ile *ltrA*, *ltrB* ve *ltrC* genleri ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (89).

Listeria monocytogenes sıcaklık stresine bir hayli tolerans göstermektedir (90). Bu durum düşük sıcaklıktaki sanitasyon uygulamaları ve yüzeyin sıcak su ile temizlenmesinin etkenin eliminasyonunda tam olarak başarı sağlayamadığını ortaya koymaktadır (91). Bakterinin, sıcaklığa en dirençli olduğu fazın durağan faz olduğu bildirilmiştir (90). Etkenin stabil fazdaki $D_{60}^{\circ C}$ değeri, logaritmik üreme fazından yaklaşık 4 katı kadar daha yüksek bulunmuştur (92).

Etkenin sıcaklığa karşı gösterdiği direnç suşlar arasında değişkenlik göstermektedir. Golden ve ark. (93) yaptıkları bir çalışmada Brie-1 (Brie peynirinden), LCDC 81-861 (lahanadan), Scott A (sütten) ve DA-3 suşları için $D_{56}^{\circ C}$ değerini sırasıyla 16,0 , 10,4 , 7,4 ve 5,7 dakika olarak rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, 29 *L. monocytogenes* suşu için $D_{57}^{\circ C}$ değeri tripton soy broth (TSB)'da 6,5 ile 26 dakika arasında değişen sürelerde bulunmuştur (94). Ayrıca *L. monocytogenes*'in farklı serotiplerinin farklı sıcaklık, pH, tuz ve a_w değerlerinde farklı üreme profilleri gösterdikleri de belirtilmektedir (90).

Etkenin geliştiği ortam da sıcaklık toleransını etkilemektedir. Bakterinin bulunduğu gıda ya da besi yerindeki maddeler, bakterinin hücresel yapılarını stabilize etmesini veya stres proteinlerinin üretilmesini uyararak etkeni yüksek sıcaklığın etkilerinden korumaktadır (55). Casadei ve ark. (95) yaptıkları bir çalışmada, yağdan zengin gıdalarda (krema ve tereyağı) üreyen *L. monocytogenes* Scott A suşunun TSB'de üreyenlere kıyasla sıcaklığa 4 ila 8 kat daha dirençli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ayrıca gıdalarda çoğaltılanlara kıyasla laboratuvar koşullarındaki besi yerlerinde çoğaltılan *L. monocytogenes*'lerin daha yüksek sıcaklık direnci gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (95-97).

L. monocytogenes $-1,5^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklarda üreyememekte fakat canlılığını sürdürebilmektedir (55). Yapılan çalışmalarda balık, karides, sığır ve hindi kıyması, dondurma ve mısır gibi gıdaların -18°C ila -20°C 'de 3 ay süresince muhafazasında *Listeria* popülasyonunda $< 1,0$ logaritma kadar bir düşüş gözlemlenmiştir (98, 99). Bununla birlikte, etkenin dondurucu sıcaklıklarda hayatta kalabilmesi uygulanan sıcaklık, donma şiddeti ve dondurucu maddenin özelliğine göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin, sütte bulunan kazein, laktoz ve yağın *L. monocytogenes*'in dondurucu sıcaklıklarda varlığını sürdürmesini desteklediği bildirilmiştir (55). Ayrıca % 2-4'lük gliserol ilave edilerek -18°C 'de dondurulan hücrelerin de yüksek oranda canlılığını koruduğu ve en az seviyede zarar gördüğü rapor edilmiştir (100).

Halotolerant özellikte olan *L. monocytogenes* yüksek NaCl konsantrasyonlarını tolere edebilen bir patojendir. Etken, % 10 NaCl içeren ortamda oda sıcaklığında 72 saate kadar üreyebilmektedir (101). % 16'lık bir NaCl konsantrasyonunun etkeni yıkımlamadığı ancak 4°C 'de 33 güne kadar bakteriyostatik etki gösterdiği bildirilmiştir (102). Yapılan bir çalışmada, % 14 NaCl konsantrasyonda 36 günlük inkübasyonda bakteri popülasyonunda, 10°C ve 25°C 'lerde sırasıyla $\sim 2,0$ ve $\geq 6,0$ log'luk bir düşüş gözlemlenmiştir (103).

L. monocytogenes, pek çok bakteri gibi $\geq 0,97$ a_w değerinde optimal olarak üreyebilmektedir. Bununla birlikte, *L. monocytogenes*'in $0,90$ 'nın altındaki a_w değerlerinde de canlı kalabilme yeteneği, etkeni diğer önemli gıda kaynaklı patojenlerin arasında önemli bir yere taşımaktadır. Larson ve ark. (104) yaptıkları bir çalışmada $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ kob/ml *L. monocytogenes* ile kontamine edilen ve buzdolabı sıcaklığında inkübe edilen salamura peynirlerden (a_w : $< 0,90$) 259 gün boyunca etkeni izole edebilmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, bakterinin fermente sucukta (a_w : $0,79-0,86$) 4°C sıcaklıkta 84 güne kadar canlılığını koruduğu rapor edilmiştir (105). Düşük a_w değerinin ve yüksek ozmotik basıncın bakteride sıcaklık direncinin artmasına neden olduğu bildirilmektedir (106).

Patojen, 5,0'ın altındaki pH değerlerinde çoğalabilmekte, 3,0'ın altındaki pH değerlerinde ise canlılığını koruyabilmektedir (107). Asit dirençliliği ile etkenin virülens özelliği arasında bir ilişki bulunmaktadır (108). Aside karşı direncin Sigma B faktörü ile ilişkili olduğu, ayrıca asit dirençliliğinin sıcaklık ile birlikte bakterinin eksponensiyal (logaritmik) üreme fazına etkisi olduğu bildirilmiştir (109). Lunden ve ark. (91) tarafından yapılan bir çalışmada, et işleme tesislerinden izole edilen *L. monocytogenes* suşları pH 2,4'e maruz bırakılmış ve sayılarında 6,0 logu aşan bir düşüş gözlenmiştir. Aynı çalışmada ayrıca, 55°C'lik bir sıcaklığa maruz bırakılan suşlarda 3,0 log'luk bir düşüş şekillendiği de görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, etkenin buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen salamda 28 gün (pH ~ 4,4) (110), yoğurtta 27 gün (pH ~ 4,2) (111) ve çökelekte (pH ~ 5,0) 35 gün (112) canlılığını koruduğu bildirilmiştir.

Rekabetçi mikrobiyotanın varlığı *L. monocytogenes*'in gıdalarda üremesini baskılayabilmektedir. "Jameson Effect (Jameson Etkisi)" olarak adlandırılan bu etki, aynı ortamda bulunan iki veya daha fazla mikroorganizma türünün, ortamda bulunan kaynakları yarışmalı bir şekilde kullanarak çoğalmaya çalışması sonucu bir türün üremesinin durması olarak açıklanmaktadır (113). Bu durum, genellikle bir türün ürettiği spesifik inhibitörlerin diğer türler üzerinde baskılayıcı özellik göstermesinden ileri gelmektedir (114). Jacobsen ve ark. (115)'nin laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc carnosum*'un *L. monocytogenes* üzerine olan rekabetçi etkisini inceledikleri bir çalışmada, *Leu. carnosum*'un *L. monocytogenes* inoküle edilen dilimlenmiş domuz etlerinin 10°C'de 4 hafta muhafaza edilmesi süresince 10 kob/g'dan daha yukarı üremesine izin vermediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, bakteriyosin üretmeyen laktik asit bakterilerinin de anti-listeriyal etkisinin olduğunu bildirilmektedir. Buchanan ve Bagi (116) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Carnobacterium piscicola*'nın, *L. monocytogenes* Scott A suşu üzerine baskılayıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacıların bir başka çalışmasında ise, *Pseudomonas fluorescens*'in 4°C'de ve % 0,5-2,5 NaCl konsantrasyonunda *L. monocytogenes*'in üremesini inhibe ettiği belirtilmiştir (117).

2.3. *L. monocytogenes*'in Patojenitesini Etkileyen Faktörler

Listeria monocytogenes fakültatif hücre içi bir bakteridir. Etken, konak hücre içine girdikten sonra vakuolü lize edip konak sitoplazmasına geçerek burada çoğalır ve herhangi bir hücre dışı faz geçirmeden komşu hücrelere yayılabilir (55). *Listeria*

monocytogenes hem fagositik hem de fagositik olmayan hücreleri infekte edebilmektedir (118).

Listeria monocytogenes önemli bir gıda patojeni olmasına karşın farklı virülense ve patojeniteye sahip suşları bulunmaktadır. Çoğu *L. monocytogenes*, virülensine bağlı olarak yüksek düzeyde morbidite ve mortaliteye neden olabilirken bazı suşları virulent karakterde olmayıp memelilerde infeksiyon oluşturmamaktadır (11, 119).

Etken patojenitesini sahip olduğu virülens faktörleriyle sağlamaktadır (13). *Listeria monocytogenes*'in virülens genlerinin transkripsiyonundan sorumlu gen grubu Prf-A olup, grubun içerisinde *hlyA* (listeriolizin O, LLO), fosfolipaz A (*plcA*), fosfolipaz B (*plcB*) (120), metalloproteaz (*mpl*) (121), *actA* (122), internalin A (*inlA*), internalin B (*inlB*) (123), internalin C (*inlC*) (124), internalin J (*inlJ*) (125) ve virülens invazyon geni (*vip*) (126) yer almaktadır. Tüm *Prf-A* tarafından regüle edilen genler sıcaklık ile ilişkili olup, ancak 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda üretilen kültürlerde sentezlenmektedirler (55, 127). Bütün bu virülens faktörlerinin infeksiyon oluşumunda ve bakterinin yayılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (55). Etkenin başlıca virülens genleri ve genlerin fonksiyonları Tablo 2.3.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 2.3.1. *Listeria monocytogenes*'in başlıca virülens genleri.

Genin Adı	Genin Fonksiyonu	
<i>prfA</i>	Positive regulatory factor A	Virülens genlerinin transkripsiyonu
<i>plcA</i>	Phosphatidylinositol specific phospholipase C	Vakuolden kaçış
<i>plcB</i>	Phosphatidylinositol specific phospholipase C	Hücreden hücreye geçiş
<i>hlyA</i>	Listeriolysin O	Vakuolden kaçış
<i>mpl</i>	Zinc dependet metalloprotease	PLC'nin aktivasyonu
<i>actA</i>	Actin polymerizing protein	Hücreden hücreye geçiş
<i>inlA</i>	Internalin A	Hücreye penetrasyon
<i>inlB</i>	Internalin B	Hücreye penetrasyon
<i>inlC</i>	Internalin C	Hücreye penetrasyon
<i>inlJ</i>	Internalin J	Hücreye penetrasyon
<i>vip</i>	Virulence invasion gene	Hücreye giriş

HlyA geni, *L. monocytogenes*'in patogenezinde büyük rol oynayan listeriolizin O (LLO) adlı toksini sentezlemektedir (128). Listeriolizin O, kan hücrelerinin hemolize edilmesi ve hücre zarlarının bozulmasından sorumlu olmanın yanı sıra infeksiyon esnasında makrofajlar içindeki vakuollerde bulunan *L. monocytogenes*'in kaçışını kolaylaştırmaktadır (129). Por oluşturan sitolizin ailesinin bir üyesi olan bu toksin, vakuol içerisinde pH'yı düşürerek vakuol membranının lize olmasını ve bu sayede etkenin sitoplazmaya geçmesini sağlamaktadır (130). Konak hücre membranına zarar vermeden sadece vakuölü parçalaması, bakteriye konak immun sisteminden korunma imkanı da vermektedir (131). Ayrıca *hlyA* geni, hücre-hücre iletiminde ve endotel hücrelerinin aktivasyonunda da işlev görebilir (132). Listeriolizin O barındırmayan mutantların sitoplazmaya ulaşamadığı ve avirüent oldukları belirtilmiştir (133, 134).

Listeria monocytogenes'in hücreden hücreye geçiş özelliği *actA* geninden ileri gelmektedir. Bu genin ürettiği *actA* proteini, bakterinin hücre sitoplazmasında hareketliliğini ve infekte ettiği hücreden bir diğerine yayılmasını sağlayan aktin kuyruklarının oluşumda rol oynamaktadır (135). Bunun yanı sıra, *actA* proteininin hedef hücreye tutunma ve penetrasyonunda da rolü olduğu bildirilmiştir (136). Bu genden yoksun olan *L. monocytogenes* mutantların hücreler arası geçiş yapamadığı belirtilmiştir (122).

Listeria monocytogenes, fagositik olmayan hücreleri daha basit patojenik bir yol olan yüzey proteinleri ile hedef hücre üzerinde bulunan reseptörlere tutunarak infekte etmektedir. Bu yüzey proteinleri sırasıyla *inlA*, *inlB*, *inlC* ve yakın zamanda tanımlanan *inlJ* genleri tarafından sentezlenen internalin A, B, C ve J'dir (123).

InlA, etkenin konak hücre yüzeyinde bulunan E-Kadherin adlı reseptöre tutunmasını ve hedef hücre tarafından fagositozunu sağlamaktadır (121). Tüm hücre tiplerinin invazyonunun ilk aşamasında yer alan *inlA*, listeriozis patogenezinde oldukça önemlidir ve patojenite markerı olarak kullanılmaktadır (135, 137). Hepatosit ve epitel olmayan hücrelere penetrasyonda rol alan *inlB*'nin (118) temel reseptörü Met'tir (hepatocyte growth factor/scatter factor receptor) (138). *InlB*, *InlA*'ya göre daha geniş bir konak spektrumuna sahiptir (123).

InlC geni, *PrfA* tarafından düzenlenen genler ve bunların protein ürünleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda Engelbrecht ve ark. (124) tarafından bulunmuş ve

bağırsak sonrası infeksiyon aşamalarına katkı sağladığı bildirilmiştir. *InlC*, etkenin konak hücreyi istilasında *inlA* ile birlikte rol oynamaktadır (123, 139). Bu genin bulunmadığı suşların virülensinde önemli ölçüde azalma gözlenmiş ve sadece patojen suşlarda var olduğu rapor edilmiştir (124, 140). *InlC* geninin invaziv *Listeria* türleri arasında yatay gen aktarımı ile aktarıldığını düşünülmektedir (140).

Listeria monocytogenes'in *inlJ* geni, yakın zamanda internalin ailesine dahil olmuş ve bakterinin önemli virülens genleri arasında yerini almıştır (125). Diğer adı *lmo2821* olan *inlJ* geni, soy III grubuna ait *L. monocytogenes* serotiplerinde (4a ve 4c) bulunmamaktadır (141). Sabet ve ark. (125) bakterinin bağırsak bariyerini geçmesinde ve sonrasındaki aşamalarda önemli rol oynadığını ve *inlJ* geni barındırmayan *L. monocytogenes* mutantlarının oldukça düşük virülens özellik göstererek bağırsaklara ulaşamadığını rapor etmişlerdir. Internalinlere ek olarak p104 yüzey proteini de *L. monocytogenes*'in bağırsak hücrelerine tutunmasında rol oynamaktadır (55).

Listeria monocytogenes iki tip fosfolipaz C enzimi (PLC) sentezlemektedir. Bunlardan biri *plcA* geni tarafından kodlanan fosfatidilinozitol spesifik PLC (PI-PLC)'dir. Bu gen, LLO ile kombinasyon halinde bakterinin vakuolden kaçmasını sağlamaktadır (142, 143), (120). Bir diğeri ise *plcB* tarafından kodlanan fosfatidilkolini parçalayan (PC-PLC) fosfolipaz C'dir. PC-PLC, *mpl* geni tarafından kodlanan metalloproteaz enzimi ile birlikte hücre dışı aktivasyonda bakterinin hücreden hücreye yayılmasında rol oynamaktadır (120, 144). PC-PLC, lizozomları ve membranlarda bulunan tüm fosfolipitleri parçalayabilmektedir (143, 145). Fosfolipaz C'den yoksun mutantların fare deneylerinde 500 kat daha az öldürücü olduğu ortaya konmuştur (120). *HlyA*, *plcA* ve *plcB* genleri patojenik *Listeria* türlerini patojenik olmayan türlerden ayırmak için virülens belirleyici genler olarak sıklıkla kullanılmaktadır (146).

Listeria monocytogenes'in sortaz A ile ilişkili yüzey proteinlerinden biri olan *lmo0320*, Cabanes ve ark. (126) tarafından virülens invazyon geni (*vip*) olarak tekrar tanımlanmış olup, son yıllarda önemli çalışma konularından biri haline gelmiştir. *PrfA* geni tarafından regüle edilen bu gen, bakterinin konak hücrelere girmesinde etkili olan önemli virülens faktörlerden biri olarak bildirilmiştir (147). *Vip*, protein katlanmasında (protein folding) ve bağışıklık sistemi cevabında önemli rol oynayan Hsp protein ailesinin bir üyesi olan ısı şok proteini Gp96 ile etkileşime girmektedir. *Vip*-Gp96

etkileşiminin bakterinin memeli hücrelerine girişte etkili olduğu *in vivo* denemeler ile ortaya konulmuştur (126, 148, 149).

Fibronektin bağlanma proteinini kodlayan *fbpA* geninin *L. monocytogenes* virülensinde önemli olduğu ve hem gastrointestinal sistemde bağırsak hücrelerine (epitelyum hücreleri) hem de infeksiyonun ileri aşamalarında karaciğer hücrelerine (hepatositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar) bağlanmada etkin rol oynadığı bildirilmektedir. Bunun yanında, hücreye adezyon sonrası *fbpA*'nın LLO (*hlyA*) ve *InlB*'nin aktivasyonunda etkili olduğu belirtilmiştir (150, 151).

Listeria monocytogenes infeksiyonlarının erken döneminde bakterinin etkin bir şekilde üreyebilmesi için gerekli genlerden biri olan *fri* geninin ferritin-benzer proteinleri kodladığı, bu proteinlerin özellikle reaktif oksijen varlığında, sıcak-soğuk şok streslerinde ve ortamda yeterli demir iyonu bulunmadığında bakterinin üremesini sağladığı ve virülens üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (152, 153). Bu geni barındırmayan *L. monocytogenes* mutantlarında sıcak stresine duyarlılığın arttığı rapor edilmiştir (154, 155).

VirR, yüzey bileşenlerinin modifikasyonunu sağlayan bir dizi proteini sentezleyen bir genidir. Bu gen sayesinde konak bağışıklık sistemi ve etkenin hücrelerle olan etkileşimleri düzenlenmektedir (156).

SpoG, *L. monocytogenes*'in en sık tercih edilen referans (housekeeping) genidir. Yapılan çalışmalarda *spoG*'nin diğer referans genlere kıyasla daha az değişkenlik gösterdiği ve ekspresyon düzeyinin stabil olduğu ortaya konmuştur (157, 158). Belirtilen bu genin varlığının ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi, potansiyel virülensinin moleküler olarak ortaya konmasını sağlamaktadır.

Virülens genlerinin yanı sıra, *L. monocytogenes*'in sahip olduğu stres proteinleri de etkenin patojenitesinde önemli rol oynamaktadır. *L. monocytogenes* ısı, pH, basınç, tuz, organik asitler gibi çeşitli faktörlerin değişkenlik göstermesi veya yetersiz olması nedeniyle üremesini/gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek herhangi bir stres faktörüne maruz kaldığında sahip olduğu pek çok stres proteini ile bu durumla mücadele etmektedir. Bakterinin sahip olduğu DnaK, GroES ve GroEL ısı şoku proteinleri yüksek sıcaklıklarda, düşük pH değerlerinde ve hücrenin infeksiyon aşamasında hücrenin korunmasında ve canlılığını sürdürmesinde önemli rol oynamaktadır (159-161). Giotis

ve ark. (162), pH'nın yüksek olduğu ortamlarda *L. monocytogenes*'in GroEL ve DnaK proteinlerinin sentezinin arttığını rapor etmişlerdir. Bakterinin sahip olduğu soğuk şok proteinleri (cold shock domain family proteins - csps) bakterinin soğukta çoğalmasında görev almaktadır. CspA, cspB, cspC ve cspD proteinleri ile etken soğuk ortamlara adapte olabilmektedir (88). Bunların yanı sıra, *ltrA*, *ltrB* ve *ltrC* genleri de *L. monocytogenes*'in buzdolabı sıcaklığında (+4°C) üreyebilmesinde etkin rol oynayan genler olarak ortaya konmuştur (89). LisRK ve CesRK proteinleri *L. monocytogenes*'in asit stresinde, β -laktam direncinde ve etanole toleransında rol almaktadır. Ayrıca her iki proteinin etkene zarar veren ajanları algılama ve yanıt oluşturmada rol oynadığı belirtilmektedir (156). *Listeria monocytogenes* sahip olduğu ClpC, ClpE ve ClpP stres proteinleri sayesinde ozmotik strese, yüksek sıcaklığa ve demir noksanlığına dirençli hale gelebilmektedir (163). Ayrıca ClpC'nin makrofaj fagozomlarından etkenin kaçmasına olanak sağladığı bildirilmiştir (164). Ozmotik strese adaptasyonda rol oynayan diğer proteinler ise BetL, GbuABC, AppA, Ctc, DnaK, HtrA, OpuA, OpuB ve OpuC olarak sıralanabilir (165-167). *Listeria monocytogenes* bağırsak ve karaciğerde canlılığını sürdürmesini Bsh (bile salt hidrolaz) enzimi ile başarmaktadır. Etken bu enzim sayesinde safra tuzunun bakterisid etkisinden korunmaktadır. *Bsh* geni sigma B tarafından kontrol edilmektedir. Sigma faktörleri, *L. monocytogenes*'in stres adaptasyonunda rol oynayan çeşitli genleri düzenleyen prokaryotik RNA polimerazın alt birimleridir (168). Bu faktörlerin içinde Sigma B etkenin asit, ozmotik ve oksidatif stres, düşük sıcaklık, karbon eksikliği gibi pek çok olumsuz koşula uyum sağlamasını ve üremesini sağlayarak en büyük rolü oynamaktadır (109, 169). 25°C'de ve 4°C'de üretilen *L. monocytogenes* suşlarında Sigma B faktörü transkripsiyonunun arttığı gözlemlenmiştir (170). *Listeria monocytogenes*'in bazı önemli stres proteinleri ve fonksiyonları Tablo 2.3.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.3.2. *Listeria monocytogenes*'in bazı önemli stres proteinleri.

Proteinin Adı		Proteinin Fonksiyonu
DnaK	Isı şoku proteini	Yüksek sıcaklık ve düşük pH'ya direnç
GroES, GroEL	En önemli ısı şoku proteinleri	Yüksek sıcaklık ve düşük pH'ya direnç
CspA, CspB, CspC	Soğuk şoku proteinleri	Düşük sıcaklığa adaptasyon
LtrA, LtrB, LtrC	Düşük sıcaklık proteinleri	Düşük sıcaklıklarda üreme yeteneği
LisRK, CesRK	Stres proteini	Asit, etanol ve oksidatif strese tolerans
ClpC, ClpE, ClpP	Stres proteinleri	Demir noksanlığına, yüksek sıcaklığa ve yüksek ozmolariteye direnç
GbuABC	Stres proteini	Yüksek ozmolariteye direnç
OpuB, OpuC	Stres proteini	Yüksek ozmolariteye direnç
OppA	Stres proteini	Yüksek ozmolariteye direnç
Bsh	Enzim	Safra tuzlarına tolerans
Sigma B	Stres proteini	Asit, ozmotik ve oksidatif strese direnç Düşük sıcaklık ve karbon eksikliğine tolerans

2.4. *L. monocytogenes*'in Gıda Hijyeni ve Halk Sağlığı Açısından Önemi

Listeria monocytogenes 1929 yılından beri insan patojeni olarak bilinmesine rağmen, özellikle 1980'lerden sonra gıda kaynaklı patojenler arasına dahil edilmiştir (90, 171). Kanada'da, 1981 yılında 41 kişinin *L. monocytogenes* içeren lahana salatası (cole slaw) yedikten sonra hastalanması ve 18 kişinin (172), 1983'te 14 kişinin süt kaynaklı listeriozis sebebiyle hayatını kaybetmesi (173), ardından 1985 yılında Meksika usulü peynir tüketimi sebebiyle listeriozis şekillenen 142 kişiden 48'inin ölmesi mikrobiyologların, yerel yönetimlerin ve gıda endüstrisinin dikkatini çekmiş ve gıdalarda *L. monocytogenes*'in tespiti, sıcaklık direnci ve hayatta kalma koşulları üzerine araştırmalar başlatılmıştır. Doksanlı yılların sonlarına varıldığında bu patojenin farkındalığı artmış ve etkenin kontrol önlemlerine yönelik çalışmalara hız verilmiştir (90). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention – CDC)'nin, kayıtlı vakalar dışında, teşhis veya rapor edilmemiş vakaların tahminlerini içeren 2011 yılı Gıda Kaynaklı Hastalık Tahminleri, ABD'de yılda yaklaşık 1600 vakanın meydana geldiğini göstermekmiştir (174).

Listeria monocytogenes çevrede yaygın olarak bulunan bir etkidir. Toprakta, sudan, bitkilerden/sebzelerden, yemden, endüstriyel işletmelerden ve çiftliklerden izole edilmesiyle birlikte (34), yapılan epidemiyolojik çalışmalar listeriozisin temel kaynağının kontamine gıdalar olduğunu göstermektedir (171). Patojen, sıklıkla gıda işleme tesislerinde, çiğ ya da işlenmiş gıdalarda bulunmaktadır (5, 175). Gıda kaynaklı bulaşma nedeniyle ortaya çıkan listeriozis vakalarının oranı ABD’de % 99 olarak tahmin edilmektedir (176). *Listeria monocytogenes*’in rezervuarları arasında evcil ve vahşi hayvanlar da yer almaktadır fakat, hayvandan insana direkt temas sonucu şekillenen listeriozis vakalarının nadir olduğu bildirilmiştir (34).

Listeria monocytogenes sığır, kanatlı ve domuz eti gibi taze etlerden, fermente sucuk, sosis ve füme et gibi et ürünlerinden, süt ve süt ürünlerinden, su ürünlerinden ve salata, kavun, patates, turp, lahana gibi taze sebze/meyve gibi tüketime hazır pek çok gıdadan izole edilmiştir (171, 177, 178).

Kanatlı hayvanlar, *L. monocytogenes* için önemli bir rezervuarıdır. Kanatlı, sığır ve koyun dışkılarında *L. monocytogenes* varlığının araştırıldığı bir çalışmada, diğer hayvanlara kıyasla etkenin en fazla kanatlı dışkılarından izole edildiği bildirilmiştir (179). Kanatlı eti ve ürünlerinde *L. monocytogenes*’in varlığının, öncelikli olarak kesim işlemi sırasında meydana gelen kontaminasyondan kaynaklandığı belirtilmiştir (27). Mekanikleşen kanatlı kesim sürecinde haşlama, tüy yolma, iç organ çıkarma gibi aşamalarda yeterli hijyen koşulları sağlanmadığında ve/veya işletmedeki ekipmanların dezenfeksiyonları detaylı bir şekilde yapılmadığında kanatlı karkasları yüksek düzeyde *L. monocytogenes* ile kontamine olabilmektedir (27, 55). Ayaz ve ark. (180)’nın yaptıkları bir çalışmada marketlerde satılan 240 adet tavuk karkasının % 20,4 oranında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Yücel ve ark. (181)’nin yapmış olduğu bir çalışmada ise, sığır eti, çiğ sığır kıyması ve tavuk eti *L. monocytogenes* yönünden incelenmiş ve patojen kıymada % 4,7, sığır etinde % 5,2 oranında bulunurken tavuk etinde % 11,5 oranında bulunmuştur. Ankara ilinde Şireli ve ark. (182) 40 kıyma, 30 köfte ve 30 burgerden oluşan toplam 100 tavuk eti ürününün sırasıyla % 35, % 20 ve % 26,6 oranında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Ayaz ve Erol (183)’un 2009 yılında hindi kıymalarında *L. monocytogenes* varlığını araştırdıkları bir çalışmada ise, 180 hindi kıymasının % 35,5’nin *Listeria spp.*, %17,7’sinin ise *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlenmiştir.

Etkeni taşıyan kasaplık hayvanların kesimi esnasında gerekli hijyen koşullarına uyulmaması nedeniyle etlerinin *L. monocytogenes* ile kontamine olması, et işleme tesisindeki personel ve ekipmanların neden olduğu çapraz kontaminasyonlar ve bunlara bağlı olarak etlerin ve et ürünlerinin kontamine bir şekilde paketlenmesi ile uygun olmayan depolama koşullarında muhafaza edilmesi listeriozis vakalarının şekillenmesinde önemli rol oynamaktadır (55, 184, 185, 186). Çeşitli et ve et ürünlerinde yapılan prevalans çalışmalara göre; TÜBİTAK 114R104 nolu proje neticesinde Ankara ve Kırıkkale illerinde sığır ve koyun karkaslarında sırasıyla % 3,4 ve % 2,5, Erzurum'da döner örneklerinde % 18,8 (187), Belçika'da çiğ ve kürlenmiş sığır ve domuz etlerinde sırasıyla % 4,7 ve % 14,9 (188), İsviçre'de 211 sığır kıyması ve 189 domuz kıymasında sırasıyla % 11,9 ve % 9,5 (189), Kanada'da sığır etinde % 52, domuz pirzolasında % 24, fermente sucukta % 4, (190), İtalya'da çiğ sığır ve domuz etinde sırasıyla % 24,4 ve % 21,4 (191) oranında *L. monocytogenes* izole edildiği bildirilmiştir.

Şarküteri ürünleri, tüketime hazır gıdalar arasında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration – FDA) ile Tarım Bakanlığı - Gıda Güvenliği ve Denetim Servisi'nin 2003 yılında yaptığı risk değerlendirmesi çalışması kapsamında *L. monocytogenes* kontaminasyonu açısından en yüksek riske sahip gıda olarak seçilmiştir (192). Türkiye'de Van ilinde yapılan bir çalışmada, vakumlu paketlenmiş sosislerde % 5 oranında, ambalajlanmamış sucuk, salam ve sosislerde de sırasıyla % 15, % 10 ve % 25 oranında *L. monocytogenes* identifiye edilmiştir (193). Afyon Karahisar'da yapılan bir başka çalışmada ise, 100 sucuk örneği *L. monocytogenes* kontaminasyonu yönünden incelenmiş ve örneklerin 7'sinin bu patojen ile kontamine olduğu belirlenmiştir (194).

Kontamine süt ve süt ürünleri *L. monocytogenes*'in insanlara bulaşmasında önemli bir kaynaktır. Özellikle klinik semptom göstermeyen, *L. monocytogenes* ile infekte olmuş süt inekleri, sütleri ile etkeni kolaylıkla saçabilmektedirler (55). Bunun yanı sıra, *L. monocytogenes* ile kontamine silaj yemlerinin süt hayvanları tarafından tüketilmesi ile de hayvanlar infekte olabilmektedir (24, 195). Kontamine sütlerle etkenin saçılmasında *L. monocytogenes*'in bir hücre içi patojen olması ve bu sebeple pastörizasyondan etkilenmemesi büyük rol oynamaktadır (196). Günümüzde çiğ süt, pastörize süt, peynir, krema, tereyağı ve dondurmaya ilişkin *L. monocytogenes* vakaları bildirilmiştir (55).

Özellikle teknolojileri gereği çiğ süttten yapılan yumuşak peynirler önemli risk teşkil etmektedir (7, 197).

Listeria monocytogenes'in çevrede yaygın olarak bulunması, psikrofilik karakteri ve yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi canlı kalabilmesi etkenin pek çok su ürününden izole edilmesine neden olmaktadır. İşleme tesislerindeki yetersiz sanitasyonun, işleme sonrası kontaminasyonun ve su ürünlerinin çiğ ya da yetersiz pişirilmesi sonucu tüketilmesinin bu gıda türünden kaynaklanan vakalarda oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (55). Bunun yanı sıra, tüketicilerin muhafaza koşullarına dair yeterli bilgiye sahip olmaması nedeniyle, düşük düzeylerde *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş tüketime hazır su ürünlerinde patojenin sayısı artmakta ve infeksiyonlar şekillenebilmektedir (198). Sırıken ve ark. (199)'nın yaptığı bir çalışmada 50 tuzlu ançüez, 50 çiğ ançüez ve 50 ham midye *L. monocytogenes* yönünden incelenmiş ve gıdaların sırasıyla % 12, % 2 ve % 2 oranında etken ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Dünyada, su ürünlerinden gökkuşağı alabalığı (200, 201), midye füme (202) ve karides (203) gibi bazı gıdalara ilişkin salgınlar bildirilmiştir.

L. monocytogenes'in hayvansal gıdalarda bulunmasının yanı sıra, hayvan orijinli olmayan pek çok gıdanın da etken ile kontamine olduğu belirtilmektedir. Bu durum, hayvan dışkıları, toprak, yüzey, nehir ve kanal sularından veya atık su arıtma işlemlerinden çıkan atıklardan kaynaklanan kirlilikten kaynaklanmaktadır (204). Birçok ülkede çiğ ve az miktarda işlenmiş sebze türleri üzerinde *L. monocytogenes* varlığı açıkça gösterilmiş ve bitki veya sebzelerden kaynaklanan salgınlar rapor edilmiştir. Bunlardan donmuş sebze, tüketime hazır salata, karamelli elma, fasülye filizi ve kavun 2011'den bu yana ABD'de salgınlara sebep olan bitkisel kaynaklı gıdalar arasında yer almıştır (177).

Esas olarak kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu şekillenen listeriozis ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, kusma, ishal gibi hafif seyirli semptomlar ile seyredebileceği gibi, özellikle risk grubu bireylerde ağır bir hastalık tablosu meydana getirebilmektedir. Listeriozisin daha ciddi seyirli olan invaziv tipinde, gribal infeksiyon tablosu ve diyarenin şekillenmesinden birkaç gün sonra septisemi, meningitis, ensefalitis meydana gelebilmektedir (205-207). *Listeria* infeksiyonlarının insanlarda görülen başlıca formları; akut septik (yeni doğan listeriozu), merkezi sinir sistemi (menenjit, ensefalit,

ensefalomiyelit, meningoensefalit), glandular (lenfadenit), lokal (deri listeriozisi, konjunktivit) ve kronik-septik (endokardit, apse, vb.) şeklindedir (24).

Sağlıklı yetişkinler ve çocuklarda genellikle hafif ila orta derecede semptomlar yaşanırken, risk grubu içerisinde yer alan; hamileler, yeni doğanlar, küçük çocuklar, yaşlılar ve immun sistemi baskılanmış bireylerde (kanser hastaları, şeker hastaları, HIV ile infekte insanlar, organ ya da kemik nakli geçirenler, kalp hastaları, siroz hastaları, ilaç bağımlıları vb.) ölümle sonuçlanan oldukça ağır bir listeriozis tablosu meydana gelebilmektedir (24, 208). İnfeksiyonun, sağlıklı kişilerde organizmayı yok etmek için monositleri ve makrofajları harekete geçiren tümör nekroz faktörü ve diğer sitokinlerin üretimini uyarılması nedeniyle genellikle kendi kendine sınırlı kaldığı bildirilmiştir (209).

Her ne kadar *L. monocytogenes* ile infekte olmanın esas sebebi kontamine olmuş gıdalar olsa da, etkenin aynı zamanda gebelik sırasında transplental olarak veya doğum esnasında doğum kanalı vasıtasıyla da anneden çocuca geçebildiği belirtilmiştir (210-213). CDC verilerine göre, hamile kadınların listeriozise yakalanma riskinin normal bireylere göre 10 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (205). Gebelik sırasında oluşan enfeksiyonun ilk safhalarında influenza benzeri semptomlar gözlenebilirken, ilerleyen dönemlerde erken doğum, abort, ölü doğum veya yeni doğan listeriozu şekillenebilmektedir (206, 207, 214). Hamile kadınlarda gebeliğin üçüncü döneminde gerçekleşen enfeksiyonların % 22'sinin ölü doğum veya neonatal ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (206).

Listeria monocytogenes'e maruz kalma ile hastalık başlangıcı arasında süren ve genellikle birkaç haftayı alan uzun süre, etkenin minimal infektif dozu (MİD) hakkında kesin bir bilgi almayı zorlaştırmaktadır (215). Etkenin alınış şekline, gıdanın türüne, patojenin virülensine ve bireyin bağışıklık sistemi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak enfeksiyon dozu değişebilmektedir (216). Genel olarak sağlıklı bireylerde enfeksiyon meydana getirebilmesi için 100 kob/g'dan daha fazla *L. monocytogenes* konsantrasyonlarının gerekli olduğu düşünülmektedir (217).

Etkenin inkübasyon periyodu 1 ila 70 gün arasında değişmektedir. Bir çalışmada, 1987-2003 yılları arasında bildirilen 37 listeriozis vakasının incelenmiş ve inkübasyon süresi invaziv listeriozisli hastalarda 1-67 gün, merkezi sinir sistemi semptomları gelişmiş

hastalarda 1-14 gün, hamile bireylerde 17-67 gün ve bakteriyemi vakalarında 1-12 gün, gastroenterit vakalarında ise 6-240 saat olarak bildirilmiştir (218).

Listeriozisin insidensi kampilobakteriozis ve salmonellozise göre nispeten düşük olmakla birlikte, hastaneye yatırılma ve mortalite oranı oldukça yüksektir (219). Hastaneye kaldırılan invaziv listeriozis vakalarının % 20-30'unun ölümlle sonuçlandığı belirtilmiştir (220). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority – EFSA)'nin verilerine göre, 2013 yılında AB'de (toplam 27 ülke) 1763 adet insan listeriozis vakası bildirilmiştir. Hastaların %99,1'i hastaneye kaldırılırken, %15,6'sı ölmüştür (221). 2009 yılında ABD'de, listeriozis sebebiyle hastaneye yatan 50 yaş ve üstü hastaların % 17,5'inin, 4 yaş altı çocukların ise %94,1'inin öldüğü rapor edilmiştir (222).

Listeria monocytogenes son yirmi yılda pek çok salgına sebep olmuştur. CDC verilerine göre 1998-2015 yılları arasında toplam 19,119 vaka şekillenmiştir. Bu vakalarda toplam 373,531 kişi hastalanmış, bunlardan 14,681 kişi hastaneye kaldırılmış ve 337 kişi ölmüştür (223). ABD'de salgınların izlenmeye başladığı 1970'li yıllardan beri en büyük çapta salgınlardan biri 2011 yılında Colorado'da gerçekleşmiştir. Bir kavun türünden (cantaloupe) ileri gelen listeriozis salgını sonucu 147 kişinin infekte olduğu ve 33 kişinin (% 22) öldüğü rapor edilmiştir (223, 224). EFSA 2015 verilerine göre, 2013 yılında AB'de 1743 listeriozis olgusu kayıtlara geçmiş ve bunlardan % 15,6'sının öldüğü belirtilmiştir (225). Noordhout ve ark. (224) tarafından 2014 yılında yapılan bir meta analiz çalışmasında, 2010 dünyada 23,150 kişinin listeriozisle mücadele ettiği ve 5463'ünün öldüğünün tahmin edildiği bildirilmiştir.

AB'de 2011 yılında şekillenen yaklaşık 1470 listeriozis vakasının ölüm oranı % 12,7 olarak rapor edilmiştir (226). Avrupa'da 2015 yılında 2206 kişide listeriozis şekillenmiş ve bunlardan 270'i ölümlle (% 12,2) sonuçlanmıştır. Buna ek olarak, bu dönemde 84 yaş üstü olan bireylerde bildirilen vaka sayısı ve oranları önceki yılların yaklaşık iki katına çıkmıştır (221). 2000-2017 yıllarında *L. monocytogenes*'in neden olduğu gıda kaynaklı vakalar Tablo 2.4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4.1. 2000-2017 yıllarında *L. monocytogenes*'in neden olduğu gıda kaynaklı vakalar.

Yıl	Ülke	Gıda	Vaka sayısı (Ölüm)	Kaynak
2000	Fransa	Kavurma et	10(10)	(227)
2000	Fransa	Domuz dili	32(31)	(227)
2000	ABD	Hindi eti şarküteri ürünleri	30(7)	(228)
2001	ABD	Meksika tipi peynir	142(48)	(229)
2002	ABD	Hindi eti şarküteri ürünleri	54(11)	(230)
2005	İspanya	Et (orijini belli değil)	2	(231)
2005	ABD	Çiğ süt	12(?)	(232)
2005	ABD	Hindi eti şarküteri ürünleri	13(?)	(232)
2005	ABD	Izgara tavuk	3(?)	(232)
2005	Avustralya	Şarküteri ürünleri	2(2)	(233)
2006	Çek Cumhuriyeti	Yumuşak peynir	78(13)	(231)
2006	Almanya	Harz peyniri	6(1)	(231)
2006	ABD	Jambon	3(0)	(232)
2007	Norveç	Çiğ süt, yumuşak peynir	21(5)	(234)
2008	Kanada	Pastörize peynir	38	(235)
2009	Avusturya	Peynir	25(5)	(236)
2009	Çek Cumhuriyeti	Peynir	9(4)	(236)
2009	Almanya	Peynir	6(2)	(236)
2011	Belçika	Peynir	11(4)	(237)
2011	İsviçre	Domuz eti ve ürünleri	9(?)	(237)
2011	ABD	Kavun (cantaloupe)	147(33)	(177)
2012	İngiltere	Sandviç, domuz pasta, sığır eti ve ürünleri	24(5)	(238)
2012	İspanya	Peynir	11 (1)	(238)
2012	Finlandiya	Kırmızı et ve ürünleri	20(3)	(238)
2012	ABD	Ricotta salatası	15(3)	(239)
2012	ABD	Peynir	22(4)	(177)
2012	Avustralya	Yumuşak peynir	18(3)	(240)
2013	ABD	Peynir	6(1)	(177)
2014	ABD	Peynir	8(1)	(177)
2014	ABD	Quesito casero peyniri	5(1)	(177)
2014	Danimarka	Et mezesi	41(17)	(241)
2014	ABD	Soya filizi	5(2)	(177)
2014	ABD	Karamelli elma	32(7)	(177)
2015	ABD	Yumuşak peynir	30(1)	(177)
2015	Kanada	Salata	14(3)	(242)
2015	ABD	Dondurma	2(1)	(177)
2016	ABD	Donmuş sebze	9(1)	(177)
2016	ABD	Çiğ süt	2(1)	(177)
2016	ABD	Paketlenmiş salata	19(1)	(177)
2017	ABD	Yumuşak peynir	8(1)	(177)

Listeriozisin insidansı ülkelere ve yıllara göre değişmektedir. Avrupa'da invaziv listeriozisin, doğru tedavi ve düşük insidansa rağmen, klinik şiddeti (hastanede kalma oranı > % 90) ve yüksek ölüm oranı (% 20-30) nedeniyle halk sağlığı için büyük bir

endişe kaynağı olduğu bildirilmiştir (243). Yapılan incelemelerde, Avrupa ülkelerinde 2011 yılında 0,31 vaka/100,000 kişi olan insidans, 2013 yılında 0,44'e yükselmiştir (221, 215, 243).

Avustralya'da 2008-2016 yılları arasında insidans 0,3-0,4 vaka/100,000 kişi arasında değişmekte olduğu ve vakaların en fazla 60 yaş üstü hastalarda görüldüğü bildirilmiştir (220, 244). Tayvan'da 2005 öncesi 0,29 vaka/100,000 kişi olan insidans, ülkedeki moleküler epidemiyolojik çalışmaların hız kazanmasıyla 2005'den sonra 1,18'e yükselmiştir (245). İtalya'da yıllık listeriozis insidansının 0,19-0,27 vaka/100,000 kişi olduğu tahmin edilmektedir (246). Fransa'da 1999-2005 yılları arasında listeriozis insidansı 0,45 vaka/100 000 kişiden 0,35 vaka/100,000 kişiye düşmesine rağmen, 2006 yılında 0,47 vaka/100,000 kişiye yükselmiştir. Danimarka'da listeriozis insidansı 2006'te 1,03 vaka/100,000 kişi olarak zirve yapmıştır. Belçika, İngiltere, Finlandiya, Almanya, Hollanda, İsveç ve İsviçre'de 2006 yılı için listeriozis insidansları sırasıyla; 0,64, 0,35, 0,85, 0,62, 0,39, 0,46 ve 0,91 vaka/100,000 kişi olarak bildirilmiştir (6).

ABD'de listeriozis insidansının 1996'dan 2001 yılına kadar % 24 azalma gösterdiği, ancak 2001 yılından sonra arttığı bildirilmiştir (206). ABD'de 2004-2009 yılları arasında listeriozisin görülme sıklığının 0,27 vaka/100,000 kişi (247), 2009-2011 yılları arasında ise 0,29 vaka/100,000 kişi olarak rapor edilmiştir (248).

2.5. Gıdalarda *L. monocytogenes*'in Kontrolü

Listeria monocytogenes'in gıdalarda kontrolü ülkelerin belirledikleri yasal düzenlemeler ile denetlenmektedir. Çoğu ülke bu yasal düzenlemelerin uygulanmasında gıdaların *L. monocytogenes*'in gelişimini destekleyip desteklememesi temel alınmaktadır. Listeriozis ile ilişkili olma riskinin en yüksek olduğu tahmin edilen gıdalar, *L. monocytogenes*'in gelişmesini destekleyen tüketime hazır gıdalar olarak belirtilmektedir. Bu gıdalar arasında süt, tereyağı, krema, yumuşak peynirler, pişirilmiş kabuklu hayvanlar, füme deniz ürünleri, çeşitli sebzeler (brokoli, lahana ve salata yeşillikleri gibi), meyveler (kavun, karpuz ve papaya gibi), bazı şarküteri türü salatalar ve sandviçler yer almaktadır. *Listeria monocytogenes* gelişimini desteklemeyen gıdalar ise, gıdanın iç ve dış faktörleri ile uygulanan işlemsel faktörler nedeniyle patojenin üremesini desteklemeyen gıdalar olarak kategorize edilmektedir. Bunlar, pH'sı 4,4'ten düşük olan, a_w değeri 0,92'nin altında olan, bu faktörlerin kombinasyonuna sahip olan

(örneğin $pH < 5,0$ ve $a_w < 0,94$) ve/veya dağıtım zinciri boyunca donmuş olarak muhafaza edilen gıdalar olarak belirtilmektedir (249, 250). Buna göre, eğer gıda *L. monocytogenes* üremesini destekliyorsa üretici firmadan çıktığı andan itibaren 25 gram gıdada hiç olmaması istenirken, patojenin üremesini desteklemeyen bir gıda türü ise raf ömrü boyunca 100 kob/g'a kadar izin verilmektedir. Avrupa Birliği, Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda, ve Japonya bu politikayı izlerken, ABD ve Türkiye'de ise gıdanın *L. monocytogenes* üremesini destekleyip desteklemediğine bakılmaksızın tüketime hazır gıdaların 25 gramında hiç olmaması istenmektedir (251-253).

Gıdaların *L. monocytogenes* ile kontaminasyonunun, çiftlikten sofraya uzanan zincir boyunca birden fazla noktada oluşabileceğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (254-256). Halk sağlığının korunabilmesinde etkili bir yol izleyebilmek için kontaminasyonun hangi gıda türünde ve hangi aşamada olduğu büyük önem taşımaktadır (34). Özellikle doksanlı yılların başından başlayarak geliştirilen kontrol önlemleri, birçok gıda türünde *L. monocytogenes* prevalansını büyük ölçüde azaltmıştır (215). Bu kontrol yöntemleri *L. monocytogenes*'i yok etmeye yardımcı olsa da, işlenmiş ürünlerin üretim sonrası şekillenen çapraz kontaminasyonlara maruz kalması ya da kontrol yöntemleri uygulandıktan sonra hasar gören ancak canlılığını koruyan hücrelerin raf ömrü süresince çoğalması tüketiciler için potansiyel tehdit oluşturmaktadır (257).

Sıcaklık uygulaması, gıdalarda *L. monocytogenes*'i elimine etmek için kullanılan etkili yöntemlerden biridir. *Listeria monocytogenes*'in 1 ila 45°C arasındaki sıcaklıkta çoğalabilmesi, gıdalarda etkenin kontrol edilmesi için gereken sıcaklık koşullarına oldukça dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda 65°C'nin üzerindeki pişirme sıcaklıklarında *L. monocytogenes*'in yok olduğu bildirilmiştir (233, 258). Autio ve ark. (259)'nın yaptığı bir çalışmada, daha önce *L. monocytogenes* izole edilmiş bir deniz ürünleri işleme tesisinde, kritik kontrol noktalarında sıcaklık uygulamaları gerçekleştirilmiş (buhar, sıcak hava ve 80°C'de sıcak su) ve uygulama sonucunda alınan 188 örneğin hiç birinden *L. monocytogenes*'in izole edilmediği bildirilmiştir.

Buzdolabı sıcaklığında üreyebilen etken, özellikle uzun raf ömrüne sahip tüketime hazır gıdalarda risk teşkil etmektedir (260). Vitas ve ark. (261)'nin yaptıkları bir çalışmada, paketlenme öncesinde ısı işlemine tabi tutulan tüketime hazır gıdalardan pişmiş veya

kürlenmiş et ve et ürünleri, tütsülenmiş somon ve pastörize süttten üretilen peynir örnekleri *L. monocytogenes* varlığı yönünden incelenmiş ve 940 örneğin % 28'inden etken izole edilmiştir. Bu durum, sıcaklık uygulaması sonrasında hayatta kalan ya da hasar gören hücrelerin olabileceğini ve bu bakterilerin muhafaza süresince çoğalarak yüksek seviyelere ulaşabileceğini ortaya koymaktadır.

Gıdalara uygulanacak olan ısı işleminde, patojenin tamamen ortadan kaldırılması ve/veya sıcaklık direncinin gelişmemesi önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışmada, *L. monocytogenes* ile kontamine edilen marul yaprakları 20°C ve 50°C sıcaklıklara tabi tutulmuş ve bu sıcaklık parametrelerinin *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (262). Yapılan bir başka çalışmada ise, *L. monocytogenes* ile kontamine sütlere 20 dakika boyunca 60°C sıcaklık uygulanmış ve etken sayısının başlangıçta azaldığı ancak canlı kalan hücrelerin hiç sıcaklık uygulanmayan hücrelere oranla daha hızlı ürediği bildirilmiştir (263).

Sıcaklık uygulamaları gıda kaynaklı patojenlerin yok edilmesi amacıyla ışınlama ve yüksek hidrostatik basınç ile birlikte kombine olarak da kullanılmaktadır (90). Grant ve ark. (264) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. monocytogenes* ile kontamine edilen pişmiş sığır biftekleri 0,8 kilogray (kGy) ışınlamaya maruz bırakılmış ve ışınlama işleminin patojeni sıcaklığa daha duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir. Bu hassasiyetin buzdolabı sıcaklığında 2 haftaya kadar devam ettiği ve bu bifteklere sıcaklık uygulandığında *L. monocytogenes*'lerin daha kolay inaktive olduğu bildirilmiştir.

Yüksek basınç, gıdalarda bozulmaya sebep olan saprofit bakteriler ve gıda güvenliğini tehdit eden patojen mikroorganizmaları yok edebilmek için kullanılan termal olmayan bir işlemdir. Hem sıvı hem de katı gıdalara uygulanabilir olması ve aynı zamanda gıdanın organoleptik özelliklerini minimal düzeyde etkilemesi, yüksek basınç işlemini gıdaların raf ömrünü uzatmak için son yıllarda sıklıkla kullanılan bir yöntem haline getirmiştir (265, 266). Basınç işleminin uygulandığı gıdalar arasında meyve suları, jöleler, soslar, kek, avokado posası ve pişmiş jambon gibi tüketime hazır gıdalar yer almaktadır (266). Ritz ve ark. (267)'nin yaptığı bir çalışmada *L. monocytogenes* hücreleri 400 megapascal'da (MPa) 10 dakika süreyle yüksek basınca maruz bırakılmış ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda herhangi bir üreme gözlenmediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada flow sitometri ile yapılan ölçümlerde ise, hücre popülasyonunun bir bölümünde membran bütünlüğünün bozulduğu tespit edilmiştir.

Gıda güvenliği perspektifinden yüksek basınç işlemi genellikle sıcaklık uygulamaları ile birlikte uygulanmaktadır. Murano ve ark. (268)'nin domuz kıyma örneklerinde yaptığı bir çalışmada, 50°C'de 109 dakikalık sıcaklık uygulaması ile *Listeria* popülasyonunda 1 log'luk azalma gözlenirken, aynı sıcaklık uygulamasının yüksek basınç (414 MPa) ile kombine edilmesi neticesinde D değerinde yaklaşık 0,3 dakikalık bir azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise, *L. monocytogenes* ile kontamine edilen sütlere hafif ısı işlemi (37°C'de 4 saat veya 50°C'de 10 dakika) ardından yüksek basınç (550 MPa'da 5 dakika) uygulanmış ve 25°C'de 70 günlük muhafaza sonrasında dahi etkenin üremediği bildirilmiştir (269). Stollewerk ve ark. (257) yaptıkları bir çalışmada, *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş midyeler yüksek basınca (350 MPa, 2 dakika) ve 55°C'ye 10 dakika maruz bırakılmış, 55°C'deki sıcaklığın *L. monocytogenes* sayısında herhangi azalmaya neden olmadığını fakat yüksek basıncın bakteri sayısını düşürmede etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Listeria monocytogenes pH 4,3-9,6 aralığı gibi geniş bir aralıkta çoğalabilmektedir (24). Düşük pH *L. monocytogenes*'in üremesi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olmakla birlikte kullanılan asidin çeşidi, sıcaklık, atmosferik koşullar ve ortamda bulunan diğer antimikrobiyel maddelerin de etkisi söz konusu olmaktadır (270). Yapılan bir çalışmada, mayonezli deniz mahsulleri salatası pH 3,7, 4,0, 4,4, 4,7 ve 5,1'de 4°C, 8°C ve 12°C'lerde aerobik ortamda ve vakumlu paketlerde inkübe edilmiştir. Çalışmada *L. monocytogenes* üremesinin en düşük pH 3,7'de buzdolabı sıcaklığında vakumlu paketlemede gerçekleştiği bildirilmiştir (271).

Günümüzde organik asitler (asetik, laktik, sitrik, propiyonik, peroksiasetik (peraasetik), sorbik asit vb.) antibakteriyel etkileri ve doğal olmaları sebebiyle pH'nın düşürülerek *L. monocytogenes*'in kontrol altına alınmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Organik asitler, FDA tarafından GRAS listesinde (Genel Olarak Güvenli - Generally Recognized as Safe) yer almaktadır ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization – FAO) / Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization – WHO) ve FDA tarafından gıda katkı maddeleri olarak onaylanmışlardır (272). Organik asitler, büyükbaş ve domuz karkaslarında kullanılmalarının yanı sıra, özellikle kanatlı kesiminde karkaslara sprey, yıkama veya daldırma gibi yöntemler ile yıkama ve soğutma suyu ile haşlama tankında uygulanmaktadır (273). Yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaları mikroorganizmalar üzerinde daha etkili sonuçlar verse de, karkasların tat,

koku, renk gibi duyuşal özelliklerinin etkilenmemesi için genellikle % 1-3 konsantrasyonlarda kullanılmaktadırlar (274). Yapılan bir çalışmada, *L. monocytogenes* ile kontamine edilen yağsız sığır etlerinde kullanılan % 1,7'lik laktik asit ve % 2'lik asetik asidin bakteri popülasyonunu 7 güne kadar 2 ila 3 log azalttığı bildirilmiştir (275). Bununla birlikte Gonzales-Fandos ve Herrera (272) tarafından yapılan bir çalışmada, % 1 ila % 2'lik asetik asidin tavuk butlarında daldırma metodu ile uygulanmasının tek başına *L. monocytogenes*'i ortadan kaldırmaya yetmediğı ve raf ömrünü uzatabilmek için mutlaka diğerkontrol yöntemleri ile kombine kullanılması gerektiğı bildirilmiştir.

Listeria monocytogenes'in elimine edileceğı pH değerlerine ulaşabilmek için kullanılan maddeler aynı zamanda etkenin direnç geliştirmesine de sebep olabilmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda *L. monocytogenes*'in düşük asit ve yüksek tuz konsantrasyonuna maruz bırakıldığında Caco-2 hücrelerinde virülensinin arttığı bildirilmiştir (276-278). Ayrıca laktik asit ve asetik asidin *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonunu tetiklemede hidroklorik asitten çok daha etkili olduğu belirtilmiştir (279). Yapılan bir başka çalışmada ise, alkali pH'ya (pH 9,0-12,0) maruz bırakılan *L. monocytogenes* suşlarının sıcaklığa daha dirençli, klora (2,0-2,4 mg/L) maruz bırakılanların ise daha duyarlı oldukları rapor edilmiştir (280).

L. monocytogenes aerobik ve anerobik koşullar ile buzdolabı sıcaklığında iyi üreyebilen bir bakteri olması sebebiyle vakum ya da modifiye atmosfer paketleme yapılmış gıdalarda risk oluşturmaktadır (281). Vakum paketlenmiş (282) veya süper atmosferik oksijen uygulanmış (> 5 kPa O₂) ambalajlarda (283) etkenin üremesinin önüne geçilemediğı belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 4°C'de 2-3 hafta muhafaza edilen ≥ % 80 karbondioksit ile % 100 nitrojen içeren ambalaj ile paketlenmiş peynirlerde etkenin lag fazının uzadığı, bununla birlikte % 10 oksijen içeren nitrojenden zengin (~ % 80) ortamın patojenin üremesini tam olarak inhibe edemediğı bildirilmiştir (284). Bakterinin üremesinin engellenebilmesinde en az % 80 CO₂'e ihtiyaç duyulduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (284, 285).

Etken düşük sıcaklık, asidik pH, yüksek ozmolarite gibi pek çok çevresel stres koşullarında çoğalabilmesinin yanında, biyofilm oluşturarak gıda ürünleri işleme ekipmanlarının yüzeyinde de hayatta kalabilmektedir (286). Patojen, biyofilm oluşturarak perakende satış yapılan yerlerde ya da gıda üretim işletmelerinde uzun süre

varlığını devam ettirebilmektedir. Bu durum, gıdanın işleme sonrası kontamine olmasına neden olmakta ve hem gıda endüstrisi hem de halk sağlığı için büyük bir sorun teşkil etmektedir (175, 215). Biyofilm oluşturarak hayatta kalan patojen, temizlik ve dezenfeksiyona karşı direnç geliştirmekte ve hijyen protokollerinin uygulanmasına rağmen ortadan kaldırılması güçleşmektedir (287). Mafu ve ark. (288)'nin yaptığı çalışmada, *L. monocytogenes*'in oda sıcaklığında sodyum hipoklorit, iyodofor bileşikleri ve kuaterner amonyum bileşiklerine duyarlı olduğunu ancak 4°C'de etkeni etkisiz hale getirebilmek için bu bileşiklerin 5 ila 10 kat daha yüksek konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda patojenin ozon, klor, hidrojen peroksit, yüksek basınç (500 MPa) ve yüksek sıcaklık (80°C) ile etkisiz hale getirilebileceği belirtilmektedir (259, 288, 289).

L. monocytogenes'in çeşitli gıdalarda rekabetçi flora ile baskılandığını kanıtlayan pek çok çalışma mevcuttur. Bu rekabetçi bakterilerden en sık kullanılanlarından biri olan laktik asit bakterileri, düşük sıcaklıklarda üreyebilmeleri ve ürettikleri bakteriyosinler sayesinde *L. monocytogenes*'in üremesini önemli ölçüde baskılayabilmektedir (113, 290). Bredholt ve ark. (290) yaptıkları bir çalışmada buzdolabı sıcaklığında laktik asit bakterilerinin, *L. monocytogenes* inoküle edilmiş jambon ve sosislerde etkeni inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise, sosislere *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* ve *Pediococcus acidilactici*'den oluşan çoklu kültür *L. monocytogenes* ile birlikte inoküle edilmiş ve buzdolabı sıcaklığında 28 gün muhafaza edilmesinin ardından *L. monocytogenes* sayısında 4,2 - 4,7 log'luk bir azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir (291). Laktik asit bakterileri kullanılarak sığır, tavuk, domuz, balık eti, deniz mahsulleri ve bunların ürünleri ile gıda işleme tesisleri gibi pek çok alanda *L. monocytogenes* kontrolü mümkün olmaktadır (113).

Bakteriyosinler, bakterilerin ribozomlarında sentezlenen peptid yapısındaki antimikrobiyel maddeler olarak kategorize edilmektedir (292). Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen çeşitli bakteriyosinler olmakla birlikte, FDA tarafında onaylanan ve 45'den fazla ülkede katkı maddesi olarak kullanımına izin verilen bakteriyosin; *Lactococcus lactis* subs. *lactis* tarafından üretilen nisindir (292, 293). Geniş bir spektruma sahip olan nisin, özellikle Gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal etkisinin olduğu bildirilmiştir (294). Ticari preparatları, raf ömrünü uzatmak ve gıda güvenliğini artırmak için gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (286).

Yapılan bir çalışmada, yapım aşamasında *L. monocytogenes* ile kontamine edilen ricotta peynirlerinde nisin bakteriyüremesini 6 haftaya kadar baskıladığı bildirilmiştir (295). *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen pediosin ise, et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in büyümesini önlemek için kullanılan bir diğer ticari bakteriyosin olarak bildirilmektedir (296).

Paketleme materyallerinde antimikrobiyel ajanların kullanımı, gıdanın ambalaj ile temas eden yüzeyinde mikroorganizmaların üremesini önleyerek özellikle tüketime hazır gıdalarda raf ömrünü uzatmak için başvurulan bir yöntemdir (294). Yengeç, karides ve kerevit gibi kabuklu deniz kabuklarının dış iskeletinin temel bileşeni olan kitosan, kitinin deasetilleştirilmesiyle elde edilen doğal ve toksik olmayan bir biyopolimerdir (297). Üstün film oluşturuçu özelliğı, bakterilerin kullandığı besin maddelerini adsorbe etmesi, suya bağlanması ve çeşitli bakteri enzim sistemlerini engelleme yeteneğı nedeniyle kitosanın antimikrobiyel film üretiminde oldukça kullanışlı olduğu bildirilmiştir (298, 299). No ve ark. (297) yaptıkları çalışmada, kitosanın Gram negatif bakterilere oranla Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, kitosanın kendine özgü antimikrobiyel aktivitesine rağmen, tek başına kullanıldığında *L. monocytogenes*'in çoğalması üzerine engelleyici etkisinin yeterli olmadığı belirtilmektedir (294, 298). Beverly ve ark. (299) bifteklerde asetik asit ile birlikte kullanılan kitosanın *L. monocytogenes* kontrolünde daha etkili olduğunu bildirirken, Ye ve ark. (298) soğuk fümelenmiş somonlarda paketleme yüzeyinde kitosanın sodyum laktat ile birlikte kullanılmasının oldukça başarılı sonuç verdiğini rapor etmişlerdir.

Esansiyel yağlar gibi doğal antimikrobiyel bileşikler ile de birçok gıda ürününde *Listeria* inhibisyonu üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Bitki ve baharatlardan elde edilen esansiyel yağlar, doğal aroma maddeleri olarak gıda maddelerinde çok uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Çeşitli esansiyel yağların antilisteriyal aktivitesi üzerine pek çok çalışma mevcuttur (300-302). Araştırmalar, gıdalarda istenilen bakterisidal etkiyi elde etmek için in vitro çalışmalarda kullanılanlardan daha yüksek konsantrasyonlarda esansiyel yağlara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (303). Bununla birlikte, gıdalarda antibakteriyel madde olarak uçucu yağların bu şekilde yüksek oranda kullanılması, gıdaların duyuşal özelliklerinde istenmeyen değıişimlere sebep olabilmektedir (286).

Bahsi geçen kontrol yöntemleri genellikle tek başlarına kullanıldıklarında gıdalarda antimikrobiyel stabilitenin korunması ve gıda güvenliğinin sağlanması için yeterli olmamaktadır. Birden fazla kontrol yönteminin kombine olarak uygulanması anlamına gelen ve “hurdle concept” olarak adlandırılan metot, bu durumun üstesinden gelebilmek adına yaklaşık 40 yıldır uygulanmaktadır (304). *L. monocytogenes*'in gıdalarda “hurdle concept” uygulanarak kontrol altına alınmasına yönelik yapılan araştırmalar sıcaklık, pH, a_w , bakteriyosinler, modifiye atmosfer paketleme, rekabetçi flora veya esansiyel yağların birkaçının birlikte kullanılmasının daha etkili sonuçlar doğurduğunu bildirmektedir (90, 305, 306, 307, 304).

Tüketicilerin, minimum düzeyde işleme tabi tutulan ve minimum düzeyde kimyasal koruyucuyla patojenlerden arındırılmış gıda talebi gün geçtikçe artmaktadır (286). Bu durum, tüketici gereksinimlerini karşılayabilmek için alternatif kontrol stratejilerinin geliştirilmesini ihtiyaç kılmıştır. Son zamanlarda bakteriyofajlar, patojenler ile doğal yöntemlerle mücadelede güvenli bir biyokontrol ajanı olarak karşımıza çıkmaktadır. GRAS listesinde yer alan bakteriyofajların, çevrede yaygın olarak bulunmaları sebebiyle kolay elde edilebilir ve ucuz olmalarının yanı sıra, yüksek spesifiteye sahip olmaları ve canlı vücudunda toksik etki göstermemeleri onları tercih edilen bir kontrol yöntemi haline getirmektedir (308). Günümüzde, içinde *L. monocytogenes*'e karşı da etkili olan ticari preparatları mevcut olan bakteriyofajlar gıda güvenliğini sağlamak amacıyla gıda yüzeyine uygulanarak, gıdanın içerisine karıştırılarak, gıdayı bakteriyofajlı suya batırarak, gıda ambalaj materyaline tutturularak ya da gıda üretim ekipmanları ve temas yüzeylerine uygulanarak kullanılmaktadır (309, 310). *L. monocytogenes*'in bakteriyofajlarla biyokontrolünde kullanılan gıda modelleri arasında somon filetosu (311), yumuşak peynir (44), tüketime hazır tavuk (312), kıyma (313), kavun ve elma (314) gibi gıdalar yer almaktadır. *L. monocytogenes* açısından riskli gıdalar göz önüne alındığında, bu patojenin biyokontrolünde bakteriyofaj kullanımının gelecekteki pek çok araştırmaya konu olacağı öngörülmektedir.

2.6. Bakteriyofajlar Hakkında Genel Bilgi

Bakteriyofajların varlığına dair ipuçlarından 1800'lerin sonlarına doğru birkaç çalışmada bahsedilmesine rağmen, ne olduklarına ve ne işe yaradıklarına dair kesin bilgi ancak Frederick Twort (315) ve Felix d'Herelle'in (316) sırasıyla 1915 ve 1917'deki çalışmaları neticesinde ortaya konmuştur (317). Frederick Twort, *Vaccinia*

virüs çalışmaları esnasında elde ettiği bazı mikrokok kolonilerinin mukoid, sulu ve camsı olduğunu gözlemlemiş ve bu camsı oluşumların mikrokokları infekte eden ultra mikroskopik virüsler olabileceğinden bahsetmiştir. Twort'un bu çalışmasından bağımsız olarak iki yıl sonra Felix d'Herelle, bakterilere antagonist etki göstererek sıvı kültürlerde bakteriyi öldüren, katı besiyerlerinde ise agar yüzeyini tamamen kaplayarak üremiş bakteri tabakasını berrak zonlar oluşturarak yok eden ultravirüslerden bahsetmiş ve bunları "bakteri yiyen" anlamına gelen bakteriyofaj olarak tanımlamıştır (317, 318). d'Herelle ileriki yıllarda özellikle bakteriyofajların infeksiyöz hastalığa yakalanmış hastalarda terapötik ve/veya proflaktik ajanlar olarak kullanımını araştırmıştır. Bu bağlamda bakteriyofaj terapisi ilk defa 1919 yılında, ağır dizanteri hastası on iki yaşında bir çocuğa d'Herelle tarafından uygulanmış ve hastanın birkaç gün içinde iyileştiği gözlenmiştir. Ardından birkaç hasta daha bu şekilde iyileştirilmesine rağmen, çalışmanın hemen yayınlanmaması sebebiyle resmi olarak ilk bakteriyofaj terapisi kayıtlara 1921 yılında, stafilokokal deri hastalığının tedavisinde bakteriyofajları kullanan Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin tarafından yapılan çalışma ile geçmiştir (318). Sonraki yıllarda fajların terapisine ilişkin d'Herelle ve başka araştırmacılar tarafından çeşitli çalışmalar yapılmaya devam etmiştir (319-321). Elektron mikroskopunun 1940'lı yılların başındaki keşfinden sonra ise bakteriyofajların d'Herelle'in savunduğu gibi bakterileri infekte eden virüsler olduğu ispatlanmıştır (317).

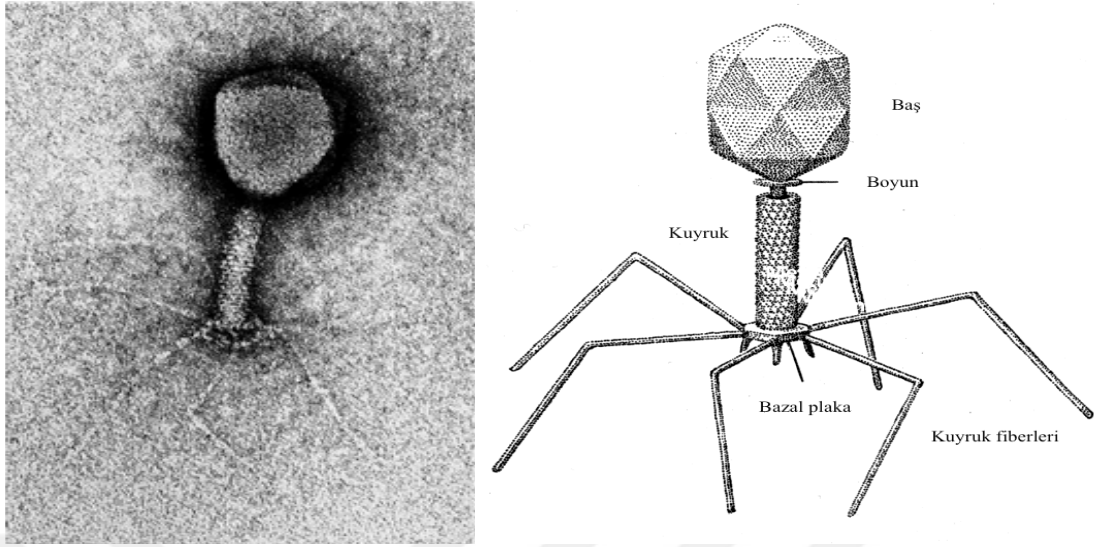
İlerleyen yıllarda, ilk olarak Fransa'da ardından ABD'de olmak üzere çeşitli ülkelerde ticari bakteriyofaj preparatları üretilmeye başlanmıştır. Ancak, faj preparatlarının etkinliği antibiyotiklerin gelişiyle birlikte sekteye uğramış ve Batı ülkelerinin çoğunda durmuştur. Bununla birlikte, eski Sovyetler Birliği'nde ve Doğu Avrupa ülkelerinde fajların tek başlarına terapötik veya antibiyotik ile birlikte kullanımı devam etmiştir. Bu ülkelerdeki birçok kurum, terapötik faj araştırmaları ve üretimi alanında aktif olarak yer almış fakat, bu çalışmaların sonuçları ülkelerin ana dillerinde yayınlandığı için batı bilim camiasında dikkati çekmemiştir (321).

Antibiyotiğin keşfedilmesiyle fajlara karşı azalan ilgi günümüzde, antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkması, yeni antibiyotiklerin keşfedilmesindeki azalma ve güçlükler nedeniyle tekrar hız kazanmaya başlamıştır. İnsanlığın "antibiyotik öncesi dönem"e tekrar girileceğine dair endişeleri, alternatif yöntemlerin geliştirilmesinde fajların sadece tedavi amacıyla değil aynı zamanda gıdalarda dekontaminasyon amacıyla (biyokontrol),

gıda ile temas eden yüzey ve ekipmanların sanitasyonunda (biyosanitasyon), tüketime hazır gıdalarda raf ömrünü uzatmak için (biyoprezervasyon) ve bitki hastalıklarının kontrolü maksadıyla kullanılmasına neden olmuştur (305, 322, 323, 324, 305).

Bakteriyofajlar çevrede son derece yaygın olarak bulunmaktadır. Konaklarının yaşadığı her türlü çevrede (toprak, akarsu, göl, kaplıca, derin denizler, lağım, dışkı) oldukça yüksek sayılara ulaşabilmektedirler (325). Yapılan çalışmaların ışığında, yeryüzündeki fajların yaklaşık 10^{32} gibi yüksek bir sayıda olduğu tahmin edilmektedir (326-328). Bakteriyofajlar sadece çevreden değil, et ve et ürünleri, işlenmiş gıdalar, fermente ürünler ve deniz mahsulleri gibi insanların tükettiği gıdalardan da elde edilmişlerdir (44, 323). Çevresel faktörler sebebiyle zarar görmedikleri müddetçe, ortamda uygun konak olmadığında dahi çok uzun yıllar infektif olma özelliklerini koruyabilmektedirler. Konak spesifik olmaları, uygun konak bulana kadar canlı kalabilmeleri ve konak bulduklarında çok hızlı bir şekilde çoğalabilmeleri ile fajlar, bakteri türleri arasındaki dinamik dengenin korunmasına da büyük katkı sağlamaktadır (325).

Tıpkı diğer infektif virüsler gibi bakteriyofajlar da zorunlu hücre içi parazitlerdir. Enerji ve protein üretebilmek için organelleri yoktur. Her faj parçacığı (virion), DNA ya da RNA'dan oluşan nükleik asit yapısındaki genomunu protein veya lipoprotein yapısındaki bir kapsit içinde bulundurmaktadır. Genellikle faj genomu, birkaç binden oluşan baz diziliminden meydana gelmektedir (325). Fajların büyük çoğunluğu pH 5,0-8,0 arasında stabildir. Fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı çeşitli düzeylerde duyarlılık gösterirler. Fajların canlılığını etkileyen faktörler arasında UV, kurutma, pH, askorbik asit, üre, deterjanlar, alkoller ve ısı inaktivasyonu gelmektedir. Pek çok faj, üreyebilmek için Ca^{+2} , Mg^{+2} ya da diğer iki bileşenli katyonlara ihtiyaç duymaktadırlar (329). T4 fajının TEM ve görüntüsü ve şematiği Şekil 2.6.1.'de gösterilmiştir (330).



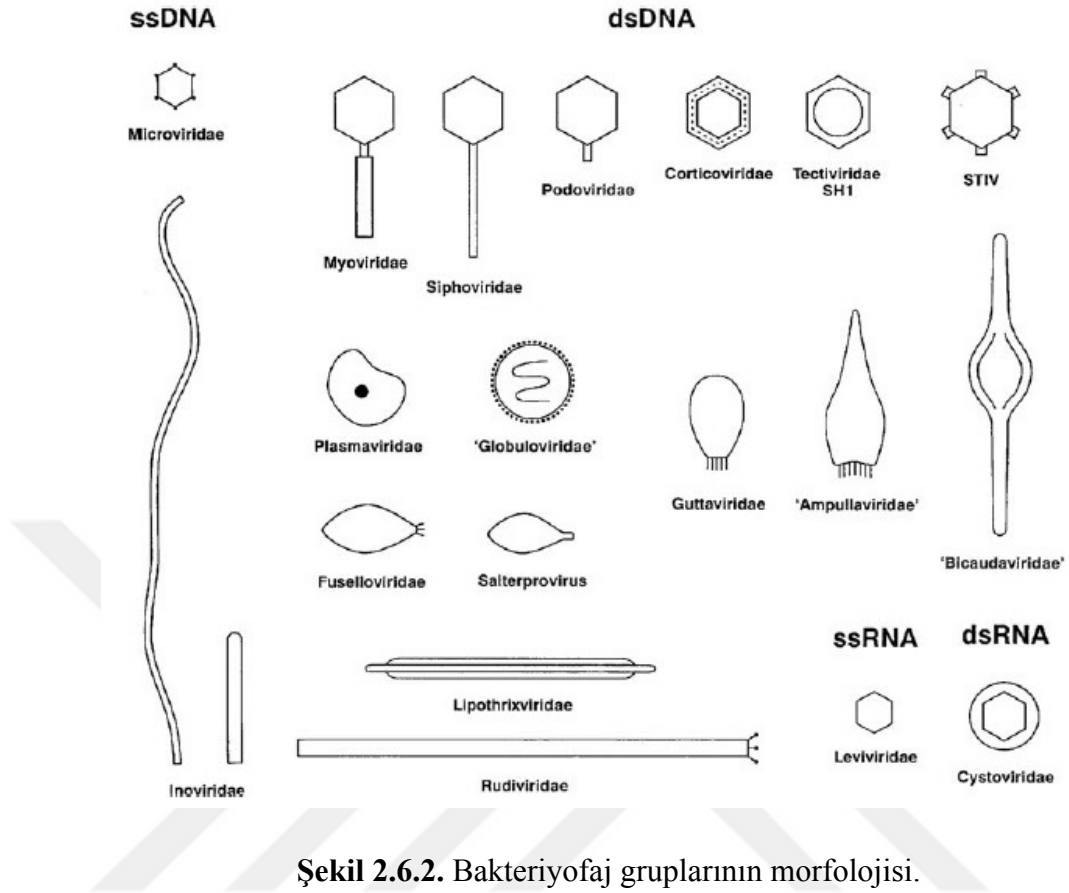
Şekil 2.6.1. Solda T4 fajı TEM görüntüsü ve sağda T4 fajı şematiği

Bakteriyofajların sınıflandırılması Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) tarafından yapılmaktadır. Şimdiye dek tanımlanan fajların % 95'i *Caudovirales* takımına aittir ve ikozahedral bir başa, çift sarmallı DNA'ya ve konağa tutunabilmek için özelleşmiş bir takım yapılardan oluşan kuyruğa sahiptir (Şekil 2.6.1). Yapılan bir çalışmada, *Caudovirales* takımına ait T7 fajının baş kısmının negatif, kuyruk kısmının ise pozitif olduğu bildirilmiştir (331). *Caudovirales* takımı, kuyruk morfolojileri baz alınarak kendi içinde *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Podoviridae* olmak üzere 3 familyaya ayrılmaktadır. *Siphoviridae* familyasındaki fajların basit, kontraktil olmayan esnek ya da sert kuyrukları mevcuttur ve *Caudovirales* takımının % 60'ını oluşturmaktadırlar. *Myoviridae*'ya ait fajların boyun, kontraktil kılıf ve merkezi tüpten oluşan oldukça gelişmiş kuyrukları bulunmaktadır. Diğer familyalara kıyasla daha büyüktürler ve takımın % 25'ini oluşturmaktadırlar. *Caudovirales* takımının % 15'ini oluşturan *Podoviridae* familyasının ise, kısa ve non-kontraktil kuyrukları bulunmaktadır. *Caudovirales* takımında yer almayan, % 4-5'lik dilimde bulunan fajların ise oldukça sınırlı sayıda üyesi bulunmaktadır (Tablo 2.6.1.) (38). Bu fajların sınıflandırmasında şekilleri, nükleik asit çeşidi, sarmal yapısı, kılıflı, lipidli, ve/veya zarflı olup olmamaları gibi özellikler göz önüne alınmıştır (Şekil 2.6.2.) (38).

Tablo 2.6.1. Bakteriyo fajların klasifikasyonu.

Şekil	Nükleik asit	Familya	Genus	Özellik	Üye
Kuyruklu	dsDNA (L)	<i>Myoviridae</i>	6	Kontraktıl kuyruk	1320
		<i>Siphoviridae</i>	7	Uzun ve nonkontraktıl kuyruk	3229
		<i>Podoviridae</i>	4	Kısa kuyruk	771
Polihedral	ssDNA (S)	<i>Microviridae</i>	4	Dikkat çekici kapsomer	40
	dsDNA (S, ÇS)	<i>Corticoviridae</i>	1	Kompleks kapsit, lipidli	3?
	dsDNA (L)	<i>Tectiviridae</i>	1	Çift kapsit, lipidli, yalancı kuyruk	19
	dsDNA (L)	SH1*		Çift kapsit, lipidli	1
	dsDNA (S)	STIV**		Konik şekilli çıkıntılı	1
	ssRNA (L)	<i>Leviviridae</i>	2	Poliovirus benzeri	39
	dsRNA (L, M)	<i>Cystoviridae</i>	1	Zarflı, lipidli	3
Filamentli	ssDNA (S)	<i>Inoviridae</i>	2	Uzun filamentli, kısa çubuklara sahip	67
	dsDNA (L)	<i>Lipothrixviridae</i>	4	Zarflı, lipidli	7
	dsDNA (L)	<i>Rudiviridae</i>	1	Sert çubuklara sahip, TMV benzeri	3
Pleomorfik	dsDNA (S, ÇS)	<i>Plasmaviridae</i>	1	Zarflı, kapsitsiz, lipidli	5
	dsDNA (S, ÇS)	<i>Fuselloviridae</i>	1	Limon şekilli, zarflı, lipidli?	11
	dsDNA (L, ÇS)	-	1**	Limon şekilli, zarflı	1
	dsDNA (S, ÇS)	<i>Guttaviridae</i>	1	Damlacık şeklinde	1
	dsDNA (L)	<i>Ampullaviridae</i> *		Şişe şeklinde, helikal NK	1
	dsDNA (S)	<i>Bicaudaviridae</i> *		İki kuyruklu, helikal NK	1
	dsDNA (L)	<i>Globuloviridae</i> *		Zarflı, küresel, lipidli, helikal NK	1

C: sirküler, L: linear, M: çok bölümlü; NK: nükleokapsit, S: çok sarmal, -: isimsiz; *: sınıflandırılmamış, **: *Salterprovirus* genusu.



Şekil 2.6.2. Bakteriyofaj gruplarının morfolojisi.

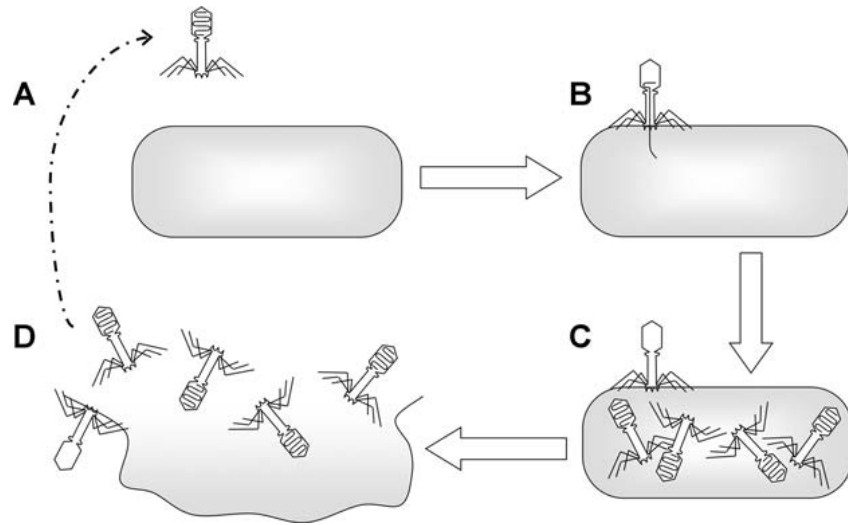
Fajlar, yaşam siklusları göz önüne alınarak virü lent (litik) ve ılımlı (lizojenik) fajlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bununla birlikte, S.T. Abedon (41) temel olarak ikiye ayrılan faj-konak ilişkilerini ayrıntılı bir şekilde inceleyerek farklı tiplerin de mevcut olduğunu bildirmiştir (Tablo 2.6.2).

Tablo 2.6.2. Faj infeksiyon tipleri.

İnfeksiyon tipi	Canlı bakteri	Canlı faj	Faj genom replikasyonu	Virion üretimi	Virion serbestleşmesi
Litik	Yok	Var	Var	Var	Lizis
Kronik	Var	Var	Var	Var	Ekstrüzyon/ tomurcuklanma
Lizojenik	Var/yok	Var	Var	Yok	Yok
Pseudolizojenik	Var/yok	Var	Yok	Yok	Yok
Kısıtlı	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Abortif	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Dirençli	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Kısmi kısıtlı	Var/yok	Var	Var/yok	Var/yok	Var/yok

Litik: Konağın, parçalanması faj tarafından tetiklenir ve faj virionlarının serbestleşmesi ile bakteri ölür. **Kronik:** Üretilen virionlar salınır ancak, konak anında parçalanmaz. **Lizojenik:** Bakteri ölmez; sadece faj, bakteri genomuna dahil olarak kendi genomunun replikasyonunu gerçekleştirir. **Pseudolizojenik:** Faj genom replikasyonu şekillenmez (veya en minimum seviyede olur) ancak faj, gelecekteki faj genom replikasyonu ve ardından da virion üretimi için hazır bekler. Diğer bir deyişle, konak bakteri hemen ölmez ve lizojeniklerin tersine faj genomu konak genomuna entegre olmaz. **Kısıtlı:** Bakterinin sergilediği bir çeşit anti-faj immünesidir. Faj kaybına neden olur, ancak bakteri canlılığını kaybetmez. **Abort:** Hem fajın hem bakterinin ölümü söz konusudur.

Virulent fajların hayat döngüsü, yeni fajlar üretebilmek adına konağı parçalamak esasına dayanmaktadır. Konak hücrenin yüzeyine tutunan virulent faj, kendi genomunu konağa aktarır. Hücre içine giren faj genomu, konağın metabolizmasını ele geçirerek yeni nesil (progeni) fajlar üretmek amacıyla konağın protein sentezlemesini tetikler. Birkaç dakika ya da saat içinde gerçekleşen bu döngü sonucunda bakteri parçalanır ve progeni fajlar açığa çıkar (325). Tipik bir litik bakteriyofaj hayat döngüsü Şekil 2.6.3.'de gösterilmiştir (332).



Şekil 2.6.3. Tipik bir litik bakteriyofajın yaşam döngüsü.

A: İnfektif faj ve konak bakteri. B: Fajın konak üzerindeki reseptörlere bağlanması (adsorpsiyon) ve genomunun konak içerisine girmesi. C: Konak hücrede, faj genomunun kopyalanması, faj yapısal proteinleri sentezlenmesi ve faj genomun paketlenmesi. D: Konak hücrenin parçalanması ve yeni nesil fajların serbest kalması. Yeni nesil faj daha sonra döngüyü yeniden başlatarak yeni bir konağı infekte edebilir.

İlımlı fajlar ise, konak hücresi ile karşılaştıklarında iki alternatif yol izleyebilmektedirler. Bazı durumlarda konağı infekte eden ılımlı fajlar, tıpkı virüent fajlar gibi hücrenin parçalanması ve yeni fajların salınmasıyla sonuçlanan litik siklusu direkt başlatabilirken, bazen de hemen çoğalmak yerine kendi genomunu konağın genomuna entegre ederek veya plazmid halini alarak profaj adını aldıkları durgun safhaya geçmektedirler (325). Profajlar, konak hücrenin strese girmesine neden olacak herhangi bir durum şekillendiğinde litik siklusa girerek konağı lize etmekte ve yeni nesil fajlar üretmektedirler (333).

Virüent fajlar genellikle konak için öldürücü olan birçok protein kodlar. Bu proteinlerden bazıları konak replikasyonunu, transkripsiyonunu veya translasyonunu bozmakta, aynı zamanda konak genomunu ve enzimlerini parçalamakta ya da konağın hücre membranını değiştirebilmektedir. Buna karşın ılımlı fajlar, konak için ölümcül olan az sayıdaki proteinlerini lizojenik süreç boyunca oldukça sıkı denetim altında tutmaktadır. Bununla birlikte, diğer fajların konak genomunda transkripsiyonunu engellemek amacıyla devamlı baskılayıcı bir protein sentezlerler. Bu protein sayesinde ılımlı fajlar, konağı diğer fajların infeksiyonundan korumaktadır (325).

İlmlı fajlar konakta, restriksiyon sistemleri geliştirmek, diğer fajların infeksiyonundan konağı korumak, çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı koyabilmek ve konakta antibiyotik dirençliliği oluşturmak gibi fenotipik ve genotipik değişiklere sebep olabilmekte, bu nedenle de konağın patojenitesinin artmasına yol açabilmektedirler (308, 325). Bu sebeplerden ötürü gıda güvenliği yaklaşımlarında ılımlı fajlar yerine, infekte ettiği konak hücrenin mutlak ölümüne sebep olan litik fajların kullanımı tercih edilmektedir (308, 323).

Fajlar, birkaç istisna dışında (tüm genusu infekte edip, öldürebilen *Listeria* faj A511 gibi) yalnızca belirli türe hatta suşa özgüdürler (334). Fajların konak spesifiteleri, duyarlı bakterilerin yüzey moleküllerini belirgin şekilde tanımlayan kuyruk ilişkili proteinler tarafından yönlendirilmektedir (308).

Fajın konak hücreyi infekte etmesi birkaç aşamadan oluşan bir süreci kapsamaktadır. İnfeksiyonun ilk aşaması (adsorbsiyon), oldukça özelleşmiş çıkıntı veya terminal fiberlerin konak yüzeyindeki proteinlere tutunmasıyla başlamaktadır. Gram negatif bakterilerde her türlü yüzey proteini fajlar için reseptör olabilirken, Gram pozitif bakterilerde daha kompleks yapıdaki peptidoglikan tabakası sebebiyle farklı potansiyel bağlanma noktaları mevcuttur. Bazı fajların bağlanması iki ayrı aşama ve iki farklı reseptörü içerir. Örneğin, T4 benzeri fajlarda bazal plakanın geri dönüşümsüz olarak ikinci bir reseptöre tutunabilmesi için, öncelikle sahip oldukları altı uzun kuyruk fiberlerinden en az üçünün primer reseptörlere bağlanması gerekmektedir (325).

Faj kuyruğunun geri dönüşümsüz olarak bağlanmasının ardından faj genomu kuyruk boyunca ilerleyerek konakçı hücreye girer (penetrasyon). Bu durum bir “enjeksiyon” mekanizması gibi görünmekle birlikte, her faj için spesifik bir takım DNA transfer mekanizmaları sayesinde şekillenmektedir (325). Yapılan bir çalışmada, T4 fajının konak hücreyi infeksiyonu esnasında genomunun geçiş hızının konjugasyondan (temas yoluyla bakteriler arası gen aktarımı) ve doğal transformasyondan (bakteri hücresine başka bir genin aktarılması) 30-40 kat daha hızlı olduğu bildirilmiş ve T4 fajlarının yüksek infeksiyon kapasitesinin, zarar görmeden hızlı bir şekilde aktarılan faj DNA’sına bağlı olabileceği belirtilmiştir (335). Penetrasyon esnasında faj genomunun iki hidrofobik bariyer ve bir peptidoglikan tabakadan geçmesi gerekmektedir. DNA’nın bu bariyerleri aşması için gereken ATP, genellikle zar potansiyeli veya enzimler sayesinde karşılanırken, bazı fajlar (T5 gibi) herhangi bir metabolik enerji kaynağına ihtiyaç

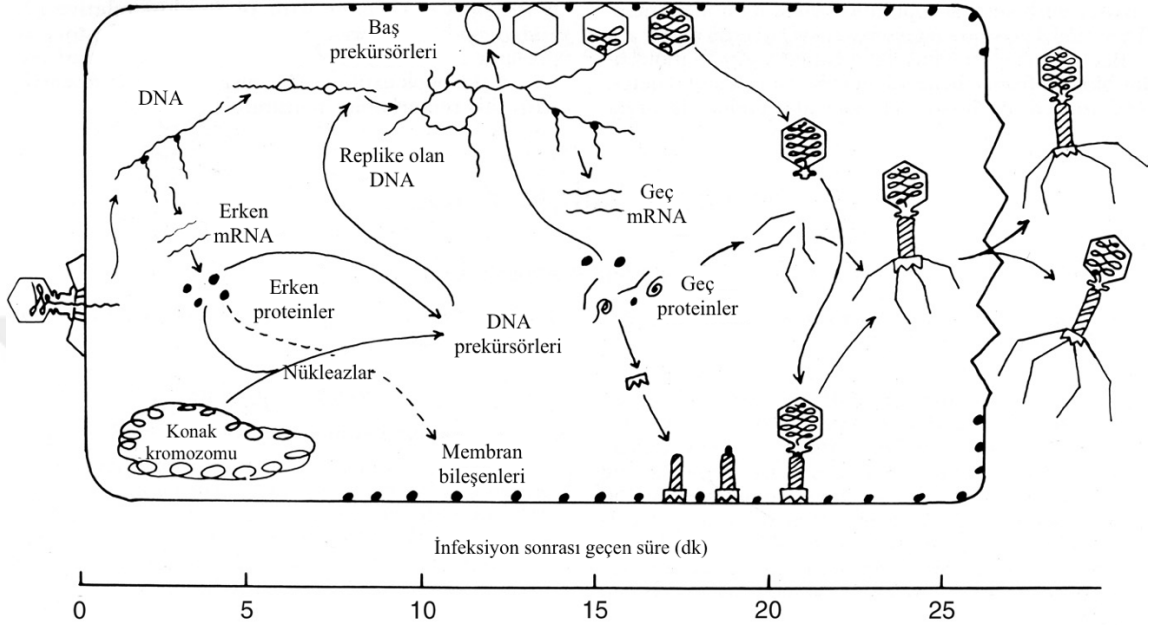
duymazlar. Parçalanmadan bariyerleri geçen faj genomu, periplazmik boşluk içinde bulunan nükleazlardan ve restriksiyon enzimlerinden korunmak için DNA'sını yapışkan uçlar vasıtasıyla hızla daireselleştirir veya lineer uçlarını korumaya alır. Ardından faj DNA'sı, bir takım faj promotorları sayesinde konakçı RNA polimerazına tanıtılır ve *erken genlerin* transkripsiyonu gerçekleşir. Bu genler sayesinde faj genomu korunur ve konak, fajın çoğalabilmesine olanak sağlayacak şekilde yeniden yapılandırılır. Sonrasında, yeni faj DNA'sının sentezlenmesinde kullanılacak ürünleri kodlayan bir dizi *ara genler*, bu genlerin ardından da, faj partikülünün şekillenmesini sağlayan proteinleri ve yeni faj DNA'sının paketlenmesini sağlayan enzimleri kodlayan bir dizi *geç genlerin* transkripsiyonu şekillenir (329, 336).

Morfogenez olarak adlandırılan bir sonraki aşamada, faj DNA'sı prokapsit olarak tanımlanan önceden yapılandırılmış ikozahedral protein kabuğunun içerisine paketlenir. DNA paketlenmesi esnasında ya da hemen öncesinde ikozahedral yapıdaki baş, DNA'nın artan hacmine uyum sağlayabilmek amacıyla büyür ve daha stabil hale gelir. Başın tepe noktasında DNA paketleme enzimlerinin bulunduğu, DNA'nın geçişi için bir kanal görevi gören ve başın kuyruğa bağlanmasında rol oynayan portal kompleks yer almaktadır. T4 fajının genetik bilgisinin % 40'dan fazlasını morfogeneze ilişkin genler olduğu bildirilmiştir (325, 337).

Litik faj döngüsünün en son aşaması konak hücre lizisidir. Zamanlaması oldukça önemli olan bu olayda eğer lizis çok hızlı bir şekilde gerçekleşirse, döngüyü etkin bir şekilde yürütebilmek için gerekli olan çok az sayıda yeni nesil faj üretilmiş olur. Lizis şekillenmesi gecikirse, bu sefer başka konak hücreleri infekte etme ve litik siklusun şekillenme şansı azalmaktadır (41). Kuyruklu fajlar, lizis için iki enzimden oluşan bir sistem kullanmaktadırlar. Bunlardan ilki, peptidoglikan matrikste yer alan ve anahtar roldeki bağları kesebilen bir enzim olan *lizin (endolizin)*'dir. Diğeri ise, *holin* adı verilen konak hücre membranında porlar açıp, lizinin uygun zamanda peptidoglikan tabakaya ulaşmasına izin veren bir enzimdir. Konak hücrenin lizisinin ne zaman olacağı genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (325).

Bahsedilen litik döngüdeki aşamaların tamamı fajın türüne göre değişmekle birlikte yaklaşık 30 dakikalık bir süreci kapsamaktadır. Buna göre adsorbsiyonun hemen akabinde şekillenen penetrasyon ve gen ekspresyonu ilk 5 dakikada, enzimlerin ve erken proteinlerin sentezlenmesi 5-10. dakikalar arasında, DNA replikasyonu 10

dakikadan sonra ve yeni nesil fajların şekillenmesi yaklaşık 15 dakika sonra gerçekleşmektedir. T4 fajının infeksiyon şematiği Şekil 2.6.4.'de gösterilmiştir (338).



Şekil 2.6.4. T4 fajının infeksiyon şematiği

Virüent fajların infeksiyonunda iki ayrı kavram daha söz konusudur. Bunlardan ilki olan “içeriden lizis (lysis from within)”, fajın konak hücrede çoğaldıktan sonra serbest kalması ile sonuçlanan normal süreçli lizistir. Diğer ise, özellikle yüksek faj titresinin olduğu infeksiyonlarda, konak hücrenin faj adsorpsiyonu sebebiyle duyarlı hale gelmesi neticesinde faj replikasyonu gerçekleşmeden konağın lize olması ile sonuçlanan “dışarıdan lizis (lysis from without)”tir (41). Yapılan çalışmalarda, endolizini bakteri hücrelerine harici olarak uyguladıklarında hücrelerin peptidoglikan tabakasını parçaladığı (339, 305) ve hücre içi ozmotik basıncın değişmesine bağlı olarak konağın dışarıdan lizis geçirerek parçalanmasına neden olduğu bildirilmiştir (340, 341). Bununla birlikte, dışarıdan lizisin gerçekleşmesinde ortamda bulunan diğer enzimler, hücre dışı ajanlar (kloroform gibi) veya başka fajların saldırısı da rol oynamaktadır (342).

Günümüzde, patojenlerle mücadele adına pek çok kontrol yöntemi uygulanmaktadır. Bununla birlikte gıdalar, tüm uygulamalara rağmen gıda zinciri boyunca farklı

aşamalarda kontamine olabilmektedir. Gıda kaynaklı patojenlerden kaynaklanan hastalıkların ve salgınların gıdalara uygulanan güvenlik konseptlerine rağmen var olması, bu kontrol yöntemlerinde yeni ve alternatif metotların aranmasına sebep olmuştur (323). Bakteriyofajlar, bu bağlamda keşfedildikleri günden bu yana gıdaların biyokontrolünde pek çok araştırmacının ilgisini çekmiş ve pek çok çalışmanın araştırma konusu olmuştur.

Bakteriyofajlar, biyolojik kontrol ajanları olarak çeşitli avantajlar sunmaktadır; (i) konak hücre duvarında bulunan reseptörler tarafından belirlenen yüksek konak spesifitesi sayesinde fajlar, diğer mikrobiyalardan ayrılmakta ve mikrobiyotada bulunan diğer bakterilere ya da starter kültür bakterilerine zarar vermemektedirler, (ii) faj konsantrasyonu düşük olduğunda bile ortamda konak bakteri var olduğu sürece çoğalarak antimikrobiyal etkinliklerinin devam ettirmektedirler, (iii) konak, hayatta kalmak için fajlara karşı savunma mekanizması geliştirse bile fajlar bu değişen konakçı sistemlere sürekli olarak adapte olabilmektedirler, (iv) sadece nükleik asit ve proteinden oluşan yapıları nedeniyle toksik etki göstermemektedirler, (v) kolay izole edilebilirler ve ucuzdurlar ancak yine de, yüksek virülent ve geniş konak spektrumuna sahip faj elde edebilmek zaman alıcı olabilmektedir, (vi) genel olarak gıda işleme sürecindeki çevresel streslere (gıda fizyokimyasal koşulları dahil) dayanıklıdırlar, (vii) yapılan çalışmalar neticesinde uzun süreli raf ömrüne sahip oldukları kanıtlanmıştır (323).

Fajlar “çiftlikten sofraya” kadar tüm gıda zinciri aşamalarında uygulanabilmektedir. Bu uygulama alanlarından bir tanesi, kesim öncesi hayvanlara faj verilmesidir. Yapılan çalışmalarda, özellikle kasaplık hayvanların gastrointestinal sistemlerinde asemptomatik olarak taşıdıkları *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* gibi önemli patojenlerle mücadele edebilmek adına oral yolla faj terapisi uygulamaları gerçekleştirilmiş ancak, gastrointestinal sistemdeki diğer partiküllere non-spesifik tutunma, mide asitliğinden etkilenme ve az sayıda fajın gastrointestinal sisteme ulaşabilmesi gibi zorluklar nedeniyle çok başarılı sonuçlar alınamamıştır (323). Bununla birlikte, enkapsüle edilen faj preparatlarının mide asitliğinden etkilenmeden bağırsaklara ulaştığı ve patojen seviyesinde istenen düşüşlerin elde edildiği bildirilmektedir (343). Yine de, hayvanlara uygulanan faj terapisi ile gıdalardaki patojen eliminasyonunun kesin olarak sağlanması mümkün olamamaktadır (344).

Hayvansal gıda kökenli patojenlerin biyokontrolünde fajların gıdalara uygulanması ile, canlı hayvanlarda var olan dinamiklerden fajların etkilenmediği dolayısıyla da gıdalarda fajların etkinliğinin, canlı hayvan uygulamalarına göre daha üstün olduğu bildirilmiştir (344). Bununla birlikte, faj uygulanacak gıdanın çeşidinin ve yapısının mutlaka göz önünde bulundurularak, gıdalarda biyokontrol ajanı olarak kullanılacak fajların; (i) litik olması; (ii) yüksek konak spesifitesinin olması; (iii) tüm genom dizilerinin bilinmesi; (iv) patojenite ile ilişkili veya alerjenik proteinleri kodlayan genlere sahip olmaması; (v) oral toksisiteye sebep olmaması; (vi) faj preparatlarının yasal onay alınarak kullanılması; (vii) raf ömrü süresince ve gıdaya uygulama süresince stabil kalabilmesi; (viii) ticari preparatların ürüne göre kolay ölçeklendirilebilir olması gibi özellikleri barındırması gerekmektedir. Henüz endüstri açısından standardize edilmiş bir ticari faj üretim prosedürü bulunmamaktadır (309).

Son yıllarda ABD ve AB’de ticari olarak kullanıma sunulan faj preparatları mevcuttur. Bunlardan başlıcaları; ListShield™, PhageGuard Listex, EcoShield™, ShigaShield™, Salmonalex™, PhageGuard S. ve SalmoFresh™’dir (310, 345, 346). Her biri GRAS listesinde yer alan ve bir veya birden fazla faj içeren bu preparatlar gıdalara püskürtme, yıkama, daldırma, buhar şeklinde gıdanın üzerini kaplama ya da üretim aşamasında gıdanın içine katma şeklinde uygulanabilmektedir. Bunun yanı sıra, bazı preparatların gıda temas yüzeylerine ve ekipmanlara uygulanması da mümkündür. Carlton ve ark. (347) tarafından, bugün ticari adı PhageGuard Listex (*Listeria* faj P100) olan preparatın oral toksisite çalışmaları yapılmış ve P100’ün ratlarda hiçbir histolojik değişikliğe veya mortaliteye sebep olmadığı bildirilmiştir. Bruttin ve Brussow (348) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, *E. coli* T4 fajı insanlara 30 gün boyunca oral yolla verilmiş ve herhangi bir toksik etkiye rastlanmadığı rapor edilmiştir. Ancak, henüz fajların insan sağlığına olan potansiyel zararlı etkilerinin uzun vadede araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir.

Gıda kaynaklı patojenlerin bakteriyofajlarla inaktivasyonunun incelendiği pek çok çalışma mevcuttur. Bu kapsamda çalışılan bakteriler arasında; *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Coronobacter sakazakii* ve *Brochothrix* bulunmaktadır. Çalışılan gıda modelleri ise, et ve et ürünlerinden sebze-meyveye, süt ve süt ürünlerinden bebek mamasına kadar değişen geniş bir gıda yelpazesini kapsamaktadır (323, 349). Bu çalışmalarda, fajların

hedef bakteri popülasyonunda anlamlı düşüşler yaptığı göze çarpmaktadır. Bununla birlikte fajların etkinliği, uygulandıkları farklı gıda modellerinde ve farklı muhafaza sıcaklıklarında değişiklik göstermektedir. Düşük a_w değeri, düşük pH, yüksek tuz konsantrasyonu, fajın bakteriye adezyonunu güçleştiren gıda matriksi gibi gıdaların kendine has özellikleri faj uygulamalarında belirli bir standart oluşturulmasını güçleştirmektedir.

2.7. *Listeria monocytogenes* Biyokontrolünde Virüent Bakteriyofaj Kullanımı

Gıdalarda patojen bakterilerin inhibisyonuna yönelik en sık çalışılan bakterilerden biri *L. monocytogenes*'tir. Ubikuter özelliği, çevresel faktörlere karşı dirençliliği, biyofilm oluşturması gibi faktörler gıdaların üretim hattı boyunca her aşamada *L. monocytogenes* ile kontamine olabilmesine neden olmakta ve kontrolünü güçleştirmektedir. Çeşitli metotlar bulunmakla birlikte, özellikle son yıllarda etken ile mücadelede bakteriyofajların kullanımı alternatif bir kontrol yöntemi olarak ön plana çıkmaktadır. Bugün dünyada ticari olarak satışa sunulan iki adet *L. monocytogenes*'e litik etkili faj preparatı bulunmaktadır. Bunlardan biri olan ve altı adet faj kombinasyonundan oluşan ListShield™, 2006 yılında FDA tarafından onaylanıp satışına izin verilen ilk faj preparatı olarak kayıtlara geçmiştir (350). Almanya'daki bir süt işletmesinin atık sularından elde edilen P100 fajı ise, PhageGuard Listex (önceki adı Listex™ P100) adı ile piyasada yer alan diğer bir *L. monocytogenes*'e etkili fajdır. P100, 2009 yılında EFSA tarafından da uygun bulunmuş ve AB ülkelerinde de kullanımı serbest hale gelmiştir (44, 351). Türkiye'de henüz gıdalarda kullanım izni almış bir listeriyofaj preparatı bulunmamaktadır.

Gıdalarda *L. monocytogenes*'in fajlarla inhibisyonuna ilişkin ilk çalışma, 2002 yılında Dykes ve Moorhead (313) tarafından yapılmıştır. Listeriyofaj LH7 ve nisin tek başına veya kombine olarak sıvı besi yeri (7°C'de ve 30°C'de) ile vakum paketli çiğ ette (4°C'de, 4 hafta) etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada, tek başına faj kullanımı sıvı besi yerinde etkili olmamasına rağmen, faj-nisin kombinasyonunun 28 günlük inkübasyon sonunda çiğ ette bakteri sayısında yaklaşık 7 log'luk düşüş sağladığı bildirilmiştir. Çalışmada sonuç olarak, nisin ve/veya faj etkileşimlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

Leverentz ve ark. (314)'nın 2003 yılında yayınladıkları bir çalışmada, iki fajdan oluşan bir faj kokteyli 10^5 kob/ml düzeyde kontamine edilmiş kavun ve elma dilimleri üzerine sprey veya pipetle dökme şeklinde uygulanmıştır. Uygulamanın *L. monocytogenes* sayısında kavun dilimlerinde 2,0 - 4,6 log, elma dilimlerinde ise 0,4 log'luk bir düşüş sağladığı bildirilmiştir. Faj kokteyli nisin ile kombine edilip uygulandığında ise kavun ve elma dilimlerinde sırasıyla 1,1 ve 1,9 log daha fazla redüksiyon sağladığı rapor edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, sprey uygulamasının daha etkili olduğunu ve bakteri konsantrasyonunun düşük olduğu kontaminasyonlarda faj etkinliğinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Sonraki yıl aynı araştırmacıların yayınladığı bir başka çalışmada ise, kavun dilimlerine *L. monocytogenes* ile kontaminasyondan önce ve sonra sprey ile faj kokteyli uygulanmış ve en etkin uygulama zamanının kontaminasyondan bir ve yarım saat önce ile kontaminasyon esnasında olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, etkili bir redüksiyon için yüksek faj titresinin gerekli olduğunu ve en yüksek bakteri redüksiyonunun 10^8 pob/ml düzeyinde faj uygulandığında elde ettiklerini rapor etmişlerdir (10°C'de 7 günlük muhafaza sonucu 6,8 log redüksiyon) (352).

Carlton ve ark. (44)'nin 2005 yılında, geniş konak dağılımına sahip olan virüsent P100 fajının kapsamlı bir faj karakterizasyonunu ve biyoinformatik analizini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada araştırmacılar, P100 fajının tüm gen sekansını belirlemiş ve sentezlenen proteinlerin *Listeria* veya başka bir bakteri türünde var olan toksik, patojenik, allerjen ya da antibiyotik dirençliliği ile ilgili hiçbir gen ile homoloji göstermediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, ratlarda akut oral toksisite deneyi yapılmış ve fajın herhangi bir toksik etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır. P100 fajı ilerleyen yıllarda pek çok biyokontrol çalışmasının konusu olmuştur (353-361).

Listeria monocytogenes ile sıklıkla kontamine olan hazır gıdalar üzerine Guenther ve ark. (354)'nin yaptığı kapsamlı bir çalışmada, geniş konak spesifitesine sahip iki listeriyofajın (A511 ve P100), *L. monocytogenes* Scott A (4/b serotipi) ve WSLC 1001 (1/2c serotipi) üzerindeki etkinlikleri araştırılmıştır. Gıdalar, 10^3 kob/ml(g) olacak şekilde bakteri ile kontamine edilmiş ve 10^6 - 10^8 pob/ml(g) düzeylerinde faj eklenerek farklı MOI'ler (Multiplicity of Infection- İnfeksiyon Çokluğu) elde edilmiştir. Altı gün boyunca 6°C'de inkubasyonu takiben yapılan sayımlarda, sıvı bir matrikse sahip olan sütlü çikolata ve salamura mozarella peynirinde bakteri seviyesinin çok hızlı bir şekilde tespit sınırının altına düştüğü kaydedilmiştir. Sosis, dilimlenmiş hindi eti, somon füme,

karışık deniz ürünleri (karides, kalamar ve midye), dilim lahana ve marul yaprakları gibi katı gıdalarda ise fajların bakteriyi 5 log kadar inhibe ettiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, yüksek MOI dozlarının (10^8 pob/g(ml)) bakteri üzerinde çok daha etkili olduğu ve birbiri ile yakın ilişkili P100 ve A511 fajlarının *Listeria*'ya karşı benzer etkinlik gösterdiği sonucuna varmışlardır.

P100 fajının etkinliğinin taze yayın balıklarında araştırıldığı bir çalışmada Soni ve ark. (362), yüzeylerini *L. monocytogenes* 1/2a (EGD) ve 4b (Scott A) serotipleri ile 10^3 log düzeyinde kontamine ettikleri taze yayın balığı filetolarını 4°C , 10°C ve 22°C 'lerde inkübasyona bırakmışlardır. 10^7 , 10^5 ve 10^3 pob/g düzeylerinde uyguladıkları faj muamelesinin ardından 15. dk, 30. dk., 1. ve 2. saatler ile 1., 4., 7. ve 10. günlerde bakteri sayımlarını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, oda sıcaklığında muhafaza edilen numunelerde, belirtilen faj MOI'lerine göre sırasıyla 1,6, 0,4 ve 0 log olacak şekilde düşüşler kaydedilmiş ancak, faj ve süre açısından istatistiki olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bakteri sayısındaki redüksiyonların ise 10 günlük raf ömrü süresince 4°C 'de ve 10°C 'de stabil kaldığı bildirilmiştir. Araştırmacıların aynı yıl yayınladıkları bir başka çalışmada (363), yine P100 fajının etkinliği bu sefer çiğ somon filetolarında incelenmiştir. Aynı serotiplerle yapılan çalışmada, filetolar 10^2 , 10^3 ve 10^4 kob/g olacak şekilde farklı düzeylerde kontamine edilmiş ve üzerlerine 10^8 pob/g ticari P100 fajı uygulanarak 30. dakika ile 2. saatte bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. 4°C muhafaza edilen numunelerde bakteri konsantrasyonuna göre sırayla 1,8, 2,5 ve 3,0 log'luk bir düşüş kaydedilmiş, 22°C 'deki inkübasyonda da benzer düşüşler elde edilmiştir. Faj titresinin etkinliğinin de araştırıldığı çalışmada araştırmacılar, 10^4 kob/g düzeyde kontamine edilen filetolar için en yüksek redüksiyon değerine 10^8 pob/g faj uygulandığında ulaştıklarını bildirmişlerdir Yapılan bir başka çalışmada ise, tüketime hazır soğuk tütsülenmiş somon balıklarında P100 fajı, nisin ve laurik arginatın *L. monocytogenes* üzerindeki inhibitörük etkisi incelenmiş ve $3,5$ log kob/cm² bakteri ile kontamine edilen örneklerde nisin + faj P100 ile nisin + laurik arginat kombinasyonlarının 4°C 'de 24 saatte bakteri sayısını tespit sınırının altına düşürdüğü, P100 + laurik arginat kombinasyonunun ise 2 log kadar bir redüksiyon sağladığı bildirilmiştir (359).

A511 fajının etkinliğinin olgunlaşmış yumuşak peynirler olan Camembert tipi beyaz peynirlerde ve Limburger tipi kırmızı yüzeyli peynirlerde araştırıldığı bir çalışmada,

peynirler henüz olgunlaşma aşamasında iken yüzeyleri Scott A (4b serotipi) ya da CNL 103/2005 (1/2a serotipi) suşları ile kontamine edilmiştir. 10^3 kob/cm² Scott A suşu ile kontamine edilmiş ve üzerine 10^8 pob/cm² faj eklenmiş Camembert peynirinde 21 günlük olgunlaşma süresinin sonunda bakteri sayısında 2,5 log'luk, Limburger tipi peynirde ise 3,0 log'luk bir düşüş kaydedildiği bildirilmiştir. Tekrarlanan faj dozlarının bakteri redüksiyonunu arttırmadığı ancak, tek seferde yüksek MOI'de (1×10^9 pob/cm²) faj uygulamasının daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca düşük düzeylerdeki kontaminasyonlarda (10^1 - 10^2 kob/cm²) bakterinin tespit sınırının altında kaldığı, dolayısıyla A511 fajının kontrol grubu ile kıyaslandığında 6 log kadar bir düşüşe sebep olduğu bildirilmiştir (364). Yumuşak peynirlerde yapılan bir başka çalışmada ise Silva ve ark. (358), P100 fajının *L. monocytogenes* 1/2a ve 4/b serotiplerindeki inhibitorik etkisini araştırmışlardır. 10^5 kob/g bakteri miksi, Brezilya'ya özgü Minas Frescal ve Coalho yumuşak peynirleri yüzeyine inokule edilmiş ve 10^7 pob/g faj süspansiyonu eklenmiştir. Çalışmada, 10°C'de 7 gün inkübe edilen peynirlerden yapılan ekimlerde Minas Frescal ve Coalho peynirlerinde bakteri sayısında sırasıyla 1,0 log ve 0,8 log'luk bir düşüş olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, faj eklendikten 30 dakika sonra yapılan ekimlerde sırasıyla 2,3 log ve 2,1 log'luk bir redüksiyon kaydedilmiştir.

Bigot ve ark. (365), koyun dışkılarından izole ettikleri morfolojik yönden A511 fajına benzeyen bir listeriyofajın etkinliğini tüketime hazır tavuk göğsünde araştırmışlardır. Araştırmacılar, 2 x 2 cm ebatlarında kestikleri tavuk göğüslerini, 10^5 kob/cm² düzeyde bakteri olacak şekilde kontamine etmişler ve 7°C'de 10 dakika bakteri tutunması için süre tanıdıktan sonra 10^7 pob/cm² faj ekleyerek 30°C'de inkübasyona kaldırmışlardır. Çalışmada, listeriyofajın 7 saate kadar broth kültürüne kıyasla tavuk göğsünde bakteriyi yaklaşık iki katı fazla inhibe ettiği ancak, 24 saat sonrasında üremenin yeniden başladığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, gıda yüzeylerinde hedef patojenlerin belirgin şekilde inaktive edilmesini sağlamak için birim alan başına yüksek konsantrasyonda faj uygulanmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir.

Oliveira ve ark. (366) kavun, armut ve elmanın hem dilimlerinde hem de sularında P100 fajının 10°C'de etkinliğini değerlendirmişlerdir. *Listeria monocytogenes*'in meyve dilimlerinin kontrol grubunda oldukça iyi ürediği gözlenirken, meyve sularında kavunda iyi ürediği, armutta canlı kalabildiği, elmada ise sayısının giderek düştüğü bildirilmiştir. Kontrol grubu ile paralel olarak faj grubunda ise, 8 günlük inkübasyonun ardından

sırasıyla kavun ve armutta daha etkili sonuçlar alınırken (kavun diliminde 1,5 log, kavun suyunda 8,0 log; armut diliminde 1,0 log, armut suyunda 2,1 log), elmada etkinin gözlenemediği belirtilmiştir.

P100 fajının tek başına ve/veya potasyum laktat ve sodyum diasetat ile birlikte, tüketime hazır dana rosto ve pişmiş hindi etlerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yüzeyleri 10^3 kob/cm² *L. monocytogenes* ile kontamine edilen gıdalar, 10^7 pob/cm² faj ile muamele edilmiş ve ardından 4°C ve 10°C’de inkübe edilmiştir. Tek başına P100 fajı uygulanan pişmiş hindi eti ve dana rostoda, 4°C’de raf ömrü boyunca (28 gün) *L. monocytogenes* sayısında sırasıyla 2,1 log ve 1,7 log’luk, 10°C’de ise sırasıyla 1,5 log ve 1,7 log’luk düşüş elde edildiği bildirilmiştir. Kimyasal antimikrobiyal içeren faj grubunda ise, 4°C ve 10°C’de hindi eti için sırasıyla 4,5 log ve 7,5 log, dana rosto için ise sırasıyla 1,2 log ve 7,2 log’luk bir *L. monocytogenes* redüksiyonu kaydedilmiştir. Bununla birlikte, 4°C’de muhafaza edilen biftek ve pişmiş hindi etlerinde faj ile kimyasal antimikrobiyaller birlikte kullanıldığında, belirtilen raf ömrü süresince *L. monocytogenes* sayısında 2 log’dan fazla artış gözlenmediği bildirilmiştir. Araştırmacılar, faj ve kimyasal antimikrobiyal maddelerin birlikte kullanılması ile bakteri inhibisyonunda daha başarılı sonuçlar alınacağını belirtmişlerdir (357).

Gutierrez ve ark. (361), kurutulmuş kürlenmiş domuz jambonlarında ListShield™ ve Listex™ P100 (PhageGuard Listex) fajlarının etkinliğini kıyaslamışlardır. Çalışmada, deneysel olarak 10^5 , 10^4 ve 10^3 kob/cm² *L. monocytogenes* ile kontamine edilen örnekler, ardından üretici firmanın önerileri doğrultusunda 10^7 pob/cm² ListShield™ ve 10^9 pob/cm² Listex™ P100 ile muamele edilmiştir. 4°C ve 12°C’de 14 gün süreyle inkübe edilen örneklerin bakteri sayımları neticesinde, 4°C’de inkübe edilenlerde kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyelerde bakteri belirlenmiştir. 12°C’de inkübe edilenlerde ise Listex™ P100 preparatının bakteri sayısını tespit sınırının altına düşürdüğü (< 10 kob/cm²), ListShield™’in ise P100’e kıyasla daha az etkin olmakla birlikte, 10^5 ve 10^4 kob/cm² ile kontamine edilen örneklerde 3,5 log’luk bir düşüş sağladığı bildirilmiştir. Figueiredo ve ark. (360) yaptıkları bir çalışmada, tüketime hazır domuz eti dilimlerinde P100 fajı, nisin ve sodyum laktatın etkinliği tek tek ve kombine halde değerlendirilmiş ve antimikrobiyaller ile kıyaslandığında en etkili sonucun P100 fajı ile alındığı bildirilmiştir. Tüketime hazır domuz eti dilimlerinde yapılan bir başka çalışmada ise, P100 fajı hem tek başına hem de *Lactobacillus sakei* TH1 (koruyucu bir

kültür olarak etkinliği daha önce çalışılmış) ile kombinasyonunun *L. monocytogenes* üzerinde etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar, tek başına fajın uygulandığı grupta 10°C’de 28 günlük inkübasyon sonunda sadece 1 log’luk bir redksyon gözlendiğini, faj ve *L. sakei*’nin birlikte kullanıldığı grupta ise diğer gruba kıyasla 2 log daha fazla bir düşüş kaydedildiğini bildirmişlerdir (355).

Yukarıda belirtilen çalışmalarda da anlaşılacağı gibi, biyokontrol çalışmalarında kırmızı et, tavuk göğsü, balık, peynir, meyve gibi gıda modelleri kullanılmış olup, piliç but gıda modeline ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca çalışmaların büyük bölümünün ticari faj preparatlarıyla yapılmış olması dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında, yeni izole edilen bakteriyofajlardan elde edilen bir faj kokteylinin daha önce çalışılmamış bir gıda modelinde biyokontrolünün araştırılması özgünlüğü arttırmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada bir yıllık sürede, iki farklı kanatlı mezbahasından toplam 120 piliç boyun derisi ve toplam 60 mezbaha atık suyu örneği toplandı. Örnek toplama işlemi Şubat 2016-Ocak 2017 tarihleri arasında, toplam 12 aylık süreçte gerçekleştirildi. Örnekleme dönemleri, mevsimsel farklılıkları ortaya koyabilmek amacıyla Mart-Mayıs, Haziran-Ağustos, Eylül-Kasım ve Aralık-Şubat aylarını içeren dört farklı döneme ayrılarak, her dönemde 30 piliç boyun derisi ve 15 mezbaha atık suyu örneği toplandı. Boyun derisi örnekleri, mezbahada kesim aşamasında iç organları çıkarılan piliçlerden paketlenmeden önce steril makas ve pens yardımı ile steril numune poşetlerine alınarak, soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve *L. monocytogenes* izolasyonu amacıyla mikrobiyolojik analize alındı. Mezbaha atık su numuneleri ise steril numune kaplarına 50 ml alınarak, soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve *L. monocytogenes*'e litik etkili bakteriyofaj yönünden aynı gün içerisinde analiz edildi.

3.1.1. Ön Çalışma

Bu tez çalışmasına temel teşkil etmesi ve olası aksaklıkların öngörülebilmesi amacıyla bir ön çalışma yapıldı. Bu kapsamda, 2015 yılının Temmuz ve Aralık ayları arasında iki farklı kanatlı mezbahasına yapılan ziyaretlerde toplam 50 piliç boyun derisi ile 25 mezbaha atık su örneği toplandı ve analiz edildi. Ön çalışma neticesinde yöntem optimizasyonu yapıldı ve her iki etkenin de izole edilebildiği ortaya kondu.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Kültürleri

Çalışmada, *L. monocytogenes*'in izolasyon ve identifikasyonunda CAMP testte *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Rhodococcus equi* ATCC 33701 referans suşları kullanıldı.

Listeriyofajların konak spesifitelerinin ve litik etki spektrumlarının (bakteriyofaj duyarlılık profili) belirlenmesinde;

- i) Bu tez çalışmasını destekleyen TÜBİTAK 114R104 no'lu projeden izole edilen sığır ve koyun karkaslarına ait 13 *L. monocytogenes* izolatu,
- ii) Bu çalışmada piliç boyun derisi örneklerinden izole edilen 31 *L. monocytogenes* izolatu,
- iii) Ayaz ve Erol (367)'un daha önceki bir çalışmasında hindi et ve/veya kıymasından izole ettiği 32 *L. monocytogenes* izolatu (n:13 serotip 1/2a, n:3 serotip 1/2b, n:3 serotip 1/2c ve n:13 serotip 4b),
- iv) *L. monocytogenes* ATCC 19111 (serotip 1/2a), N7155 (serotip 1/2b), ATCC 7644 (serotip 1/2c), N7143 (serotip 3a), NCTC 5214 (serotip 4a), RSKK 475 (serotip 4b) ve RSKK 476 (serotip 4c) olmak üzere 7 *L. monocytogenes* referans suşu,
- v) Ayrıca *E. coli* O157:H7 ATCC 12900, *E. faecium* C68, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *A. hydrophila* ATCC 607920, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *R. equi* ATCC 33701, *C. perfringens* ATCC 13124 ve *S. aureus* ATCC 25923 referans suşları kullanıldı.

3.1.3. *L. monocytogenes*'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasallar

Half Fraser Broth

Fraser Broth (Oxoid CM0895, Hampshire, İngiltere)

Fraser Selective Supplement (Oxoid SR0156E)

Hazırlanışı

Selektif ön zenginleştirme aşamasında kullanılmak üzere, hazır besiyerinden 28,7 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü ve pH değeri $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra üzerine 5 ml etanol ve steril distile su karışımı (1/1) ile süspansiyon edilmiş Fraser Selective Supplement'ten 2,5 ml eklendi.

Dynabeads anti-*Listeria* (Life Technologies, 71006, Oslo, Norveç)

Hazırlanışı

IMS tekniğinde kullanılmak üzere, 5 ml ve 250 testlik olarak hazırlanmış ticari preparat direkt olarak kullanıldı.

Phosphate Buffered Saline – Tween 20 (Amresco, M245-10.4G-5PK, Ohio, ABD)

Bileşimi

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Tween 20	% 0,05 w/v
pH	7.4

Hazırlanışı

IMS tekniğinde kullanılmak üzere, 1 paket hazır PBS 1 lt distile suda çözündürüldü ve 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra kullanılmak üzere 4°C 'de muhafaza edildi.

Modifiye Oxford Agar (MOX)

Listeria Selective Agar (Oxford Formulation) (Oxoid CM0856)

Modified *Listeria* Selective Enrichment Supplement (Oxoid SR0213E)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 27,75 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7,0 \pm 0,2'ye ayarlandı. Mikrodalgada kaynatılarak eritildi ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C'ye soğutulduktan sonra üzerine 2 ml steril distile su ile süspanse edilmiş 1 vial *Listeria* Selective Supplement eklendi. Besi yeri steril petrilere dökülerek 4°C'de muhafaza edildi.

Chromogenic Listeria Agar (ISO) Base

Chromogenic Listeria Agar (ISO) Base (Oxoid CM1084)

OCLA (ISO) Selective Supplement (Oxoid SR0226E)

OCLA (ISO) Differential Supplement (Oxoid SR0244E)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 34,5 g tartılarak 480 ml distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7,0 \pm 0,2'ye ayarlandı. Mikrodalgada kaynatılarak eritildi ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C'ye soğutulduktan sonra üzerine 2 ml steril distile su ile süspanse edilmiş 1 vial OCLA (ISO) Selective Supplement ve 1 vial OCLA (ISO) Differential Supplement eklendi. Besi yeri steril petrilere dökülerek 4°C'de muhafaza edildi.

Tryptic Soy Yeast Extract Agar (TSA-YE)

Tryptic Soy Agar (Oxoid CM0131)

Yeast extract (Oxoid LP0021)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 40 g ve üzerine 6 g yeast extract tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7,3 \pm 0,2'ye ayarlandı. Mikrodalgada kaynatılarak eritildi ve

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Besi yeri steril petrilere dökülerek hazırlandı ve 4°C’de muhafaza edildi.

Tryptone Soya Yeast Extract Broth (TSB-YE)

Tryptone Soya Broth (Oxoid CM0129)

Yeast extract (Oxoid LP0021)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 30 g ve üzerine 6 g yeast extract tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve pH değeri $7,3 \pm 0,2$ ’ye ayarlandı. Cam tüplere 10’ar ml paylaştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve 4°C’de muhafaza edildi.

Sulphate Indol Motility Medium (SIM) (Merck 105470)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 30 g tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve pH değeri $7,3 \pm 0,2$ ’ye ayarlandı. Su banyosunda kaynatılarak eritildi. Cam tüplere 10’ar ml paylaştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve 4°C’de muhafaza edildi.

Kanlı Agar

Blood Agar Base (Oxoid CM0055)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 40 g tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve pH değeri $7,3 \pm 0,2$ ’ye ayarlandı. Su banyosunda kaynatılarak eritildi ve 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C’ye soğutulduktan sonra üzerine 70

ml defibrine koyun kanı eklenerek % 7'lik olarak hazırlandı. Besi yeri steril petrilere dökülerek 4°C'de muhafaza edildi.

Nitrate Broth (NB) (Sigma-Aldrich, 72548, Taufkirchen, Almanya)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 16,5 g tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve pH değeri $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Cam tüplere 5'er ml paylaştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve 4°C'de muhafaza edildi.

Griess Ilosvay A Solüsyonu

Bileşimi

Sülfanilik asit (Merck 100686)	1 g
Asetik asit (5 N) (Merck 100056)	100 ml

Griess Ilosvay B Solüsyonu

Bileşimi

α - naftilamin (Merck 822291)	1 g
Asetik asit (5 N) (Merck 100056)	100 ml

Hazırlanışı

Sülfanilik asitten 1 g tartılarak 5N'lik 100 ml asetik asitte çözündürülerek Griess Ilosvay A Solüsyonu hazırlandı. α - naftilaminden 1 g tartılarak 5N'lik 100 ml asetik asitte çözündürülerek Griess Ilosvay B Solüsyonu hazırlandı.

Purple Broth Base (PBB)

Bileşimi

Gram/Litre

Proteose Peptone (Oxoid LP0085)	10
---------------------------------	----

Peptone from Meat (Merck 107214)	1
Sodium Chloride (Merck 106404)	5
Bromocresol Purple (BDH 20014)	0,02

Hazırlanışı

Kimyasal maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak 1 lt distile suda çözüldürüldü. Cam tüplere 9'ar ml paylaştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve 4°C'de muhafaza edildi.

Şeker Solusyonları

Ramnoz Solüsyonu

Bileşimi

L-Rhamnose (Merck 104736) 5 g

Ksiloz Solüsyonu

Bileşimi

D-Xylose (Merck 108689) 5 g

Mannitol Solüsyonu

Bileşimi

Mannitol (Merck 105982) 5 g

Hazırlanışı

Şekerlerden 5'er g tartılarak distile suyla % 5'lik olarak hazırlandı. Solusyonlar 0,20 µm'lik milipor filtrelerden (Corning Incorporated, Germany) geçirilerek steril edildi ve steril şişelerde 4°C'de muhafaza edildi.

Oksidaz Test

Bactident Oxidase (Merck 113300)

Katalaz Test

Hydrogen Peroxide (H₂O₂) (Merck 108597)

Hazırlanışı

Ticari % 30'luk hidrojen preoksitten 2 ml, 27 ml distile suyla karıştırılarak % 3'lük H₂O₂ solüsyonu hazırlandı.

Gram Boyama Seti (Gül-Ka Kimya, Ankara, Türkiye)

Kristal Violet	250 ml
Gram iyot solüsyonu	250 ml
Sulu Fucin solüsyonu	250 ml
Alkol (%70)	250 ml

3.1.4. *L. monocytogenes* İzolatlarının PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar**Chelex-100 (Sigma, 108K0138, St. Louis, MO, ABD)****Bileşimi**

Chelex-100 sodium form - toz

Hazırlanışı

Chelex-100'den 5 g tartılarak 100 ml distile suya katıldı. İçerisine manyetik balık konarak bir süre karıştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Sterilizasyonun ardından içinde manyetik balık bulunur halde 4°C’de muhafaza edildi. Kullanım esnasında, manyetik balık sayesinde tekrar karıştırılarak chelex tanelerinin pipete çekilmesi sağlandı.

Proteinase K (Amresco, 0706, ABD)

Bileşimi

Proteinase K solüsyonu - liyofilize

Hazırlanışı

Steril bir eppendorf tüp içerisinde liyofilize proteinaz K’ dan 20 mg tartıldı ve 1 ml steril distile suda çözdürülerek stok solüsyon halinde -20°C’de muhafaza edildi.

Taq DNA Polymerase Seti (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Canada)

Bileşimi

Taq DNA polymerase	500 U (5 U/μl)
PCR Buffer with Mg ²⁺	10 x
MgSO ₄	25 mM

dNTP Seti (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Canada)

Bileşimi

dATP	100 mM
dCTP	100 mM
dGTP	100 mM
dTTP	100 mM

Hazırlanışı

Üretici firmadan liyofilize halde gelen dNTP'ler sulandırıldı ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda hazırlanarak eşit miktarlarda karıştırılarak kullanıldı.

Gene Ruler Seti (GeneAll-Genesta, Songpa-gu, Kore)

Bileşimi

DNA Ladder Plus with x5 100bp

Loading dye (GA-010)

Konvansiyonel PCR Primerleri (Oligomer Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye)

Gen Primer sekansı (5'-3')

HlyA PCRGO: 5' GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG 3'

PCRDO: 5' GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC 3' (388 bp)

Hazırlanışı

Bohnert ve ark. (368) tarafından bildirilen iki primer HPLC saflıkta sentezletilmiş ve liyofilize olarak temin edilen primerler üretici firmanın önerdiği miktarlarda 100 mM konsantrasyonda steril ultra saf su ile sulandırıldı.

Multipleks PCR Primerleri (Oligomer Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye)

Gen Primer sekansı (5'-3')

L. monocytogenes o0737: F: AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC

R: ACG ATT TCT GCT TGC CAT TC (691 bp)

L. monocytogenes o1118: F: AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA

R: CGG CTT GTT CGG CAT ACT TA (906 bp)

ORF2819:	F: AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT
	R: CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG (471 bp)
ORF2110:	F: AGT GGA CAA TTG ATT GGT GAA
	R: CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC (597 bp)

Hazırlanışı

Doumith ve ark. (369) tarafından geliştirilen primerler HPLC saflıkta sentezletilmiş ve liyofilize olarak temin edilen primerler üretici firmanın önerdiği miktarlarda 100 mM konsantrasyonda steril ultra saf su ile sulandırıldı.

Real Time Reverse Transcription PCR Primerleri (Oligomer Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye)

Gen	Primer sekansı (5'-3')
<i>hlyA</i>	F: TGCAAGTCCTAAGACGCCA R: CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA
<i>actA</i>	F: GCTGATTTAAGAGATAGAGGAACA R: TTTATGTGGTTATTTGCTGTC
<i>inlA</i>	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT
<i>inlB</i>	F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT
<i>inlC</i>	F: AATTCCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTCACTA
<i>inlJ</i>	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA
<i>plcA</i>	F: CAGCATACTGACGAGGTGTG

	R: GATGTCCGCTCTACCTGA
<i>plcB</i>	F: GCATGATATTGACAGCAAATTA
	R: TGAAATACTTTGCTCCTGTT
<i>vip</i>	F: CCGTTTATCATCCAAGTGGCTAT
	R: GCGCATCCAATTGTTGTTGA
<i>fbpA</i>	F: CGCCAACCTTGAGTACTCTTCTAG
	R: CGATTGAATCACCACATGCGAAC
<i>fri</i>	F: AAAACAATCAACTCAGTAGACACAAAGG
	R: ATGGAGCTTTTCCTAAGAATGCTTTGA

Hazırlanışı

HPLC saflıkta sentezlenmiş ve liyofilize olarak temin edilen primerler, üretici firmanın önerdiği miktarlarda 100 mM konsantrasyonda steril ultra saf su ile sulandırıldı.

cDNA Seti (Bio-Rad Laboratories, CA, ABD)

Bileşimi

5x iScript reaction mix	400 µl
iScript reverse transcriptase	100 µl
Nuclease-free water	1,5 ml

ERIC-PCR Primerleri (Oligomer Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye)

Gen	Primer sekansı
ERIC1R	5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'
ERIC2	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'

Hazırlanışı

HPLC saflıkta sentezlenmiş ve liyofilize olarak temin edilen primerler üretici firmanın önerdiği şekilde 100 mM konsantrasyonda steril ultra saf su ile sulandırıldı.

TBE Solüsyonu**Bileşimi**

Tris(hydroxymethyl)aminoethane (Merck 108387)	54,5 g
Boric Acid (Merck 100165)	27,8 g
Titriplex II (Merck 108417)	2,9 g

Hazırlanışı

Kimyasal malzemeler belirtilen miktarlarda tartılarak distile suyla 1 lt'ye tamamlandı. Bu şekilde 5 x TBE stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyondan 200 ml alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanıp 1 x TBE solüsyonu elde edildi.

Ethidium Bromide (Sigma-Aldrich, 075K37341, St. Louis, MO, ABD)**Hazırlanışı**

Toz haldeki ethidium bromide'den 10 mg tartıldı ve 10 ml steril distile suda çözdürülerek 1 mg/ml'lik stok solüsyon elde edildi.

Agaroz Jel (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)**Hazırlanışı**

Agaroz jeli % 1,5 yoğunlukta hazırlamak için, agarozdan 1,2 g tartılarak 120 ml 1 x TBE'de çözündürüldü. Mikrodalga fırında eritildi ve yaklaşık 50°C'ye soğutuldu. İçerisine 120 µl Ethidium Bromide eklendi ve elektroforez küvetine dökülerek kullanıma uygun hale getirildi.

3.1.5. Bakteriyofajların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Lauria Bertani Agar (LB)

Bileşimi

Lauria Bertani Broth (Merck, 110285)	12,5 g
Bacteriological Agar (Oxoid, L10)	7,5 g
CaCl ₂ (Merck, 102381)	100 mM

Hazırlanışı

Belirtilen miktarlarda besiyeri ve agar tartıldı. Üzerine 100 mM'lık CaCl₂ çözeltisinden 50 ml eklenerek 500 ml steril distile suda çözdürüldü ve pH değeri 7,0 ± 0,2'ye ayarlandı. Mikrodalga fırında eritilerek 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C'ye soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek 4°C'de muhafaza edildi.

Lauria Bertani Soft Agar (LBS)

Bileşimi

Lauria Bertani Broth (Merck, 110285)	2,5 g
Bacteriological Agar (Oxoid, L10)	0,75 g
CaCl ₂ (Merck, 102381)	100 mM

Hazırlanışı

Belirtilen miktarlarda besiyeri ve agar tartıldı. Üzerine 100 mM'lık CaCl₂ çözeltisinden 10 ml eklenerek 100 ml steril distile suda çözdürüldü ve pH değeri değeri 7,0 ± 0,2'ye. Mikrodalga fırında eritilerek, deney esansında kullanım kolaylığı sağlaması açısından kapaklı şişelere 30'ar ml dağıtıldı. Ardından 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize

edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 4°C’de muhafaza edildi.

3.1.6. Bakteriyofajların Restriksiyon Enzim Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Restriksiyon Enzimleri Seti (NEB, New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD)

Bileşimi

<i>ClaI</i> (R0197S)	10.000 U/ml
<i>SacI</i> (R0156S)	20.000 U/ml
10 x NEBuffer (B7204S)	1,25 ml

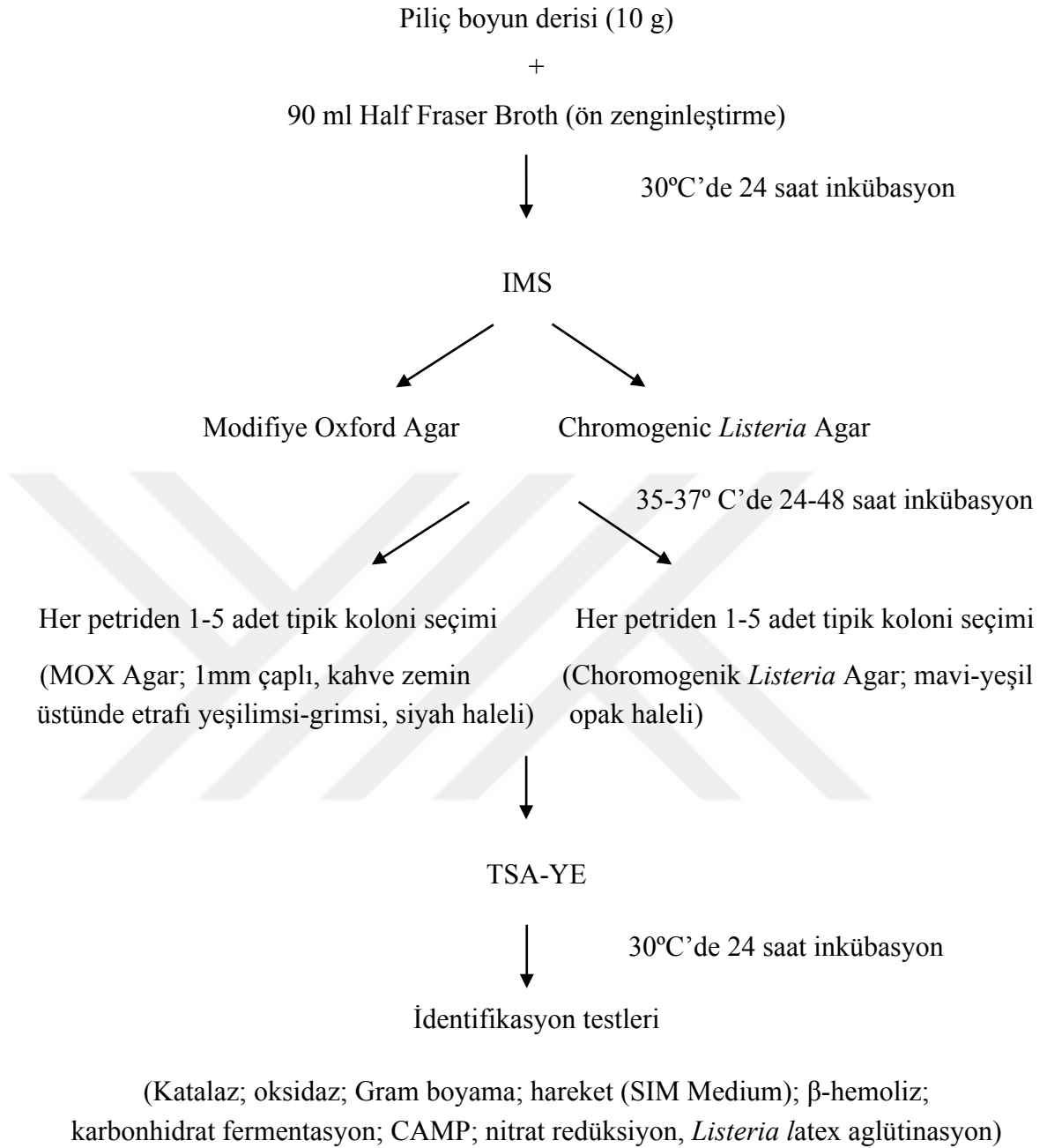
Gene Ruler Seti (NEB, New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD)

Bileşimi

Lamda-DNA HindIII Digest (N3012S)	500 µg/ml
Gel loading Dye (B7025S)	6x

3.2. *L. monocytogenes* İzolasyon ve İdentifikasyonu

Piliç boyun derisi örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyonu, ISO 11290-1 (International Standards Organization-Uluslararası Standartlar Organizasyonu) (370) tarafından önerilen IMS (immuno manyetik separasyon) bazlı kültür tekniği kullanılarak yapıldı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. *Listeria monocytogenes*'in izolasyon şeması.

3.2.1 Ön zenginleştirme

Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen piliç boyun derisi örnekleri, aseptik koşullarda steril numune poşetlerine (BagPage, Interscience, Saint Nom, Fransa) 10 g tartıldı. Üzerine 90 ml Half Fraser Broth (Oxoid CM0895) eklenerek stomacherde (Lab

blender 400 Seward Laboratory, West Sussex, İngiltere) 1 dakika homojenize edildi. Ardından 30°C’de 20-24 saat inkübasyona bırakılarak ön zenginleştirme işlemi yapıldı.

3.2.2. İmmuno Manyetik Separasyon (IMS) ve Katı Besiyerine Ekim

Mikrobiyolojik güvenlik kabininde (Faster SafeFast Classic 212, Class II, Cornaredo, İtalya) her bir örnek için 1,5 ml’lik steril eppendorf tüplerine, 20 µl anti-Listeria Dynabead (Life Technologies, 71006) konarak üzerlerine ön zenginleştirme sıvılarından 1 ml ilave edildi. Karışım vortekslelendikten (Dragon-lab, MX-S, Beijing, Çin) sonra tüpler manyetik çubuğu çıkartılmış Dynal manyetik partikül konsantratör portüpüne (MPC-S, Oslo, Norveç) yerleştirildi ve oda sıcaklığında 10 dakika çalkalayıcıda (Boeco, Mini Rocker-Shaker, MR-1, Hamburg, Almanya) sürekli karıştırılarak inkübe edildi. Ardından Dynal portüpünün arka kısmına manyetik çubuk yerleştirildi, 3 dakika oda sıcaklığında beklendi ve sıvı kısım mikropipet vasıtasıyla, eppendorf tüpünün manyetik çubuğa denk gelen duvarına temas etmemeye özen gösterilerek dikkatlice aspire edildi. Bu işlemi takiben manyetik çubuk portüpten çıkarılarak mikropartiküller % 0,05 Tween 20 içeren Phosphate-Buffered Saline (pH 7,4) (Amresco, M245-10.4G-5PK) ile yıkandı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra mikropartiküller 100 µl PBS-Tween 20 ile yeniden süspanse edilip, 50 µl’si MOX Agara (Oxoid, CM0856) ve 50 µl’si Chromogenic Listeria Agara (Oxoid, CM1084) çizme plak yöntemiyle ekimleri yapılarak, 35-37°C’de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda plaklarda üreyen tipik kolonilerden 1-5 adet seçilerek biyokimyasal testler yapıldı (Şekil 3.1.).

3.2.3. *L. monocytogenes* İdentifikasyonu

MOX Agarda üreyen 1 mm çaplı koyu kahverengi etrafı siyah haleli olan tipik kolonilerden ve Chromogenic *Listeria* Agarda üreyen mavi-yeşil etrafı opak haleli tipik kolonilerden 1-5 adet seçilerek, biyokimyasal ve diğer identifikasyon testleri yapılmak üzere TSA-YE’ye (Tryptic Soy Agar-Yeast Extract, Oxoid CM131) geçilip 30°C’de 24 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilere sırası ile; Gram boyama, katalaz (% 3’lük H₂O₂ ile), oksidaz (Bactident oxidase, Merck 113300) ve 20-25°C’de SIM mediumda (Sulphate Indole Motility Medium; Merck 105470) hareketlilik testleri yapıldı. Gram pozitif, kısa çubuk formlu, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve SIM mediumda ekim hattında ve yüzey kısmında üreyerek şemsiye manzarası oluşturan *Listeria* kolonilerinin identifikasyonu amacıyla defibrine koyun kanı ile hazırlanmış % 7’lik kanlı agarda β-

hemoliz ve CAMP testlerinin yapılmasının yanı sıra, şeker fermentasyon ve nitrat redüksiyon testleri de yapılarak izolatların identifikasyonu gerçekleştirildi. İdentifikasyon testleri neticesinde, nitrat redüksiyon testi negatif sonuç veren, kanlı agarda β -hemoliz oluşturan, CAMP testte *S. aureus* ile sinerjik etki göstererek hemoliz veren ve şeker testlerinde L-ramnoz pozitif, mannitol negatif, D-ksiloz negatif olan örnekler *L. monocytogenes* olarak identifiye edildi (Tablo 3.1.). İdentifiye edilen *L. monocytogenes* suşları TSB-YE’de 24 saat 30°C’de inkübe edildikten sonra yatık TSA-YE’ye ve içlerinde % 60’lık steril gliserinden 0,5 ml bulunan kriyoviallere 1 ml geçildi. TSA-YE’ye geçilen izolatlar 30°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra 4°C’de, gliserinli kriyovialler ise -80°C’de (Nüve, Ankara, Türkiye) dondurularak saklandı. *Listeria* spp. için biyokimyasal testleri ve tür ayrımı şeması Tablo 3.1.’de verilmiştir (229, 370).

Tablo 3.1. *Listeria* spp. için biyokimyasal testleri ve tür ayrımı şeması.

Testler	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. seeligeri</i>
Katalaz	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-
Gram boyama	+	+	+	+	+	+
Nitrat redüks.	-	-	-	-	-	-
SIM’de hareket	+	+	+	+	+	+
β -hemoliz	+	+	-	-	-	+
CAMP test <i>S.aureus/R.equi</i>	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/-
Mannitol	-	-	-	-	+	-
L-ramnoz	+	-	d	d	-	-
D-ksiloz	-	+	-	+	-	+

d: Değişken

3.2.3.1. Katalaz Test

Katı besiyerindeki (TSA-YE) taze saf kültürden bir öze dolusu alınarak, lam üzerinde 1 damla % 3'lük H₂O₂ ile muamele edildi. 1-2 saniye içinde gaz kabarcıklarının gözlemlenmesi katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3.2. Oksidaz Test

Katı besiyerindeki (TSA-YE) taze izolatlardan Bactident Oxidase (Merck 113300) kağıdı üzerine sürüldü. 20-60 saniye içinde test kağıdında renk değişiminin olmaması oksidaz negatif olarak değerlendirildi.

3.2.3.3. Gram Boyama

Şüpheli koloniler öze ile alınarak lam üzerinde preparatları hazırlanarak alevde tespit edildi. Tüm preparatı kaplayacak miktarda lamın üzerine kristal viole boyasından eklendi ve 1-2 dakika boyandıktan sonra boya döküldü. 1 dakika lügol çözeltisi ile muamele edilmesinin ardından, yıkama suyunda mavi renk görülmeyene kadar % 70'lik alkol ile daha sonra da saf su ile yıkandı. Yıkanan preparatlar sulu karbon fuksin çözeltisi ile 1 dakika boyandıktan sonra tekrar saf su ile yıkayıp kurutuldu. Gram boyaması yapılan preparatlara immersiyon yağı damlatılıp, mikroskopta (Zeiss, Primo Star, Göttingen, Almanya) 100'lük immersiyon objektif ile incelendi. Mor renkte kısa çubuk, kokobasil formunda olanlar Gram pozitif, pembe renkli olanlar Gram negatif olarak değerlendirildi.

3.2.3.4. Nitrat Redüksiyon Testi

TSA-YE'den alınan şüpheli koloniler Nitrat Brotha inokule edilerek 37°C'de 48 saat inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyonun sonunda tüplere 0,2'şer ml Griess Ilosvay A ve B reaktifleri eklenerek renk oluşumu gözlemlendi. Kırmızı rengin oluşması nitratın nitrite indirgenliğini, dolayısıyla nitrat redüksiyon testinin pozitif olduğunu gösterdi.

3.2.3.5. Hareketlilik testi

TSA-YE'den iğne uçlu öze ile alınan *Listeria* şüpheli koloni SIM mediyuma dik olarak inokule edildi ve 25°C'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda, etkenin besiyerinin üst kısmında ve ekim hattı boyunca şemsiye şeklinde üremesi hareketlilik pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3.6. β -Hemoliz

TSA-YE katı besiyerinden öze yardımı ile alınan şüpheli *Listeria* kolonileri, defibrine koyun kanı ile hazırlanan % 7'lik kanlı agarlara ekilerek 35-37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda etrafında açık renkli berrak zon oluşan koloniler β -hemoliz yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3.7. CAMP (Christie Atkins Munch Petersen) Test

CAMP testinde, *L. monocytogenes*'in kanlı agarda *S. aureus* ve *R. equi* suşları ile sinerjik etki göstererek hemoliz oluşturup oluşturmadığı tespit edilmektedir. Bu amaçla, *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* referans suşları defibrine koyun kanı ile hazırlanmış % 7'lik kanlı agarın kenar kısımlarına birbirlerine paralel olarak öze ile petriyi boydan boya geçecek şekilde ekildi. *Listeria* şüpheli izolatların, referans suşların arasına dik fakat suşlara temas etmeden ekilmesine dikkat edildi. Ekim yapılan plakların 35°C'de 18-24 saatlik inkübasyonu sonrasında oluşan β -hemoliz alanları incelendi. Bu doğrultuda, *S. aureus*'a doğru hafif genişleyen dar bir hemoliz bantının oluşumu *L. monocytogenes*'e özgü hemoliz oluşumu olarak değerlendirildi.

3.2.3.8. Karbonhidrat Fermentasyon Testi

Bu test için, 9 ml Purple Broth Base (PBB) içeren tüplere, % 5'lik hazırlanan ve 0,22 μ m'lik milipor filtrelerden (Corning Inc.) geçirilerek steril edilen ramnoz, ksiloz ve mannitol şeker solüsyonlarından 1 ml eklendi. TSA-YE'de 30°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak PBB'lere inoküle edildi ve 37°C'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda PBB'in mor olan renginin sarıya dönmesi pozitif, renk değişikliğinin olmaması ise negatif olarak değerlendirildi.

3.2.4. *L. monocytogenes* izolatlarının PCR ile Doğrulanması

3.2.4.1 DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için, -80°C'de cryovialde veya 4°C'de yatık agarda saklanan izolatlar TSB'ye geçilerek 35°C'de 24 saat zenginleştirildi. İnkübasyon sonrası türbidite oluşmuş TSB'den 1 ml hücre süspansiyonu, 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 12 000 x g'de (Beckman Coulter 22 R Centrifuge, CA, ABD) 3 dakika santrifüj edildi.

Santrifüjün ardından süpernatant atılarak 200 µl % 5'lik Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) ve 2 µl Proteinaz K (20 mg/ml) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Almanya) ilave edilip vortekslenildi. Tüpler, thermo shakerda (Hangzhou Allsheng Instruments, Hangzhou City, Çin) 55°C'de 40 dakika, ardından 100°C'de 8 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tekrar vortekslenip 12 000 × g'de 3 dakika santrifüj edilen DNA ekstraktları, PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.4.2. PCR Amplifikasyonu

PCR amplifikasyonu amacıyla, toplam 50 µl hacimde, bileşiminde 1 x PCR buffer (ABM, AC146444C, Richmond, Canada) [10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 Triton X-100], her bir dNTP'den (deoxynucleoside triphosphate) 100 µM (ABM, ET795528), her bir primerden 1 µM, 2 U Taq DNA polymerase (ABM, IQ7853) ve 10 µl örnek DNA içeren karışım (master mix) kullanıldı. Amplifikasyon işlemi, Thermal Cycler'da (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg, Almanya) 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon işleminin ardından, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 65°C'de 1 dk bağlanma ve 70°C'de 2 dk DNA uzatma aşamaları 30 siklus olarak yapıldı. Bu işlemler sonucunda elde edilen ampliconlar elektroforez aşamasına kadar 4°C'de bekletildi (368, 371).

3.2.4.3. Elektroforez

Elektroforez işlemi için ilk önce 1 µl/ml Ethidium bromide (% 0,1) (Sigma-Aldrich, E8751) ile boyanan % 1,5'lik agaroz jel hazırlanarak, üzerine yine 1 µl/ml oranında Ethidium bromide ile boyanmış 1 x TBE solüsyonu konularak jel elektroforez küveti içinde tamamen kaplandı. İçerisine taraklar yerleştirilerek jelin donması için beklemeye alındı. Jelin donmasının ardından, elde edilen PCR ürünlerinden DNA'ların saptanması amacıyla, her bir örneğe ait ampliconlardan 10 µl alınarak, 2 µl 6 x yükleme solüsyonu (GeneAll-Genesta, Songpa-gu, Kore) ile boyandı. Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* ATCC 19111, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı ve örnekler ile DNA Marker (GeneAll-Genesta, GA-010) 10 µl olacak şekilde jeldeki kuyucuklara yüklendi. 100 Volt elektrik akımında 1 saat yürütülerek elektroforez (CSL MSMixi-Duo, Corston, İngiltere) işlemi gerçekleştirildi. Agaroz jel, transilüminatöre (Daihan Sci. WUV-L20, Soeul, Kore) transfer edilerek oluşan spesifik bantlar DNA marker ve

pozitif kontroller yardımıyla değerlendirildi. *hlyA* genine özgü 388 bp ağırlığındaki DNA bantları pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.5. Multipleks PCR ile *L. monocytogenes*'lerin Serotiplerinin Belirlenmesi

Piliç boyun derisi örneklerinden izole edilen ve PCR ile doğrulanan *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplendirilmesinde Doumith ve ark. (369) tarafından geliştirilen primerler ve multipleks PCR tekniği kullanıldı. PCR amplifikasyonu için toplam 100 µl hacimde, bileşiminde 1 x PCR buffer (ABM, AC146444C, Richmond, Canada) [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1 Triton X-100], her bir dNTP'den (ABM, ET795528) 0,2 mM, her bir primerden 1 µM, 2 U Taq DNA polymerase (ABM, IQ7853) ve 10 µl örnek DNA içeren master mix kullanıldı. Amplifikasyon işlemi, Thermal Cycler'da (Eppendorf Mastercycler Gradient) 94°C'de 3 dk ilk denatürasyon işleminin ardından, 94°C'de 40 sn denatürasyon, 53°C'de 1,15 dk bağlanma ve 72°C'de 1,15 dk DNA uzatma aşamaları 30 siklus ve son olarak 72°C'de 7 dk uzatma yapıldı. Elde edilecek PCR ürünlerinden 10 µl alınarak, 2 µl 6 x yükleme solüsyonu, 1 µl/ml ethidium bromide (% 0,1) ile boyanan % 1,5'lük agaroz jelde, 100 Volt elektrik akımında 1 saat yürütülerek elektroforez (CSL MSMixi-Duo) işlemi yapıldı. Agaroz jel, transilüminatöre (Daihan Scientific, WUV-L20) transfer edilerek oluşan spesifik bantlar DNA marker ve pozitif kontroller yardımıyla UV ışığı altında değerlendirildi.

Buna göre;

- i) 691 bp ağırlığında bant veren örnekler serotip 1/2a (veya 3a),
- ii) 471 bp ağırlığında bant veren örnekler serotip 1/2b (veya 3b),
- iii) 691 ve 906 ağırlığında bant veren örnekler 1/2c (veya 3c),
- iv) 471 ile 597 bp ağırlığında bant veren örnekler serotip 4b (veya 4d, 4e) olarak değerlendirildi (369).

3.2.6. Piliç Orjinli *L. monocytogenes* Serotiplerinin Başlıca Virülens Genlerinin Varlığının ve Ekspresyon Düzeylerinin Real Time Reverse Transcription PCR (Real Time RT-PCR) ile Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümü, *L. monocytogenes* serotiplerinden i) toplam RNA sentezi, ii) RNA konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi, iii) RNA'dan cDNA sentezi, iv)

real time RT-PCR analizi ve v) elde edilen C_T değerlerinin hesaplanması aşamalarından oluşmaktadır.

i) Toplam RNA sentezi: *L. monocytogenes* serotiplerinden, RNA izolasyon kitinde (Bio-Rad Laboratories, Aurum Total RNA mini kit) belirtilen protokole göre RNA izolasyonu yapıldı.

ii) RNA konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi: Elde edilen RNA'lara 30 µl RNase free su eklendikten sonra RNA konsantrasyonu 260 nm'de absorbansları belirlendi. Protein veya organik madde kontaminasyonu yönünden saflıklarının belirlenmesi ise sırasıyla 260/280 ve 230/260 nm'de NanoDrop spektrofotometre (NanoDrop ND-100) ile yapıldı.

iii) cDNA sentezi: Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi, iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories) ile gerçekleştirildi.

iv) Real time RT-PCR analizi: *L. monocytogenes* serotiplerinin başlıca virülens genlerinin (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *vip*, *fbpA* ve *fri*) ekspresyon düzeyleri real time reverse transcription PCR (real time RT-PCR) ile belirlendi. Bu amaçla ekspresyon stabilitesi ortaya konmuş (158, 372) *spoG* (5'TGA CGG TGA ATT CCG TGA TA3'; 5'TCA GCA GAA ACG GAT TCA GA3') housekeeping gen olarak kullanıldı. Analiz real time PCR cihazında (Bio-Rad, Real-Time PCR Detection System, CFX96 Touch™) gerçekleştirildi. Reaksiyon toplam 10 µl hacimde hazırlanmış olup karışıma, 1 µl cDNA, her bir primerden 0,5 µl (10 µM'lık), 5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad Laboratories) ve nuclease free su (Bio-Rad Laboratories) konuldu. PCR koşulları 95°C'de 3 dk ilk denatürasyonu takiben 40 siklus 95°C'de 10 sn, 55°C'de 15 sn ve 72°C'de 40 sn olarak gerçekleştirildi. Floresans datalarının ilk okuması 72°C'deki uzama basamağında elde edildi. Analizde son aşamayı 95°C'de 10 sn, 65°C'de 2 ve 95°C'de 5 sn oluşturmuş olup, disosiyasyon eğrisi için ikinci okuma 65°C'de gerçekleştirildi. Real time RT-PCR analizi sonucunda elde edilen veriler CT ΔCq verileri CFX Manager Software (Bio-Rad CFX Manager 3.1, CA, ABD) kullanılarak değerlendirildi ve izolatların virülens genlerinin ekspresyon düzeyi housekeeping gene göre karşılaştırıldı. *Listeria monocytogenes* izolatlarında real time RT-PCR ile tespit edilen virülens genleri ve bu genlere özgü primer dizilimleri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. *Listeria monocytogenes* izolatlarında real time RT-PCR ile tespit edilen virülens genleri ve bu genlere özgü primer dizilimleri.

Gen	Primer sekansı (5'-3')	Kaynak
<i>hlyA</i>	F: TGCAAGTCCTAAGACGCCA R: CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA	(373)
<i>actA</i>	F: GCTGATTTAAGAGATAGAGGAACA R: TTTATGTGGTTATTTGCTGTC	(374)
<i>inlA</i>	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	(12)
<i>inlB</i>	F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT	(12)
<i>inlC</i>	F: AATTCCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA	(12)
<i>inlJ</i>	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	(12)
<i>plcA</i>	F: CAGCATACTGACGAGGTGTG R: GATGTCCGCTCTACCTGA	(375)
<i>plcB</i>	F: GCATGATATTGACAGCAAATTA R: TGAAATACTTTGCTCCTGTT	(375)
<i>vip</i>	F: CCGTTTATCATCCAAGTGGCTAT R: GCGCATCCAATTGTTGTTGA	(376)
<i>fbpA</i>	F: CGCCAACCTGAGTACTCTTCTAG R: CGATTGAATCACCACATGCGAAC	(377)
<i>fri</i>	F: AAAACAATCAACTCAGTAGACACAAAGG R: ATGGAGCTTTTCCTAAGAATGCTTTGA	(378)

3.2.7. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) Parmak İzi Analizi

Piliç boyun derisi örneklerinden izole edilen, PCR ile doğrulanan ve multipleks PCR ile serotipleri belirlenen *L. monocytogenes*'lerin parmak izi analizi ve izolatlar arasındaki klonal ilişki ERIC-PCR ile belirlendi. Analizde ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGG GATTCAC-3') ve ERIC2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3') primerleri kullanıldı. DNA konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre (NanoDrop ND-100) kullanılarak, 260 nm'de ayarlandı. 1 x Taq Polymerase Master Mix, her bir primerden 25 pmol ve 35 ng DNA içeren PCR karışımı (25 µl) hazırlandı ve amplifikasyonlar Thermal Cycler'da (Eppendorf Mastercycler Gradient) 95°C'de 5 dakika ilk denatürasyonu takiben 33 siklus 90°C'de 30 saniye, 50°C'de 30 saniye, 52°C'de 1 dakika, 65°C'de 2 dakika ve son uzama işlemi 65°C'de 8 dakika olarak gerçekleştirildi. ERIC-PCR ürünleri daha sonra % 1,5'lik agaroz jelde 1 x TBE buffer'da 50 V'da elektroforez ile ayrıştırıldı. Agaroz jel 300 ml ethidium bromide solüsyonu (0,5 µg/ml) ile boyanarak, jel görüntüleme sistemi ile görüntüleri çekildi (Bio-Rad, Geldoc XR, CA, ABD). Elde edilen jel görüntüsü cluster (küme) analizi yapmak üzere kullanıldı ve dendrogramları çıkartıldı.

3.2.7.1. Cluster (Küme) Analizi

L. monocytogenes izolatlarının genomik parmak izi benzerliğinin (klonal ilişki) belirlenmesinde ERIC-PCR analizi sonucunda elde edilen paternler kullanıldı. Verilerin oluşturulup analize alınmasında her bir izolat için bantlar var (1) ya da yok (0) olarak kaydedildi. Veriler DendroUPGMA dendrogram oluşturma uygulamasında (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) işlenerek izolatların benzerlik ve uzaklık matrisleri Jaccard katsayısına (Jaccard's coefficient) göre hesaplanarak dendrogramları oluşturuldu.

3.3. *L. monocytogenes*'e Litik Etkili Bakteriyofaj İzolasyonu ve Faj Duyarlılıklarının Tespiti

Kanatlı mezbaha atık sularından 50'şer ml steril numune kaplarına alınarak, soğuk zincir altında laboratuvara getirilen örnekler derhal bakteriyofaj izolasyonuna tabi tutuldu. Öncelikle atık su örnekleri, kıl, tüy, organ parçaları gibi kaba partiküllerinden arındırılmak için süzgeç kağıdından süzüldü. Süzülen atık sularından 10 ml alındı ve

steril 0,22 µm çaplı milipor filtrelerden (Corning Inc.) geçirilerek steril tüplere aktarıldı. Böylece atık su örnekleri kontamine oldukları bakteri ve mikropartiküllerden de arındırılmış oldu. Bakteriyofaj zenginleştirilmesi amacıyla filtratlardan 500'er µl alınarak, içlerinde 4 ml TSB bulunan 7 adet steril tüplere aktarıldı ve üzerlerine TSB'de 37°C'de 1 gece zenginleştirilmiş *L. monocytogenes* kültürlerinden (*L. monocytogenes* ATCC 19111 [serotip 1/2a], N7155 [serotip 1/2b], ATCC 7644 [serotip 1/2c], N7143 [serotip 3a], NCTC 5214 [serotip 4a], RSKK 475 [serotip 4b] ve RSKK 476 [serotip 4c]) birinden 2 ml inokule edilerek 30°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben, *L. monocytogenes* hücrelerinin lizisi ve bakteriyofajların hücreden çıkarak süspansiyon içerisinde serbest kalması amacıyla her bir ependorf tüpüne 400 µl kloroform (CHCl₃) eklendi. Karışım hafifçe karıştırıldıktan sonra 3000 x g'de 15 dakika santrifüj (Hermle, Z326K, Franklin, Almanya) edildi. Santrifüj işlemi takiben üstte kalan sıvı (bakteriyofaj içeren) tekrar 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek ayrı bir tüpe aktarıldı ve 10⁻¹'den 10⁻⁸'e kadar TSB ile dilüsyonları hazırlandı. Her bir dilüsyondan 10 µl spot ekim testi amacı için kullanıldı. Dilüsyonların spot ekim testi için, 90 mm'lik petrilere iki katlı agarlar hazırlandı. Bu amaçla 4 mm kalınlığında dökülmüş ve 4°C'de muhafaza edilen LB (Luria Bertani) agar'ın (LB broth + % 1,5 agar + 10 mM CaCl₂) (Merck, 110285) üzerine, 3 ml olarak hazırlanmış, 50°C'ye soğutulmuş ve 37°C'de 1 gece TSB'de zenginleştirilmiş *L. monocytogenes* kültüründen 200 µl (10⁸ kob/ml) eklenmiş LB soft agar (LB broth + % 0,75 agar + 10 mM CaCl₂) (Merck, 110285) döküldü (379). Agarların oda sıcaklığında donmasını takiben, atık su numunelerinden elde edilen filtratın her bir dilüsyonu (10¹-10⁸), farklı referans suşu barındıran çift katlı petrilere belirli aralıklarla 10'ar µl damlatılarak ekimleri yapıldı. Damlaların emilmesini takiben petrilere 30°C'de 24 saat inkübe (Nüve EN120, Ankara, Türkiye) edildi. İnkübasyon sonunda bakteriyofajlar, agarların üzerinde oluşmuş plaklar (berrak zon) şeklinde tespit edildi. Agar üzerinde oluşan 1-5 adet plak, steril mikropipet ucuyla alınarak, bakteriyofajın lize etmiş olduğu suşun TSB'de 37°C'de 1 gece inkübe edilmiş 1,5 ml'lik zenginleştirmesine inoküle edildi ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüplere 100'er µl kloroform eklendi, hafifçe karıştırıldı ve 3000 x g'de 15 dakika santrifüj (Beckman Coulter 22R Centrifuge) edildi. Santrifüjü takiben süpernatantlar alınarak steril ependorf tüplerine aktarıldı. Bu şekilde izole edilerek zenginleştirilen saf litik bakteriyofaj süspansiyonlarının bir kısmı 4°C'de, bir kısmı da steril gliserin eklenerek (% 20 v/v) -80°C'de (Nüve) muhafaza

edildi. Tüm deney protokolü, her bir bakteriyofaj ve *L. monocytogenes* kombinasyonu için ayrı ayrı yapıldı.

3.4. *L. monocytogenes* Bakteriyofajlarının Plak Karakterizasyonu

L. monocytogenes'lerin bakteriyofajlara olan duyarlılıklarını tespit etmek amacıyla, yapılan çift katlı agarlara ekim sonucunda oluşan plakların morfolojileri (dış görünüşleri ve çapları) gözlemlenerek oluşturdukları plaklar karakterize edildi (380).

3.5. Restriksiyon Enzimleriyle Faj DNA'larının Karşılaştırılması

Bakteriyofajların DNA'ları, yüksek titreli faj lizatlarından ($> 10^9$ pfu/ml) faj DNA izolasyon kiti (Phage DNA Isolation Kit, #46800, Norgen Biotek Corp., Ontario, Kanada) kullanılarak elde edildi. Restriksiyon enzimleri için toplam 50 µl hacimde, bileşiminde 10 x PCR buffer (NEB, New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD), 1 µl *ClaI* ve *SacI* enzimleri (NEB, New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) ve 10 µl DNA içeren master mix hazırlandı. Örnekler, restriksiyon işlemi için 37°C' de 1,5 saat muamele edildi. Digeste edilmiş DNA'ların genomik profilleri 1 µl/ml ethidium bromide ile % 0,7'lik agaroz jele yüklendi. Yükleme esnasında DNA ladder olarak Lambda DNA-*HindIII* Digest (NEB, New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) kullanılarak, elektroforez işlemine tabi tutuldu (380). Elektroforez işlemi takiben, jel görüntüsü alınarak bakteriyofaj izolatlarının restriksiyon profilleri belirlendi.

3.6. Bakteriyofajlardan *L. monocytogenes*'in Başlıca Virülens Genlerinin Tespiti

Listeriyofaj izolatlarında *L. monocytogenes*'in başlıca virülens genlerinin (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *vip*, *fbpA* ve *fri*) varlığı, real time RT-PCR bölümünde (Bkz. 3.2.6) bahsedilen yöntem uygulanarak ortaya kondu.

3.7. Bakteriyofajların Asidik pH Değerlerini Tolere Etme Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteriyofajların asidik pH değerlerini tolere etme kabiliyetlerinin belirlenmesi amacıyla, çift katlı agarlarda hazırlanarak spot ekimleri yapılan ve lize etmiş oldukları suş ile birlikte bir gece inkübasyona bırakılarak, ardından santrifüj edilerek zenginleştirilen saf bakteriyofaj süspansiyonları, laktik asit ile pH'ları 3,0 ve 4,0 değerlerine ayarlanıp, 1 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Deneyin 0., 10., 30. ve

60. dakikalarında bakteriyofajların spot ekimleri çift katlı LB agarda gerçekleştirildi. Plak oluşup oluşmamasına göre bakteriyofajların düşük pH değerlerini tolere etme özellikleri belirlendi.

3.8. Bakteriyofajların Çeşitli Sıcaklık Derecelerini Tolere Etme Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteriyofajların çeşitli sıcaklık derecelerini tolere etme kabiliyetlerinin belirlenmesi amacıyla, çift katlı agarlarda hazırlanarak spot ekimleri yapılan ve lize etmiş oldukları suş ile birlikte bir gece inkübasyona bırakılıp ve ardından santrifüj edilerek zenginleştirilen saf bakteriyofaj süspansiyonları, 50°C ve 60°C sıcaklık derecelerine 1 saat süreyle maruz bırakılarak, 0., 10., 30. ve 60. dakikalarda bakteriyofajların spot ekimleri çift katlı LB agarda gerçekleştirildi. Plak oluşup oluşmamasına göre bakteriyofajların çeşitli sıcaklık değerlerini tolere etme özellikleri belirlendi.

3.9. Bakteriyofaj Konak Spesifite ve Litik Etki Spektrumunun Belirlenmesi

Çalışmada piliç boyun derisi örneklerinden izole edilen 31 *L. monocytogenes* izolatının yanı sıra, bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK 114R104 no'lu projeden elde edilen 13 *L. monocytogenes* izolatı, daha önceki çalışmalarda izole edilen 32 *L. monocytogenes*'e (serotip 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b) ile 7 adet referans *L. monocytogenes* suşu (*L. monocytogenes* ATCC 19111 [serotip 1/2a], N7155 [serotip 1/2b], ATCC 7644 [serotip 1/2c], N7143 [serotip 3a], NCTC 5214 [serotip 4a], RSKK 475 [serotip 4b] ve RSKK 476 [serotip 4c]), ayrıca izole edilen fajların *L. monocytogenes* dışındaki başka suşlara litik etkisinin olmadığını tespit edilebilmesi amacıyla *E. coli* O157:H7, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. Typhimurium*, *A. hydrophila*, *Y. enterocolitica*, *R. equi*, *C. perfringens* ve *S. aureus* referans suşları olmak üzere toplam 83 *L. monocytogenes* ve 9 non-*L. monocytogenes* mezbaha atık sularından elde edilen bakteriyofajların konak spesifitelerinin ve litik etki profillerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Bu kapsamda, 4°C TSB'de veya -80°C (Nüve) cryoviallerde saklanan saf bakteriyofaj kültürleri, izolasyon bölümünde açıklandığı şekilde (Bkz. 3.2.8) litik aktivite gösterdikleri *L. monocytogenes* suşlarından hazırlanan kültürlerde çoğaltıldı. Çalışmada konak olarak kullanılacak olan *L. monocytogenes* izolatları ve diğer bakteri suşlarının TSB'de 37°C'de 1 gece zenginleştirilmiş kültürleri ile kontamine edilmiş çift katlı agarlar (LB agar) spot ekim testi ile bakteriyofaj duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla hazırlandı.

Zenginleştirilmiş bakteriyofajlar bakteri kültürleri ile kontamine edilmiş agarların üzerine spot ekim tekniğiyle inokule edildi ve petriler 30°C’de 24 saat inkübe (Nüve EN120) edildi. İnkübasyon sonunda agarlar üzerinde plakların (berrak zon) gözlenmesi inokule edilen bakteriyofajın ekildiği konak bakteriye litik etkili olduğunu gösterdi. Çalışmada izole edilen bakteriyofaj kültürlerinin litik aktiviteleri, belirtilen tüm bakteri kültürleriyle araştırıldı. Çalışma neticesinde *L. monocytogenes*’e spesifik ve en geniş spektrumunda *L. monocytogenes* izolatlarını lize eden 2-5 adet bakteriyofaj kokteyl oluşturmak amacıyla belirlendi.

3.10. *L. monocytogenes* ATCC 19111 Suşunda Nalidiksik Asit (NA) Direncinin Geliştirilmesi

Selektif bir özellik olarak artan nalidiksik asit dirençliliği kazandırmak üzere (biyokontrol çalışmasında kullanılan suşa ayırıcı bir özellik kazandırmak amacıyla) referans *L. monocytogenes* suşu, artan konsantrasyonlarda (10, 20, 30, 40 ve 50 µg/ml) nalidiksik asit içeren LB agar’ın (LB broth + % 1,5 agar + 10 mM CaCl₂) üzerinde gerçekleştirilen pasajlarla normale göre daha yüksek düzeyde nalidiksik asite dirençli hale getirildi.

TSB’de 37°C’ de bir gece zenginleştirilen yüksek düzeyde nalidiksik aside dirençli hale getirilmiş referans *L. monocytogenes*’in (NA-LM19111); normal bileşimine ek olarak 50 µg/ml nalidiksik asit (NA) içeren MOX agarda (NA-MOX) ve normal MOX agar’da sayımları yapılarak, geliştirilen NA-direnci doğrulandı. Sayımlar, 10 katlı dilüsyonları hazırlanarak çift seri damla plak yöntemiyle ekilen NA-LM kolonilerinin, 35°C’de bir gece inkübasyonu ile gerçekleştirildi.

3.11. Faj Kokteyli için Seçilen Bakteriyofajların In-Vitro Litik Etkinliklerinin Tespiti

Kokteyl için belirlenen aday fajların konak NA-LM19111 suşuna in-vitro olarak litik etkinlikleri, TSB’de 37°C’ de 1 gece zenginleştirilmiş (12-18 saat) (Nüve EN120), log-üreme fazındaki *L. monocytogenes* suşuna farklı infeksiyon çokluklarında (MoI, Multiplicity of Infection, faj sayısı/bakteri) eklenmesi ile farklı sürelerde (0., 30., 60. ve 90. dk ve 3., 6., 24. ve 48. saatler) alınan örneklerden faj ve bakteri sayımlarının gerçekleştirilmesi ile değerlendirildi. Bu kapsamda, OD₆₀₀ değerleri doğrultusunda TSB

ile 10^2 , 10^4 ve 10^6 kob/ml düzeyinde seyreltilen *L. monocytogenes* kültürleri, son titresi 10^8 pob/ml (plak oluşturan birim/ml) faj olacak şekilde infekte edilerek 30°C 'de 24 saat inkübe edildi. *L. monocytogenes* sayımı için belirtilen sürelerde alınan örneklerden OD_{600} değerlerindeki azalmalar kaydedildikten sonra hazırlanan 10 katlı sulandırmalar, çift seri damla plak yöntemiyle MOX agara ekildi ve petriyer 37°C 'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben, koloni sayımları gerçekleştirilerek kob/ml'deki azalmalar kaydedildi. Faj sayımı için belirtilen sürelerde alınan örnekler, $0,22\ \mu\text{m}$ çaplı steril milipor filtreden süzülerek konak bakteri ile hazırlanan tabakalı agarlarda (Bkz. 3.2.9) çift seri spot ekimler ile sayıldı. Sayımlar sonucunda faj miktarındaki artış kaydedildi.

3.12. Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması ve Optimizasyonu

Yapılan faj duyarlılık profili testi neticesinde analiz edilen *L. monocytogenes* izolatlarına en geniş spektrumda litik etki gösteren 2-5 bakteriyofajın karışımından kokteyl hazırlandı. Bu amaçla, seçilen her bir faj, 1 gece öncesinde TSB'de 37°C 'de zenginleştirilmiş olan *L. monocytogenes* konak hücresi kültürlerinde çoğaltılarak, 30°C 'de 1 gece inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün steril $0,22\ \mu\text{m}$ çaplı milipor filtreden geçirilerek steril tüplere aktarıldı. Konak hücresinde zenginleştirilmiş her bir faj, biyokontrol ajanı olarak gıda modelinde kullanım aşamasının hemen öncesinde, 10^9 pob/ml sayısında ve eşit hacimde karıştırıldı.

Çalışmalarda hedeflenen sayıda bakteriyofaj içeren süspansiyonların hazırlanabilmesi için, TSB'de 37°C 'de 1 gece zenginleştirilmiş *L. monocytogenes* kültürüne daha önce izole edilmiş 1 ml bakteriyofaj süspansiyonu inokule edilerek 30°C 'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bakteri-faj süspansiyonu ependorf tüplerine aktararak her bir tüpe $100\ \mu\text{l}$ kloroform (CHCl_3) eklendi. Karışım hafifçe karıştırıldıktan sonra $3000\ \text{x g}$ 'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjü takiben üstte kalan sıvı (bakteriyofaj içeren) steril $0,22\ \mu\text{m}$ çaplı milipor filtreden geçirilerek steril tüplere aktarıldı. Bakteriyofaj süspansiyonunun seri dilüsyonları hazırlanarak pob/ml sayısının tespiti amacıyla agarda plak sayımları gerçekleştirildi.

3.13. *L. monocytogenes* Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılmak üzere, hedeflenen sayıda nalidiksik aside dirençli *L. monocytogenes* kültürlerinin hazırlanabilmesi için etken TSB'de 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldıktan sonra bakteri süspansiyonu 5000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak dipte kalan bakteriler metabolik artıkların uzaklaştırılması amacıyla 10 ml tamponlanmış tuzlu suyla (PBS, pH 7,4) yıkandı ve 5000 x g'de 15 dakika tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra dipte kalan bakteriler 10 ml steril TSB'de tekrar süspansiyon edildi. Bu şekilde hazırlanmış NA-*L. monocytogenes* (NA-LM) süspansiyonlarının seri dilüsyonları hazırlandı ve spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik dansiteleri (OD₆₀₀) belirlendi. Tespit edilen OD₆₀₀ değerindeki kob/ml sayısının belirlenmesi amacıyla, TSA'da plak sayımları gerçekleştirildi. Böylelikle hedeflenen sayıda *L. monocytogenes* içeren süspansiyonun OD değeri, çalışmada kullanılmak üzere belirlenmiş oldu.

3.14. Piliç Butlarında *L. monocytogenes*'in Bakteriyofaj Kokteyli ile Biyokontrolü

Bu amaçla, marketlerde satışa sunulan taze derili piliç butları kullanıldı. Piliç butları NA-LM ile 10², 10⁴ veya 10⁶ kob/ml olacak şekilde 1 ml bakteri süspansiyonu ile steril numune poşeti içerisinde kontamine edildi. Fajlı (F) ve kontrol (K) grupları oluşturuldu ve her bir but tartılarak ağırlıkları not alındı. Piliç kesim standartlarına göre 2,5 kg'lık bir piliç karkası için 1,5 lt soğutma suyu harcandığı göz önünde bulundurularak farklı ağırlıklardaki butlar için ne kadar faj süspansiyonu kullanılması gerektiği hesaplandı (örneğin 150 g'lık bir but için 90 ml su harcanması gerekmektedir). F grubuna ait but örneklerine 10⁸ pob/ml faj süspansiyonundan hesaplanan miktarda eklendi ve 10 dakika (piliç kesim prosesinde minimum ön soğutma süresidir) çalkalanarak muamele edildi. K grubunda ise bakteriyofajlı su yerine steril distile su eklenerek, aynı işlemlerden geçirildi. Sürenin sonunda but örnekleri, içerisinde buldukları sıvıdan çıkarılarak yeni bir steril numune poşetlerine alındı ve 4°C'de (buzdolabı sıcaklığı) muhafaza edildi. Başlangıç kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amacıyla 0. saatte yapılan *L. monocytogenes* ve bakteriyofaj sayımına ek olarak buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde 1., 3., 6. ve 24. saatlerde *L. monocytogenes* ve faj sayımları yapıldı. Her bir deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



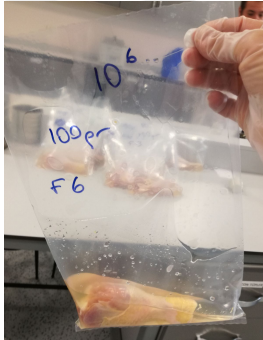
Derili piliç
butlarının alınması
ve tek tek tartılması



Bakteri
süspansiyonu ile
kontamine edilmesi



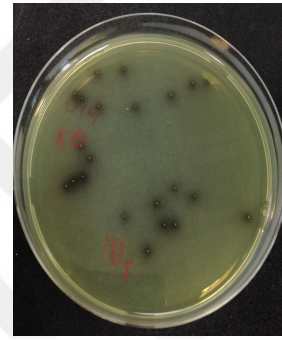
Faj süspansiyonu
veya distile su
eklenmesi



On dakika boyunca
çalkalama



Butların steril
numune poşetine
aktarılması



İnkübasyon sonrası
NA-MOX agarda
bakteri sayımı

Şekil 3.2. Piliç but gıda modelinde *L. monocytogenes*'in bakteriyofaj kokteyli ile biyokontrolü çalışması görüntüleri.

3.15. Deney Örneklerinde *L. monocytogenes* Sayısının ve Varlığının Belirlenmesi

Steril numune poşetlerinde, uygun muhafaza süresini tamamlamış olan, deneysel olarak NA-LM ile kontamine F ve K grubu piliç but örneklerine Rinse yöntemi ile 100 ml peptonlu su (Merck, 107214) ilave edildi. On katlı dilüsyonlar yapıldıktan sonra nalidiksik asit eklenmiş MOX agara (NA-MOX) ekimler 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben *L. monocytogenes* sayımları gerçekleştirildi. F grubunda NA-LM'in saptama sınırının altına düşmesi durumu göz önünde bulundurularak, plak sayımlarında *L.*

monocytogenes tespit edilemeyen örneklerden IMS bazlı kültür tekniği ile *L. monocytogenes* varlığı belirlendi.

3.16. *L. monocytogenes* Sayısındaki Redüksiyonun Belirlenmesi ve İstatistiksel Analizler

Bakteriyofaj katılan deney grubundaki (F grubu) *L. monocytogenes* sayısındaki redüksiyon, faj katılmamış kontrol grubu (K grubu) ile karşılaştırılarak koloni sayıları arasındaki fark kaydedildi. Oluşan farkın önemli olup olmadığı istatistiksel olarak analiz edildi.

Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen modellerdeki her bir kontaminasyon düzeyi kob/ml'den log'a çevrilerek, kontrol (K) ile faj (F) grupları arasındaki farklılıklar ve 3 tekrardan elde edilen ortalama değerler alındı. MOI'lerin hesaplanması için ise, ortalama başlangıç pob/ml her bir ulaşılan kontaminasyon düzeyindeki ortalama başlangıç kob/ml'ye bölündü. Bakteri sayısındaki azalmaların zaman ile ilişkisinin istatistiksel önemini ortaya koymak için bağımsız tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve istatistiksel bir önem gözleendiğinde Tukey'in HSD testi kullanıldı. İstatistik analizleri SPSS 15.0 istatistik paket programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Şubat 2016 – Ocak 2017 tarihlerini kapsayan bir yıllık sürede, iki farklı kanatlı mezbahasından toplam 120 piliç boyun derisi ve toplam 60 mezbaha atık suyu örneği toplandı. Piliç boyun derisi örneklerinde *L. monocytogenes* varlığı IMS bazlı kültür tekniği ile araştırıldı. İzolatlar, *hlyA* geni esas alınarak PCR ile doğrulandı, multipleks PCR ile serotiplendirmeleri yapıldı, başlıca virülens genlerinin varlığı real time RT-PCR ile belirlendi ve ERIC-PCR parmak izi analizi ile izolatlar arasındaki klonal ilişki ortaya kondu. Mezbaha atık sularından ise, *L. monocytogenes*'e litik etkili bakteriyofajlar izole edildi, restriksiyon enzimleri ile DNA'ları karşılaştırıldı ve fajlardan *L. monocytogenes*'in başlıca virülens genleri tespit edildi. Gıda modelinde kullanılmak üzere, izole edilen fajlardan üçü seçilerek konak *L. monocytogenes* suşuna in vitro ortamda litik etkisi ortaya kondu ve piliç but gıda modelinde *L. monocytogenes*'in bakteriyofaj kokteyli ile biyokontrolü araştırıldı.

4.1. Örneklerde *L. monocytogenes* Varlığı

Bir yıl süresince her üç aylık periyotta toplam 30 adet olacak şekilde toplanan 120 piliç boyun derisi örneğinin 20'sinden (% 16,7) 31 adet şüpheli *L. monocytogenes* kolonisi IMS bazlı kültür tekniği ile izole edildi. Örnekler, Bolu'da bulunan iki farklı kanatlı kesimhanesinden 60'ar adet toplanmış olup (C ve G), *L. monocytogenes* izolatlarının tamamı (% 100) G kodlu kesimhaneden izole edilmiştir (Tablo 4.1.)

Tablo 4.1. Tez çalışması süresince piliç boyun derisi örneklerinden elde edilen *L. monocytogenes*'lerin dağılımı.

Örnek		Mezbaha	IMS bazlı kültür izolat kodu
Dönem	No		
Kış (Şubat 2016)	P70	Bolu (G)	LM-P70
	P75	Bolu (G)	LM-P75
	P77	Bolu (G)	LM-P77
	P78	Bolu (G)	LM-P78-1
			LM-P78-2
			LM-P78-3
			LM-P78-4
	P80	Bolu (G)	LM-P80-1
			LM-P80-2
	Sonbahar (Eylül- Kasım 2016)	P156	Bolu (G)
LM-P156-2			
LM-P156-3			
LM-P156-4			
Kış (Aralık 2016-Ocak 2017)	P172	Bolu (G)	LM-P172-1
			LM-P172-2
	P173	Bolu (G)	LM-P173
	P174	Bolu (G)	LM-P174
	P175	Bolu (G)	LM-P175
	P176	Bolu (G)	LM-P176
	P177	Bolu (G)	LM-P177
	P178	Bolu (G)	LM-P178
	P179	Bolu (G)	LM-P179
	P180	Bolu (G)	LM-P180-1
			LM-P180-2
	P181	Bolu (G)	LM-P181-1
			LM-P181-2
	P183	Bolu (G)	LM-P183
	P184	Bolu (G)	LM-P184
	P185	Bolu (G)	LM-P185-1
			LM-P185-2
	P186	Bolu (G)	LM-P186

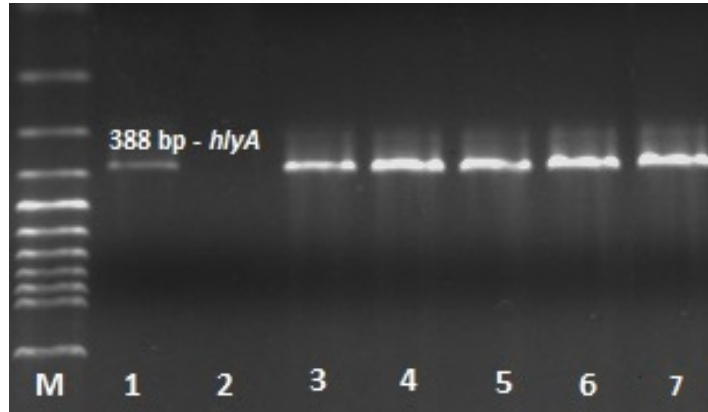
4.2. Mevsimsel Farklılık

Alınan piliç boyun derilerinde, mevsimsel dağılımın *L. monocytogenes* ile kontaminasyon düzeyi arasındaki ilişki incelendi. Verilerin istatistiksel olarak analizi amacıyla, örneklerin alındığı Kasım-Mart ayları arası soğuk dönem ve Nisan-Ekim ayları arası ise sıcak dönem olmak üzere iki grupta incelendi. Çalışma neticesinde soğuk dönemde 19, sıcak dönemde ise 1 *L. monocytogenes* izole edildi. Bu kapsamda, Ki kare testiyle yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *L. monocytogenes* ile piliç boyun derisi örneklerinin kontaminasyon düzeyinde mevsimsel etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p < 0,05$) (SPSS Statistics for Windows, Version 20.0).

4.3. PCR Sonuçları

4.3.1. Konvansiyonel PCR Sonuçları

Alınan örneklerden IMS bazlı kültür tekniği ile izole edilen *L. monocytogenes* izolatları *hlyA* gen sekansı kullanılarak PCR analizi ile incelendi. Analiz neticesinde 31 suşun tamamının (% 100) *hlyA* genine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.1.).

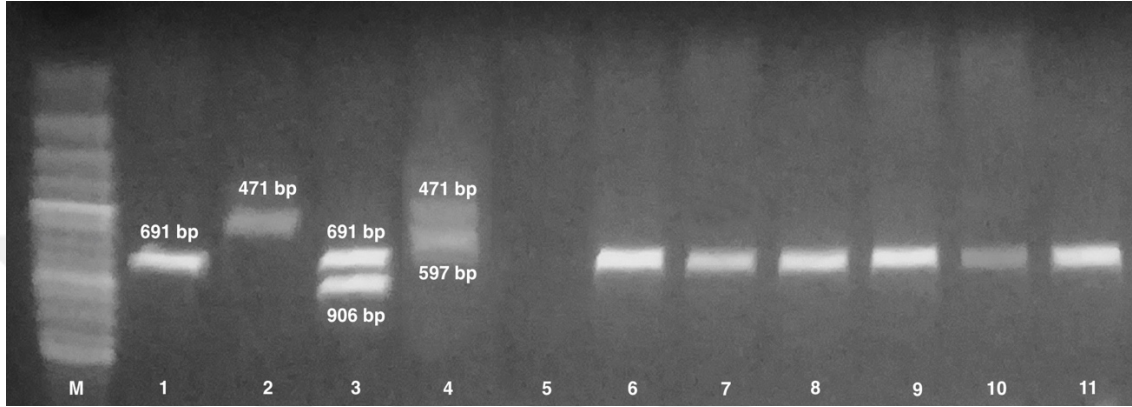


Şekil 4.1. *hlyA* geni tespit edilmiş *L. monocytogenes* izolatlarının elektroforez görünümü.

(M: 100 bp DNA marker. 1: Pozitif kontrol - *L. monocytogenes* ATCC 7644. 2: Negatif kontrol 3-7: *hlyA* pozitif *L. monocytogenes* izolatları)

4.3.2. Multipleks PCR Sonuçları

Piliç boyun derisi örneklerinden izole edilen ve PCR ile doğrulananan *L. monocytogenes* izolatlarının tamamı 1/2a (3a) (% 100) serotipi olarak identifiye edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *L. monocytogenes* izolatlarının 1/2a serotipi için 691 bp’da elde edilen elektroforez görüntüsü.

(M: 100 bp DNA marker. 1: Pozitif kontrol (1/2a serotipi) - *L. monocytogenes* ATCC 19111. 2 : Pozitif kontrol (1/2b serotipi) - *L. monocytogenes* N7155, 3: Pozitif kontrol (1/2c serotipi) - *L. monocytogenes* ATCC 7644, 4: Pozitif kontrol (4/b serotipi)- *L. monocytogenes* RSKK 475, 5: Negatif kontrol, 6-11: *L. monocytogenes*1/2a (3a) izolatları.

4.3.3. Real Time RT-PCR Sonuçları

L. monocytogenes izolatlarının başlıca virülens genlerinin (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *vip*, *fbpA* ve *fri*) ekspresyon düzeyleri real time RT-PCR ile belirlendi. *SpoG*’nin housekeeping gen olarak kullanıldığı analizde, tüm izolatların bu geni aynı düzeyde eksprese ettiği belirlendi. P75, P77, P78’de 6, P80’de 3, P156’da 4 gen yüksek düzeyde eksprese edilirken, P70 ve P172-P186 arasındaki izolatların tüm genlerinin normal düzeyde eksprese edildiği tespit edildi. Bununla birlikte, P78 izolatlarında *plcA*, P77 izolatında ise *inlJ* geninin düşük düzeyde eksprese edildiği belirlendi. Bu verilere göre, P75 izolatının diğer izolatlara göre virülens özelliğinin fazla olduğu tespit edildi. Bazı *L. monocytogenes* izolatlarının gen ekspresyonu sonuçları Tablo 4.2.’de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Bazı *L. monocytogenes* izolatlarının real time RT-PCR gen ekspresyonu sonuçları.

İzolat	Gen	Ortalama Cq	Normalize ekspresyon	Bağlı normalize ekspresyon	Regülasyon	Regüle edilmiş eşığe kıyasla ekspresyon
P70	<i>actA</i>	29,59	0,00211	111,11815	111,11815	Y
	<i>fbpA</i>	22,8	0,23317	N/A	N/A	DY
	<i>fri</i>	34,13	0,00009	2,23661	2,23661	DY
	<i>hlyA</i>	21,64	0,51909	0,58419	-1,71178	DY
	<i>inlA</i>	23,09	0,19022	8,00994	8,00994	Y
	<i>inlB</i>	22,17	0,35888	1,33682	1,33682	DY
	<i>inlC</i>	21,74	0,4847	3,69158	3,69158	DY
	<i>inlJ</i>	20,51	1,13737	1,83871	1,83871	DY
	<i>plcA</i>	21,44	0,59755	5,30111	5,30111	Y
	<i>plcB</i>	21,21	0,70233	449,01349	449,01349	Y
	<i>vip</i>	19,92	1,70768	N/A	N/A	DY
<i>spoG</i>	20,7	N/A	N/A	N/A	DY	
P75	<i>actA</i>	24,22	0,07689	4051,85417	4051,85417	Y
	<i>fbpA</i>	21,56	0,48508	N/A	N/A	DY
	<i>fri</i>	31,75	0,00042	10,27656	10,27656	Y
	<i>hlyA</i>	20,89	0,77226	0,86912	-1,1506	DY
	<i>inlA</i>	21,97	0,36668	15,44063	15,44063	Y
	<i>inlB</i>	22,05	0,34529	1,2862	1,2862	DY
	<i>inlC</i>	21,12	0,65951	5,02297	5,02297	Y
	<i>inlJ</i>	20,35	1,12129	1,81271	1,81271	DY
	<i>plcA</i>	20,14	1,29917	11,52555	11,52555	Y
	<i>plcB</i>	20,49	1,02111	652,8172	652,8172	Y
	<i>vip</i>	19,67	1,79708	N/A	N/A	DY
<i>spoG</i>	20,52	N/A	N/A	N/A	DY	
P77	<i>actA</i>	25,75	0,24806	7	13071,83487	Y
	<i>fbpA</i>	25,37	0,32236	N/A	N/A	DY
	<i>fri</i>	34,08	0,00077	19,13817	19,13817	Y
	<i>hlyA</i>	24,09	0,78809	0,88692	-1,12749	DY
	<i>inlA</i>	23,07	1,59797	67,28934	67,28934	Y
	<i>inlB</i>	23,34	1,32458	4,93398	4,93398	Y
	<i>inlC</i>	23,55	1,1399	8,68174	8,68174	Y
	<i>inlJ</i>	27,31	0,084	0,1358	-7,3636	D
	<i>plcA</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>plcB</i>	23,21	1,44113	921,34559	921,34559	Y
	<i>vip</i>	22,36	2,60696	N/A	N/A	DY
<i>spoG</i>	23,74	N/A	N/A	N/A	DY	

				20451,8910		
	<i>actA</i>	24,58	0,38811	2	20451,89102	Y
	<i>fbpA</i>	23,62	0,75887	N/A	N/A	DY
	<i>fri</i>	34,64	0,00037	9,03411	9,03411	Y
	<i>hlyA</i>	23,94	0,60524	0,68115	-1,46811	DY
	<i>inlA</i>	22,11	2,151	90,577	90,577	Y
P78	<i>inlB</i>	22,97	1,18887	4,42846	4,42846	Y
	<i>inlC</i>	23,14	1,05179	8,01069	8,01069	Y
	<i>inlJ</i>	22,41	1,75154	2,83159	2,83159	DY
	<i>plcA</i>	29,95	0,00941	0,08347	-11,9802	D
	<i>plcB</i>	23,4	0,88241	564,14676	564,14676	Y
	<i>vip</i>	22,14	2,10594	N/A	N/A	DY
	<i>spoG</i>	23,22	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>actA</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>fbpA</i>	37,63	0,05537	N/A	N/A	DY
	<i>fri</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>hlyA</i>	33,12	1,25686	1,41449	1,41449	DY
	<i>inlA</i>	35,46	0,24907	10,48809	10,48809	Y
P80	<i>inlB</i>	34,97	0,35005	1,30391	1,30391	DY
	<i>inlC</i>	35,13	0,31284	2,38263	2,38263	DY
	<i>inlJ</i>	33,52	0,9557	1,54502	1,54502	DY
	<i>plcA</i>	34,16	0,61281	5,43655	5,43655	Y
	<i>plcB</i>	34,09	0,64344	411,36882	411,36882	Y
	<i>vip</i>	32,22	2,34123	N/A	N/A	DY
	<i>spoG</i>	33,45	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>actA</i>	29,59	0,00211	111,11815	111,11815	Y
	<i>fbpA</i>	22,8	0,23317	N/A	N/A	DY
	<i>fri</i>	34,13	0,00009	2,23661	2,23661	DY
	<i>hlyA</i>	21,64	0,51909	0,58419	-1,71178	DY
	<i>inlA</i>	23,09	0,19022	8,00994	8,00994	Y
P156	<i>inlB</i>	22,17	0,35888	1,33682	1,33682	DY
	<i>inlC</i>	21,74	0,4847	3,69158	3,69158	DY
	<i>inlJ</i>	20,51	1,13737	1,83871	1,83871	DY
	<i>plcA</i>	21,44	0,59755	5,30111	5,30111	Y
	<i>plcB</i>	21,21	0,70233	449,01349	449,01349	Y
	<i>vip</i>	19,92	1,70768	N/A	N/A	DY
	<i>spoG</i>	20,7	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>actA</i>	22,63	0,10435	1,00000	1,00000	DY
	<i>fbpA</i>	27,95	0,00262	1,00000	1,00000	DY
	<i>fri</i>	33,02	0,00008	1,00000	1,00000	DY
	<i>hlyA</i>	20,04	0,62914	1,00000	1,00000	DY
	<i>inlA</i>	20,63	0,41737	1,00000	1,00000	DY
P172	<i>inlB</i>	19,95	0,66855	1,00000	1,00000	DY

	<i>inlC</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>inlJ</i>	19,79	0,74717	1,00000	1,00000	DY
	<i>plcA</i>	29,43	0,00094	1,00000	1,00000	DY
	<i>plcB</i>	24,18	0,03569	1,00000	1,00000	DY
	<i>vip</i>	22,47	0,11692	1,00000	1,00000	DY
	<i>spoG</i>	19,37	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>actA</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>fbpA</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>fri</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>hlyA</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>inlA</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
P178	<i>inlB</i>	39,45	0,04947	N/A	N/A	DY
	<i>inlC</i>	N/A	0,49764	0,56790	-1,76087	DY
	<i>inlJ</i>	36,12	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>plcA</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>plcB</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>vip</i>	34,85	1,19469	N/A	N/A	DY
	<i>spoG</i>	35,11	N/A	N/A	N/A	DY
	<i>actA</i>	24,98	0,07498	N/A	N/A	DY
	<i>fbpA</i>	23,64	0,19059	5,19404	5,19404	Y
	<i>fri</i>	34,57	0,00010	N/A	N/A	DY
	<i>hlyA</i>	21,35	0,93293	2,74832	2,74832	DY
ATCC	<i>inlA</i>	23,94	0,15478	1,86871	1,86871	DY
19111	<i>inlB</i>	23,17	0,26284	0,76861	-1,30106	DY
	<i>inlC</i>	23,21	0,25660	1,02922	1,02922	DY
	<i>inlJ</i>	21,40	0,89812	1,24526	1,24526	DY
	<i>plcA</i>	22,71	0,36162	1,69301	1,69301	DY
	<i>plcB</i>	21,76	0,070189	7,86385	7,86385	Y
	<i>vip</i>	36,24	0,00003	N/A	N/A	DY
	<i>spoG</i>	21,25	N/A	N/A	N/A	DY

DY: Değişiklik yok, Y: Yüksek, D: Düşük, Cq: Cycle quantification, siklus miktar ölçümü.

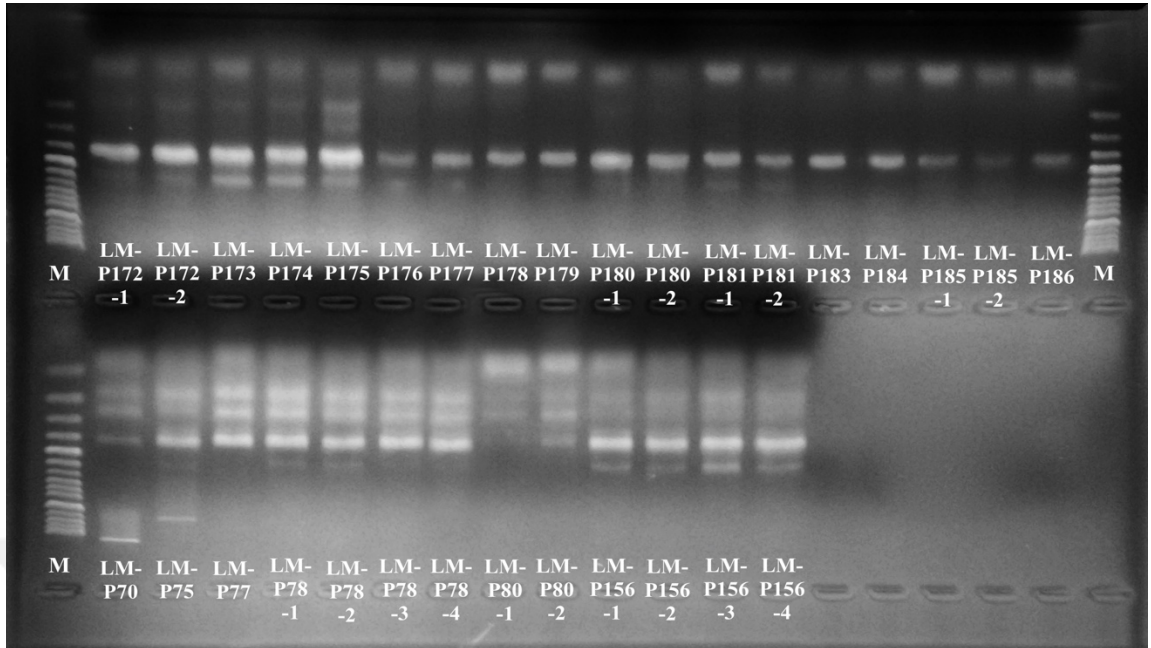
4.3.4. ERIC-PCR Sonuçları

ERIC-PCR analizi sonucunda elde edilen paternler DendroUPGMA dendrogram oluşturma uygulamasında işlenerek izolatların benzerlik matrisleri Jaccard katsayısına (Jaccard's coefficient) göre hesaplanarak dendrogramları oluşturuldu. Buna göre 31 izolatın toplam 7 farklı DNA profiline (Grup-1, Grup-2, Grup-3, Grup-4, Grup-5, Grup-6, Grup-7) sahip olduğu belirlendi. Buna göre, Grup 1'de ve Grup-2'de 1, Grup-3'de 3, Grup-4 ve Grup-7'de 9, Grup-5'de ve Grup-6'de ise 4 izolat bulunmaktadır (Tablo

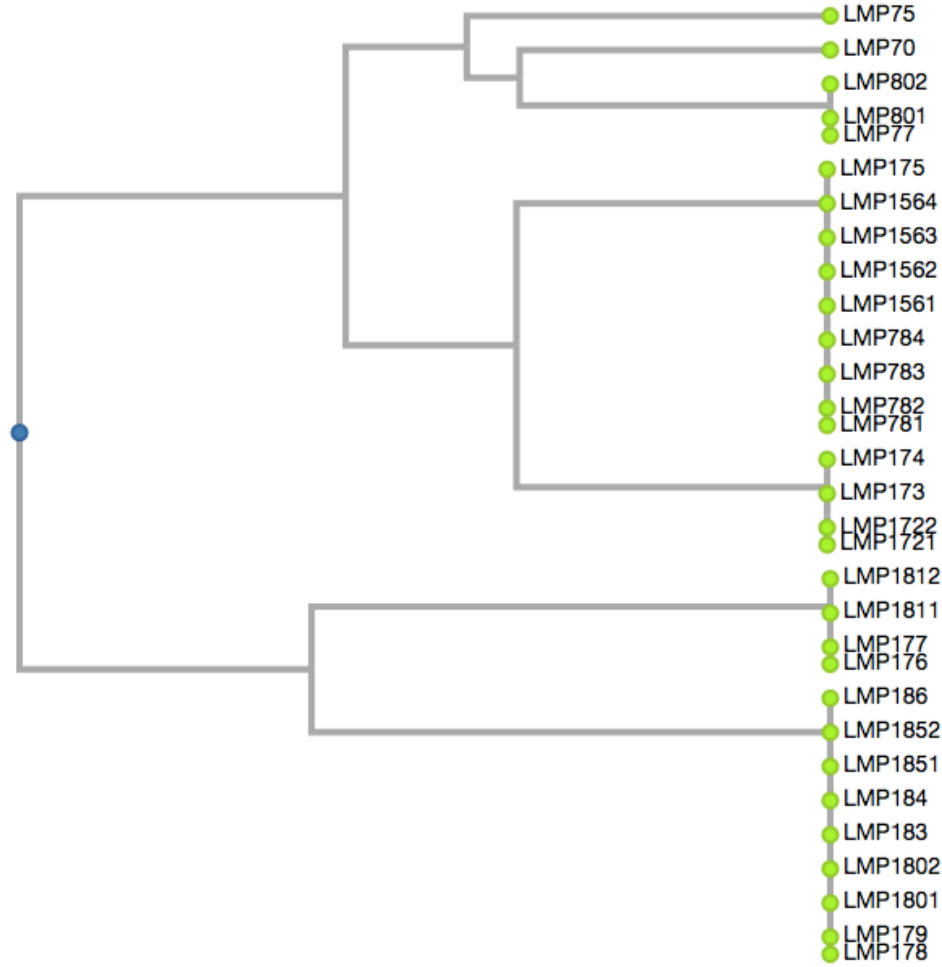
4.3.). Aynı örnekten izole edilen kolonilerin klonal olduğu tespit edildi. ERIC-PCR analizi neticesinde elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.3.'de, izolatlar arası klonal ilişkiyi gösteren dendrogram ise Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Piliç boyun derisi örneklerinden elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının dağılımı ve karakterizasyonu.

Örnek	Mezbaha	IMS bazlı kültür izolat kodu	PCR <i>hlyA</i>	PCR Serotip	ERIC-PCR Grup no	
Dönem	No					
Kış (Şubat 2016)	P70	Bolu (G)	LM-P70	+	1/2a (3a)	Grup-1
	P75	Bolu (G)	LM-P75	+	1/2a (3a)	Grup-2
	P77	Bolu (G)	LM-P77	+	1/2a (3a)	Grup-3
	P78	Bolu (G)	LM-P78-1	+	1/2a (3a)	Grup-4
			LM-P78-2	+	1/2a (3a)	Grup-4
			LM-P78-3	+	1/2a (3a)	Grup-4
			LM-P78-4	+	1/2a (3a)	Grup-4
	P80	Bolu (G)	LM-P80-1	+	1/2a (3a)	Grup-3
			LM-P80-2	+	1/2a (3a)	Grup-3
	Sonbahar (Eylül- Kasım) 2016)	P156	Bolu (G)	LM-P156-1	+	1/2a (3a)
LM-P156-2				+	1/2a (3a)	Grup-4
LM-P156-3				+	1/2a (3a)	Grup-4
LM-P156-4				+	1/2a (3a)	Grup-4
Kış (Aralık 2016-Ocak 2017)	P172	Bolu (G)	LM-P172-1	+	1/2a (3a)	Grup-5
			LM-P172-2	+	1/2a (3a)	Grup-5
	P173	Bolu (G)	LM-P173	+	1/2a (3a)	Grup-5
	P174	Bolu (G)	LM-P174	+	1/2a (3a)	Grup-5
	P175	Bolu (G)	LM-P175	+	1/2a (3a)	Grup-4
	P176	Bolu (G)	LM-P176	+	1/2a (3a)	Grup-6
	P177	Bolu (G)	LM-P177	+	1/2a (3a)	Grup-6
	P178	Bolu (G)	LM-P178	+	1/2a (3a)	Grup-7
	P179	Bolu (G)	LM-P179	+	1/2a (3a)	Grup-7
	P180	Bolu (G)	LM-P180-1	+	1/2a (3a)	Grup-7
			LM-P180-2	+	1/2a (3a)	Grup-7
	P181	Bolu (G)	LM-P181-1	+	1/2a (3a)	Grup-6
			LM-P181-2	+	1/2a (3a)	Grup-6
	P183	Bolu (G)	LM-P183	+	1/2a (3a)	Grup-7
	P184	Bolu (G)	LM-P184	+	1/2a (3a)	Grup-7
P185	Bolu (G)	LM-P185-1	+	1/2a (3a)	Grup-7	
		LM-P185-2	+	1/2a (3a)	Grup-7	
P186	Bolu (G)	LM-P186	+	1/2a (3a)	Grup-7	



Şekil 4.3. *L. monocytogenes* izolatlarının ERIC-PCR analizi jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.4. *L. monocytogenes* izolatlarının ERIC-PCR analizi sonucu dendrogramı.

((((LMP70:0.100,((LMP77:0.000,LMP801:0.000):0.000,LMP802:0.000):0.100):0.017,LMP750.117):0.039,(((((((LMP781:0.000,LMP782:0.000):0.000,LMP783:0.000):0.000,LMP784:0.000):0.000,LMP1561:0.000):0.000,LMP1562:0.000):0.000,LMP1563:0.000):0.000,LMP1564:0.000):0.000,LMP175:0.000):0.100,((LMP1721:0.000,LMP1722:0.000):0.000,LMP173:0.000):0.000,LMP174:0.000):0.100):0.055):0.105,(((LMP176:0.000,LMP177:0.000):0.000,LMP1811:0.000):0.000,LMP1812:0.000):0.167,(((((((LMP178:0.000,LMP179:0.000):0.000,LMP1801:0.000):0.000,LMP1802:0.000):0.000,LMP183:0.000):0.000,LMP184:0.000):0.000,LMP1851:0.000):0.000,LMP1852:0.000):0.000,LMP186:0.000):0.167):0.094).

4.4. Bakteriyofaj İzolasyonu ve Plak Karakterizasyonu

Bir yıl süresince toplanan 60 mezbaha atık suyu örneğinden 5 adet listeriyofaj izole edildi. Örnekler, Bolu'da bulunan iki farklı kanatlı kesimhanesinden 30'ar adet toplanmış olup (C ve G), listeriyofajların hepsi (% 100) G kodlu kesimhaneden izole edildi (Tablo 4.4.). Bakteriyofajların litik etki gösterdikleri referans suşlar Tablo 4.5.'de

gösterilmiştir. Spot ekim tekniği ile çift katlı petride plak oluşturan bakteriyofaj izolasyonunun dilüsyon ve plak görünümüne ilişkin fotoğraf Şekil 4.5.'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. Mezbaha atık sularından izole edilen *L. monocytogenes*'e litik etkili bakteriyofajlar.

Örnek Dönem	No	Mezbaha	Plak karakteri	İzole edildikleri konak <i>L. monocytogenes</i> suşları						
				19111	N7155	7644	N7143	5214	475	476
Yaz (Haziran- Ağustos 2016)	M116	Bolu (G)	1-2 mm çaplı berrak zon	z	+	-	+	+	+	+
	M117	Bolu (G)	1-2 mm çaplı berrak zon	+	z	+	+	+	+	+
	M119	Bolu (G)	1-2 mm çaplı berrak zon	-	z	-	+	-	-	-
Sonbahar (Eylül- Kasım 2016)	M131	Bolu (G)	1-2 mm çaplı berrak zon	+	+	+	z	+	+	z
	M135	Bolu (G)	1-2 mm çaplı berrak zon	+	+	+	z	+	+	z

M: Mezbaha atık suyu; **1911:** *L. monocytogenes* ATCC 19111 (serotip 1/2a); **N7155:** *L. monocytogenes* N7155 (serotip 1/2b); **7644:** *L. monocytogenes* ATCC 7644 (serotip 1/2c); **N7143:** *L. monocytogenes* N7143 (serotip 3a); **5214:** *L. monocytogenes* NCTC 5214 (serotip 4a), **475:** *L. monocytogenes* RSKK 475 (serotip 4b); **476:** *L. monocytogenes* RSKK 476 (serotip 4c); **z:** zayıf litik etki

Tablo 4.5. Bakteriyofajların litik etki profilleri.

Bakteri	M	M	M	M	M	Bakteri	M	M	M	M	M
	116	117	119	131	135		116	117	119	131	135
LM ATCC19111 (1/2a)	Z	P	P	Z	P	LM-P179	P	P	P	P	P
LM N7155 (1/2b)	P	Z	P	P	P	LM-P180-1	P	P	P	P	P
LM ATCC 7644 (1/2c)	N	P	N	N	P	LM-P180-2	P	P	P	P	P
LM N7143 (3a)	P	P	P	N	N	LM-P181-1	P	P	P	P	P
LM NCTC 5214 (4a)	P	P	N	P	P	LM-P181-2	P	P	P	P	P
LM RSKK 475 (4b)	P	P	P	P	P	LM-P183	P	P	P	P	P
LM RSKK 476 (4c)	P	P	N	P	P	LM-P184	P	P	P	P	P
LM RSKK 02028	P	P	P	P	P	LM-P185-1	P	P	P	P	P
LM-S20-1	P	P	P	N	P	LM-P185-2	P	P	P	P	P
LM-S20-2	P	P	P	N	P	LM-P186	P	P	P	P	P
LM-P10-1	P	P	P	P	P	LM002 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P10-2	P	P	P	P	P	LM008 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P20-1	P	P	P	N	P	LM012 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P20-2	P	P	P	N	P	LM021 (4b)	P	P	P	P	P
LM-S49-1	P	P	P	N	P	LM026 (4b)	P	P	P	P	P

LM-S50-1	P	P	P	P	P	LM036 (4b)	P	P	P	P	P
LM-S50-2	P	P	P	P	P	LM044 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P41-1	P	P	P	N	P	LM051 (1/2a)	P	P	P	P	P
LM-P41-2	P	P	P	P	P	LM057 (1/2c)	P	P	N	N	P
LM-P48-1	P	P	P	P	P	LM058 (1/2c)	P	P	N	N	P
LM-P51-1	P	P	P	P	P	LM064 (1/2c)	P	P	N	N	P
LM-P51-2	P	P	P	P	P	LM066 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-K61-1	P	P	P	P	P	LM070 (4b)	P	P	P	P	P
LM-K79-1	P	P	P	P	P	LM072 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-K80-1	P	P	P	P	P	LM077 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-K80-2	P	P	P	P	P	LM081 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-K80-3	P	P	P	P	P	LM095 (1/2b)	P	P	P	P	P
LM-K80-4	P	P	P	P	P	LM100 (4b)	P	P	P	P	P
LM-K80-5	P	P	P	P	P	LM110 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-S61-1	P	P	P	P	P	LM112 (1/2b)	P	P	P	P	P
LM-P70-1	P	P	P	P	P	LM114 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-P75-1	P	P	P	P	P	LM116 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-P77-1	P	P	P	P	P	LM128 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-P78-1	P	P	P	P	P	LM130 (1/2b)	P	P	P	P	P
LM-P78-2	P	P	P	P	P	LM132 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P78-3	P	P	P	P	P	LM136 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-P78-4	P	P	P	P	P	LM157 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-P80-1	P	P	P	P	P	LM159 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-P80-2	P	P	P	P	P	LM161 (1/2a)	P	P	P	N	P
LM-P156-1	P	P	P	P	P	LM173 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P156-2	P	P	P	P	P	LM174 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P156-3	P	P	P	P	P	LM178 (4b)	P	P	P	P	P
LM-P156-4	P	P	P	P	P	<i>E. coli</i>	N	N	N	N	N
						O157:H7					
LM-P172-1	P	P	P	P	P	<i>E. faecium</i>	N	N	N	N	N
LM-P172-2	P	P	P	P	P	<i>E. faecalis</i>	N	N	N	N	N
LM-P173	P	P	P	P	P	<i>S.</i>	N	N	N	N	N
						Typhimurium					
LM-P174	P	P	P	P	P	<i>A. hydrophila</i>	N	N	N	N	N
LM-P175	P	P	P	P	P	<i>Y.</i>	N	N	N	N	N
						<i>enterocolitica</i>					
LM-P176	P	P	P	P	P	<i>R. equi</i>	N	N	N	N	N
LM-P177	P	P	P	P	P	<i>C. perfringens</i>	N	N	N	N	N
LM-P178	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	N	N	N	N	N

N: Negatif; P: Pozitif; Z: Zayıf litik etki



Şekil 4.5. Faj kokteylinde kullanılan listeriyofajların plak görüntüsü.

4.5. Restriksiyon Enzimleriyle Faj DNA'larını Karşılaştırılması

Çalışmada *Clal* ve *SacI* enzimleriyle (NEB, New England Biolabs) muamele edilen ve elektroforez jeli üzerinde görüntülenen faj DNA'larının aynı profile sahip olduğu tespit edildi.

4.6. Bakteriyofajlardan *L. monocytogenes*'in Başlıca Virülens Genlerinin Tespiti Sonuçları

Yapılan real time RT-PCR analizi neticesinde, listeriyofaj izolatlarının tümünde *L. monocytogenes*'in başlıca virülens genlerinin (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *vip*, *fbpA* ve *fri*) tamamının eksprese edildiği belirlendi.

4.7. Bakteriyofajların Asidik pH Değerlerini ve Çeşitli Sıcaklık Derecelerini Tolere Etme Özellikleri

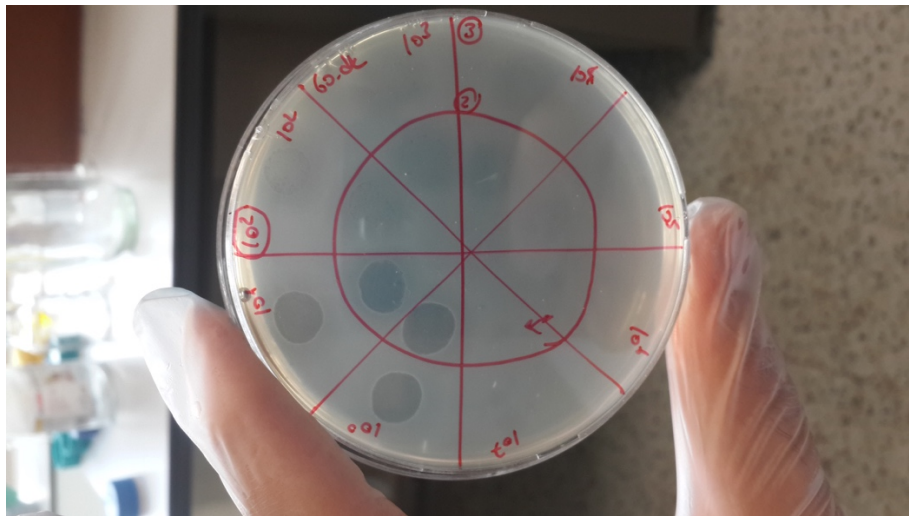
Her iki pH değerinde de (pH 3,0 ve 4,0) bakteriyofajların 10. dakikadan itibaren hızla canlılıklarını kaybettikleri dolayısıyla belirtilen pH değerlerini tolere edemedikleri belirlendi.

Tüm bakteriyofajların 60°C'lik inkubasyonun 10. dakikasından itibaren hızla canlılıklarını yitirdikleri gözlemlendi. Ancak, 50°C'lik inkubasyonun 10. dakikasında tüm fajların litik etkinliklerinin devam ettiği ve çift katlı petride plak oluşturdukları, 30. dakikada ise M117, M119 ve M135 nolu fajların bu sıcaklığı tolere edebildiği ancak litik etkinliklerinin zayıfladığı belirlendi. İnkubasyonun 60. dakikasında ise, hiçbir fajın petride plak oluşturamadığı dolayısıyla M117, M119 ve M135 kodlu fajların 50°C'lik sıcaklığı ancak 30 dakika tolere edebildikleri belirlendi. Listeriyofajların asidik pH değerlerini ve yüksek sıcaklık derecelerini tolere etme sonuçları Tablo 4.6.'da, buna ilişkin plak görüntüsü ise Şekil 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Listeriyofajların asidik pH değerlerini ve yüksek sıcaklık derecelerini tolere etme sonuçları.

Zaman	pH		Sıcaklık	
	pH 4,0	pH 3,0	50°C	60°C
10 dakika	-	-	+	-
30 dakika	-	-	z	-
60 dakika	-	-	-	-

-: Plak oluşumu gözlenmedi. +: Plak oluşumu gözlemlendi. z: Zayıf plak oluşumu gözlemlendi.



Şekil 4.6. Fajların asidik pH ve çeşitli sıcaklık değerlerini tolere etme özelliklerinin araştırıldığı çalışmaya ilişkin plak görüntüsü.

4.8. Bakteriyofaj Konak Spesifite ve Litik Etki Spektrumunun Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen bakteriyofajların hiçbirinin non-*L. monocytogenes* referans suşlar üzerine litik etki göstermediği tespit edildi. Bununla birlikte, fajların çalışmada kullanılan 83 farklı *L. monocytogenes* suşu üzerinde farklı yelpazede litik etki profiline sahip oldukları belirlendi ve bu veriler doğrultusunda M117, M119 ve M135 kodlu fajların çalışmada kullanılan *L. monocytogenes*'ler üzerine en geniş spektrumda litik etkiye sahip oldukları tespit edildi.

4.9. *L. monocytogenes* ATCC 19111 Suşunda Nalidiksik Asit (NA) Direncinin Geliştirilmesi

TSB'de 37°C' de bir gece zenginleştirilen nalidiksik aside dirençli hale getirilmiş referans *L. monocytogenes* ATCC 19111 (NA-LM19111)'in; hem 50 µg/ml NA içeren MOX agarda (NA-MOX) hem de içermeyen MOX agar'da sayımları yapılarak, geliştirilen NA-direnci doğrulandı. Buna göre her iki petride de inkübasyon sonunda aynı sayıda ($2,2 \times 10^{10}$ kob/ml) *L. monocytogenes* kolonisinin ürediği belirlenerek geliştirilen direnç teyit edildi.

4.10. Faj Kokteyli için Seçilen Bakteriyofajların In-Vitro Litik Etkinliklerinin Tespiti

Faj kokteylinin, 10^2 kob/ml düzeyinde bakteri bulunan kültüründe ilk yarım saatten itibaren kuvvetli litik etki göstererek *L. monocytogenes*'i tamamen ortadan kaldırdığı belirlendi. 10^4 kob/ml düzeyinde bakteri bulunan kültürde 30. dakikada yapılan bakteri sayımında 3 log'luk bir düşüş gözlemlendi ve sonraki sayımlarda bakteri sayısı tespit sınırının altında kaldı. 10^6 kob/ml düzeyinde bakteri bulunduran kültürde ise, ilk yarım saatte 2 log'luk bir düşüşün ardından, 6. saate kadar olan sayımlarda bakteri sayısının yaklaşık 1 log azalarak düşmeye devam ettiği, bununla birlikte 24. saatte bakteriyofaja direnç gösteren hücrelerin çoğalarak 3 log seviyesine, 48. saatte ise 6 log seviyesine ulaştığı belirlendi. Bakteri sayımları ile eş zamanlı olarak yapılan faj sayımlarında ise, 10^8 düzeyinde katılan bakteriyofaj kokteylinin 60. dakikada 10^9 seviyesine ulaştığı, 3 saatte ise 10^{10} pob/ml'ye ulaşarak 48. saatin sonuna kadar bu seviyede devam ettiği tespit edildi. *L. monocytogenes*'in 600 nm'de ölçülen OD değerleri Tablo 4.7.'de, bakteri ve bakteriyofaj sayım sonuçları ise Tablo 4.8.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.7. NA-LM19111'in yapılan seri dilüsyonlarına göre 600 nm'de ölçülen OD değerleri.

Dilüsyon oranı	600 nm OD	NA-LM19111 sayısı (kob/ml)
0,0	1.128	$6,6 \times 10^{10}$
0.1	0.232	$6,6 \times 10^9$
0.01	0.092	$6,6 \times 10^8$
0.001	0.018	$6,6 \times 10^7$
0.0001	0.001	$6,6 \times 10^6$

Tablo 4.8. Belirli saatlerde yapılan NA-LM19111 sayımı ve bakteriyofaj sayımı sonuçları.

Zaman	Bakteri sayımı (log kob/ml)			Bakteriyofaj sayımı (log pob/ml)		
	10^2	10^4	10^6	10^2	10^4	10^6
0. dakika	2,28	4,17	6,9	8,84	8,84	8,84
30. dakika	-	1,7	4,34	8,84	8,84	8,84
60. dakika	-	-	3,32	9,6	9,78	9,84
90. dakika	-	-	3,0	9,78	9,9	9,95
3. saat	-	-	2,78	10,0	10,2	10,47
6. saat	-	-	1,3	10,6	10,3	10,47
24. saat	-	-	3,82	10,7	10,7	10,78
48. saat	-	-	6,47	10,47	10,6	10,7

Tespit sınırı: 1 kob/ml - : Tespit edilmedi.

4.11. Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması

Yapılan faj duyarlılık profili testi neticesinde analiz edilen *L. monocytogenes* izolatlarına en geniş spektrumda litik etki gösteren M117, M119 ve M135 kodlu fajlar ile bir faj kokteyli hazırlandı. Bu amaçla, seçilen her bir faj bir gece öncesinde TSB'de 37°C'de zenginleştirilmiş (Nüve EN120) olan *L. monocytogenes* konak hücresi kültürlerinde çoğaltılarak, 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün steril 0,22

µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril tüplere aktarıldı. Her bir seçilen faj, ayrı ayrı konak hücrede zenginleştirildi ve gıda modelinde kullanılmadan hemen önce her biri yaklaşık 10^9 pob/ml sayısı olacak şekilde ve eşit hacimde karıştırıldı.

4.12. Piliç Butlarında *L. monocytogenes*'in Bakteriyofaj Kokteyli ile Biyokontrolü

Piliç but gıda modelinde, 2,32 log kob/ml düzeyinde kontamine edilen grupta 1. saatten itibaren *L. monocytogenes*'in tespit edilemeyecek seviyeye gerilediği; 4,6 log kob/ml düzeyinde kontamine edilen grupta 1. saatten itibaren 2,34 log kob/ml düzeyinde redüksiyona uğradığı; 6,6 log kob/ml düzeyinde kontamine edilen grupta ise en yüksek redüksiyonun 3,30 log kob/ml ile 3. saatte olduğu gözlemlendi. Çalışmada, piliç butlarının bakteriyofaj içeren soğutma suyuna daldırılmasıyla başlangıç kontaminasyon düzeyine kıyasla *L. monocytogenes* sayısında önemli ölçüde redüksiyonun sağlandığı ve 4°C'de muhafazada bakteri sayısında belirgin bir yeniden artışın gözlenmediği belirlendi. Bu kapsamda, üç farklı fajdan oluşan kokteylin *L. monocytogenes* biyokontrolünde etkili olduğu sonucuna varıldı. Piliç but gıda modelinde *L. monocytogenes*'lerde muhafaza süresince bakteri sayım sonuçları ve görülen redüksiyon miktarı Tablo 4.9. ile Tablo 4.10'da belirtilmiştir. MOI 4,18 ve 6,46 log [pob/kob]/ml kontaminasyon düzeylerinde tespit edilen redüksiyon miktarlarına ilişkin grafik Şekil 4.7.'de belirtilmiş olmakla birlikte, MOI 2,18 log [pob/kob]/ml kontaminasyon düzeyindeki gıda modelinde *L. monocytogenes* sayısı muhafazanın 1. saatinden itibaren tespit sınırının altında kaldığından grafikte gösterilememiştir. Deneye ilişkin görüntüler ise Şekil 4.8.'de sunulmuştur.

Tablo 4.9. Piliç but gıda modelinde kontrol ve deney gruplarında muhafaza sürelerine göre *L. monocytogenes* sayım sonuçları.

Zaman	<i>L. monocytogenes</i> sayısı - log (kob/ml)					
	Kontrol Grubu			Fajlı Grup		
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ²	10 ⁴	10 ⁶
0. dk	2,32	4,60	6,60			
1. saat	2,30	4,34	5,30	< 2,00 ^a	2,00	2,30
3. saat	2,70	3,20	5,30	< 2,00 ^a	2,00	2,00
6. saat	2,78	3,00	5,84	< 2,00 ^a	2,30	3,00
24. saat	3,00	3,00	5,84	2,3	2,30	3,04

^a : Tespit sınırı olan 2,00 log kob/ml'nin altında kalan bakteri sayısı.

Tablo 4.10. Piliç but gıda modelinde *L. monocytogenes* sayısında görülen redüksiyon miktarları.

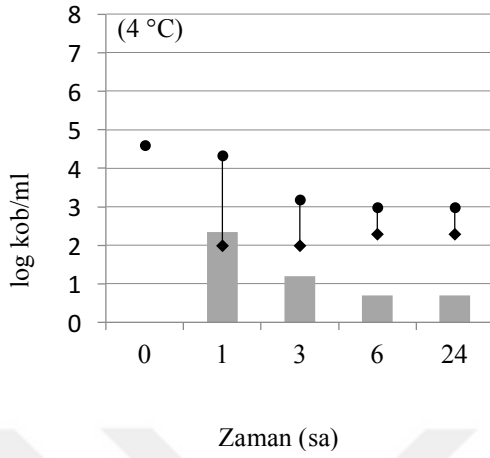
Başlangıç Bakteriyofaj sayısı (log pob/ml)	Başlangıç MoI (log [pob/kob]/ml) ^c	Başlangıç Bakteri sayısı (log kob/g)	Muha-faza sıcaklığı (°C)	Ortalama redüksiyon (log kob/ml)			
				1 s ^b	3 s ^b	6 s ^b	24 s ^b
8,78	6,46	2.32	4	0,3-2,32 ^a	0,7-2,70 ^a	0,78-2,78 ^a	0,7
8,78	4,18	4.60		2,34	1,20	0,7	0,7
8,78	2,18	6.60		3,00	3.30	2,84	2,80

^a : Tespit edilmeyen bakteri sayımlarına ait veriler için kötü senaryo olarak minimum redüksiyon değeri tespit sınırı olan log 2,00 kob/ml, iyi senaryo olarak ise kontrol grubundaki bakteri sayısı kullanılmış olup, redüksiyon bu değerler arasında gerçekleşmiştir.

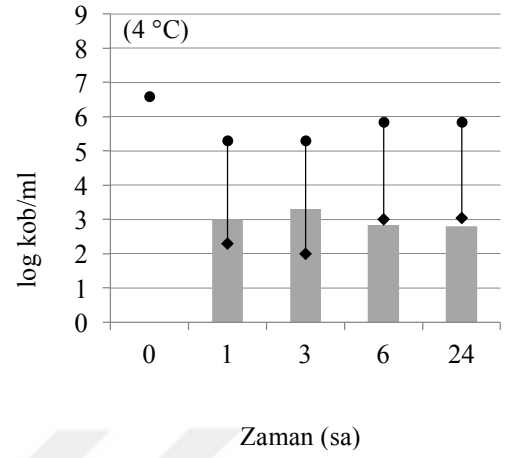
^b : K ve F grupları arasında saatler arasındaki redüksiyon değerleri anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

^c : Farklı MOI değerleri ile elde edilen redüksiyonda istatistiksel olarak bir anlam gözlemlenmedi ($p > 0,05$).

MOI 4,18



MOI 6,46



Şekil 4.7. Piliç but gıda modelinde MOI 4,18 ve 6,46 log [pob/kob]/ml kontaminasyon düzeylerinde tespit edilen redüksiyon miktarları.

4.13. İstatistiksel Analizler

Piliç but gıda modeli faj denemeleri sonucunda elde edilen verilerin Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey HSD testi neticesinde; MOI 6,46, MOI 4,18 ve MOI 2,18'in bakteriyofaj kokteyli katılmış gruplarında meydana getirmiş olduğu *L. monocytogenes* sayısındaki redüksiyon, farklı saatlerdeki muhafaza süreleri bazında incelendiğinde saatler arasındaki redüksiyon farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,05$) ortaya kondu. Buna göre, en yüksek redüksiyon MOI 2,18'de, 4°C'de 3 saatlik muhafaza sonucunda 3,30 log kob/ml olarak elde edildi. Bununla birlikte, piliç but gıda modelinde bakteriyofaj uygulamasına bağlı *L. monocytogenes* sayısında elde edilen redüksiyonda MOI değerleri arasındaki farkın önemsiz olduğu ($p > 0,05$) belirlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, iki farklı kanatlı mezbahasından bir yıllık sürede toplanan piliç boyun derisi örneklerinin % 16,7'sinden (20/120) *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Osaili ve ark. (381) yaptıkları bir çalışmada, kanatlı mezbahasından topladıkları 160 piliç boyun derisi örneğinin 15'inden (% 9,4) *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sakaridis ve ark. (32)'nin dört farklı mezbahadan aldıkları 100 piliç boyun derisini inceledikleri çalışmada, örneklerin % 99'unun *Listeria* spp. ve % 38'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu rapor edilmiştir. Skovgaard ve Morgen (184) Danimarka'da yaptıkları bir çalışmada ise, piliç boyun derisi örneklerinin % 47'sinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Avrupa'da çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in tavuk karkaslarında ve çiğ tavuk eti ürünlerinde % 10-61 arasında bir prevalansa sahip olduğu görülmektedir. Buna göre, İngiltere'de yapılan bir çalışmada çiğ tavuk etlerinin % 60'ının (382), Norveç'te tavuk karkaslarının % 61'inin (383), Belçika ve Fransa'da broyler piliç karkaslarının sırasıyla % 10 ve %15'inin (384), İspanya'da tavuk karkas parçalarının % 13'ünün (385) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu bildirilmiştir.

ABD'de ise *L. monocytogenes* prevalansı Cox ve ark. (386) tarafından tavuk karkaslarında % 25, Bailey ve ark. (387) tarafından ise % 23 olarak rapor edilmiştir. Lawrence ve Gilmour (388), çiğ ve pişmiş kanatlı eti işleyen tesislerden aldıkları numunelerde *L. monocytogenes* prevalansının sırasıyla % 26 ve % 15 olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, bu tesislerde üretilerek satışa sunulan çiğ etlerde % 59 gibi yüksek bir *L. monocytogenes* kontaminasyonu bildirmelerine karşın, pişmiş etlerde bakteriyi izole edemediklerini belirtmişlerdir. Bu durum, tüketim öncesinde uygulanan sıcaklık işleminin önemini vurgulamaktadır. Cook ve ark. (389)'nın Kanada'da yaptıkları bir çalışmada derili ve derisiz piliç göğüs örnekleri *L. monocytogenes* varlığı yönünden karşılaştırılmış ve derili örneklerde prevalans % 34

olarak tespit edilirken, derisiz örneklerde % 15 olarak bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca, en sık izole edilen serotipin 1/2a olduğu belirtilmiştir. Kanada'da yapılan bir başka çalışmada ise, çiğ tavuk butlarında *L. monocytogenes* prevalansı % 34 olarak saptanmıştır (190).

Dünya çapında pek çok ülkede de kanatlı etlerinde *L. monocytogenes* prevalansına ilişkin sonuçlar bildirilmiştir. Buna göre, Japonya'da tavuk karkas parçalarında % 15 (390), Tayland'da marketlerde satışa sunulan çiğ tavuk etlerinde % 13,9 (391), Malezya'da piliç but, göğüs ve kalçalarında % 20 (392), Nijerya'da piliç etlerinde % 95,8 (393), Hindistan'da marketlerde satışa sunulan piliç etlerinde ise % 8,5 (394) olduğu belirtilmektedir.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise, çiğ tavuk etlerinde ve karkaslarında prevalansının % 11,5 - 29,3 arasında, hindi eti ve kıymalarında ise % 12,7 - 51,4 arasında olduğu bildirilmektedir (180, 181, 367, 395, 396, 397).

ABD ve Kanada'da kanatlı kesim prosesinde karkaslara dekontaminasyon ajanı olarak klorin, perasetik asit, setilprinydium klorid gibi maddeler kullanılıyor olmasına rağmen, kimyasal ajan olarak sadece klor kullanımının yasal olduğu AB ve Türkiye'de *L. monocytogenes* prevalanslarının birbirinden çok farklı olmadığı dikkati çekmektedir.

Kanatlı mezbahaları ve kanatlı eti işleme tesislerinde *L. monocytogenes*'in varlığına dair yapılan çalışmalar, etkenin kanatlı etlerine ve ürünlerine bulaşmasında mezbahaların önemini vurgulamaktadır. İskandinav ülkelerinde kanatlı mezbahalarında yapılan bir çalışmada patojenin prevalansının % 20,6-24,1 arasında olduğu bildirilmiştir (398). Danimarka'da yapılan bir çalışmada, 7 kanatlı mezbahasından alınan örneklerde % 0,3-18,7 arasında bir prevalans gözlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda, bu mezbahalara broyler sağlayan kümeslerdeki tavuklardan da dışkı örnekleri alınmış ancak, örneklerin *L. monocytogenes* yönünden negatif olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, broyler üretiminde *L. monocytogenes*'in öncelikle mezbahada lokalize olduğu sonucuna varmışlardır (399). Miettinen ve ark. (400)'nin yaptıkları bir çalışmada ise, kanatlı kombinalarında *L. monocytogenes* prevalansının % 1-19 arasında değiştiği bildirilmiştir. Ayrıca, et işleme tesislerinde yapılan araştırmalarda bu çalışmanın bulgularına benzer bir şekilde *L. monocytogenes* 1/2a serotipinin en sık izole edilen serotip olduğu belirtilmektedir (399, 401, 402).

Bu çalışmada, mevsimsel farklılığın piliç boyun derilerinin *L. monocytogenes* ile kontaminasyon ilişkisi incelenmiştir. Soğuk dönemde (Kasım-Mart) 19, sıcak dönemde ise (Nisan-Ekim) bir *L. monocytogenes* izole edilmiş ve Ki kare testiyle yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *L. monocytogenes* ile piliç boyun derisi örneklerinin kontaminasyon düzeyinde mevsimsel etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu çalışma sonuçlarına benzer nitelikte Lovett ve ark. (403) ABD’de yaptıkları bir çalışmada, çiğ sütlerden izole ettikleri *L. monocytogenes*’lerde insidensin soğuk aylarda yüksek, sıcak aylarda ise düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, kanatlı etlerinde (404, 405) ve kanatlı mezbahalarında (398) *L. monocytogenes* prevalansına dair yapılan bazı çalışmalarda etkenin mevsimsel olarak bir farklılık göstermediği belirtilmiştir.

Listeria türlerinin aranmasında, numunelerin zenginleştirilmesinin ardından hedef mikroorganizmayı ortamdan ayırmak ve yoğunluğunu arttırmak için kullanılan immuno manyetik seperasyon (IMS) tekniğinin, izolasyon prosedüründeki bir günlük kısalmanın yanı sıra selektivitenin ve hassasiyetin artmasında da rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (395, 406, 407). Ayrıca, PCR tekniği günümüzde gıda kaynaklı patojenlerin hızlı bir şekilde tespiti, identifikasyonu ve ayırımında rutin olarak kullanılan bir metot olarak yerini almıştır (408) ve *L. monocytogenes* de dahil olmak üzere birçok bakteri izolatının doğrulanmasında etkin olarak kullanılmaktadır (371, 395, 409, 410).

Çalışmada, *L. monocytogenes*’in başlıca 11 virülens geninin varlığına ve ekspresyon düzeylerine bakılmış olup, housekeeping gen olarak *spoG* kullanılmıştır. Tüm izolatların genlerin hepsine sahip olduğu belirlenmiş, bununla birlikte birbirleri ve housekeeping gen ile kıyaslandıklarında genleri farklı düzeylerde eksprese ettikleri tespit edilmiştir. Buna göre, diğer izolatlarla karşılaştırıldığında P75 izolatının daha fazla geni yüksek düzeyde eksprese ettiği tespit edilmiş, dolayısıyla diğer izolatlara kıyasla virülens özelliğinin fazla olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda hidrostatik basınç, yüksek sıcaklık, düşük pH gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak virülens genlerin ekspresyon seviyelerinin artıp azalabildiği ve bu durumun *L. monocytogenes*’in çevresel koşullara direncinde ve patojenitesinde etkili olduğu ifade edilmiştir (154, 155, 411). Liu ve ark. (158)’nin yaptıkları bir çalışmada, yüksek hidrostatik basınç uygulandıktan sonra hayatta kalan *ctsR* mutant 2-1 suşunun gen ekspresyon profilini izlemek amacıyla

mikroarray tekniğinin yanı sıra real time RT-PCR kullanılmış ve mutant suştaki stres ile ilişkili genlerin artan seviyelerdeki ekspresyonunun, mutantın yüksek hidrostatik basınç altında hayatta kalmasında rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

Hücrelerin temel fonksiyonlarının sağlanabilmesi için gerekli olan yapısal proteinleri kodlayan housekeeping genlerin, real time PCR gibi gen ekspresyon deneylerinde kullanılmadan önce validasyonlarının yapılması gerektiği belirtilmektedir (412). Liu ve Ream (372) tarafından *L. monocytogenes* F2365 suşunun virülens genlerinin incelendiği bir çalışmada, test edilen 16SrRNA, gyrase B ve *spoG* housekeeping genlerinden *spoG*'nin, bu üç gen içinde en tutarlı eşik siklusu (CT, treshold cycle) değerlerini gösterdiği ve ölçüm için en uygun housekeeping gen olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada izole edilen 31 izolatın ERIC-PCR analizi yapılarak, izolatların serotipleri aynı olmasına karşın (1/2a [3a]) 7 farklı DNA profiline sahip oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmanın bulgularına benzer bir şekilde Indrawattana ve ark. (391), marketlerde satışa sunulan çiğ tavuk, sığır ve domuz etlerinden izole ettikleri toplam 22 *L. monocytogenes* izolatının tümünün 4b serotipine ait olmasına ve aynı virülens genlere sahip olmalarına rağmen, ERIC-PCR analizi neticesinde DNA parmak izlerinin farklı profillere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, genotiplendirmenin serotiplendirme ile karşılaştırıldığında daha yüksek ayırmacı özelliği olduğunu vurgulamışlardır. Chen ve ark. (413) ise, tüketime hazır gıdalardan izole ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının farklı serotiplere sahip olduklarını tespit etmiş ancak, farklı serotiplerdeki bazı izolatlarda aynı DNA profillerini gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Bunun sebebi, araştırmacılar tarafından ERIC primerlerinin çoğaltılan hedef DNA bölgesi için serotip spesifik olmaması ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada ise, kanatlı kombinalarının çeşitli noktalarından ve bu kombinada üretilen çiğ piliç etlerinden örnekler alınmış ve kombinalarda *L. monocytogenes* prevalansı % 1-19 arasında saptanırken, çiğ piliç etlerinin % 62'sinin etken ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Çalışmada aynı zamanda izolatlara pulsed field jel elektroforezi de yapılmış ve mezbaha ile çiğ ette izole edilen bazı izolatların aynı DNA profiline sahip olduğu belirtilmiştir (400).

Bu çalışmada, genel olarak aynı zaman diliminde alınan örneklerden elde edilen izolatların benzer DNA profiline sahip oldukları görülmüştür. Bu durum, kesim öncesinde veya sonrasında piliçler arasında bir çapraz kontaminasyonun şekillenmiş

olabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte, Grup-4’de olduğu gibi aynı kesimhaneden, farklı zaman diliminde alınan ancak aynı DNA profiline sahip olan izolatlar da söz konusudur. Bu durum ise kontaminasyonun yüksek ihtimalle mezbahadan kaynaklandığını düşündürmekle birlikte, bulaşma kaynağının net olarak ortaya konabilmesi için kesim öncesi aşamada kümeslerden, altlıktan, yemden, sudan hatta teknik personelden de örnek alınması gerekmektedir.

Yapılan çalışmalarda fajların, kanalizasyondan (313), atık su arıtma tesisinden (414), koyun dışkılarından (365), silajdan (415), süt işleme tesisinden (44) ve deniz suyundan (350) izole edilebildiği ortaya konmuştur. Bununla birlikte, bu çalışmaya benzer bir şekilde ABD’de yapılan bir çalışmada hindi mezbahası ve işleme tesislerinden *Listeria*-spesifik 12 faj izole edilmiş, ardından fajların konak spektrumu analizleri yapılarak iki fajın *L. monocytogenes* suşları üzerinde güçlü litik etkisi olduğu belirlenmiştir (379). Listeriyofaj vB_LmoM_AG20 ise, Kanada’nın Ontario eyaletindeki et işleme tesislerinin atık sularından izole edilen bir başka *L. monocytogenes*’e litik etkili faj olarak bildirilmiştir (380).

Bu çalışmada fajların izolasyonunda kullanılan çift katlı agara spot ekim yöntemi, fajların ilk keşfinden bu yana kullanılan (329) ve etkinliği birçok araştırmacı tarafından da ortaya konmuş bir metottur (44, 357, 364, 416). Ayrıca çalışmada kullanılan LB agarın, bakterilerin yüksek konsantrasyonlarda üreyebilmesine olanak sağlayan zengin bir içeriği olması dolayısıyla, bakteriyofajların oluşturduğu plakların daha net bir şekilde görünmesine olanak sağladığı bildirilmektedir (417). Bununla birlikte, Kutter ve Sulakvelidze (329), pek çok fajın bakteri yüzeyine tutunabilmesi için Ca^{+2} veya Mg^{+2} gibi katyonlara ihtiyaç duyduğunu ve bu tip kofaktörlerin besi yerinde bulunmasının plak büyüklüğüne katkı sağlayacağını belirtilmektedir. Bu bilgiler ile paralel olarak, bu çalışmanın ön hazırlık aşamasında yapılan deneyler esnasında $CaCl_2$ içermeyen LB agarlarda fajların plak oluşturma kapasitelerinin $CaCl_2$ içerenlere göre çok daha düşük olduğu, ayrıca bakterinin çift katlı besi yerinde yeterince türbidite oluşturamadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, Leverentz ve ark. (314)’nın Mg ilavesinin fajların litik etkinliğini artırıp artırmadığını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, Mg kaynağı olarak magnezyum aminoasit şelatı kullanmanın fajdan ziyade bakteri çoğalmasını desteklediğini, dolayısıyla faj etkinliğini arttırmak için Mg’un katkı maddesi olarak kullanılmasını önermediklerini bildirmişlerdir.

Çalışmada tüm fajların agar üzerindeki plak karakterlerinin aynı olduğu tespit edilmiştir (1-2 mm çaplı, berrak zonlu). Arachchi ve ark. (380), yaptıkları bir çalışmada üç farklı listeriyofajın plak karakterlerini değerlendirmişler ve bu tez çalışmasının bulgularına benzer bir şekilde 0,5 ile 1,5 mm arasında değişen çaplara sahip olduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, çift katlı petride kullanılan agaroz konsantrasyonunun farklı oranlarda kullanılmasının plak karakterini etkilediğini belirtmişlerdir.

Kim ve ark. (379) hindi eti işleme tesislerinden izole ettikleri iki listeriyofajın DNA'sını *ClaI* restriksiyon enzimi ile muamele etmiş ve her iki fajın farklı zamanlarda, farklı tesislerden izole edilmesine rağmen oldukça benzer nükleotid sekans fragmentlerine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Çalışmada aynı zamanda, 20422-1 kodlu fajın ticari listeriyofaj preparatlarından olan P100 ve A511 ile de homolog bir DNA profili gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, aynı tesislerden izole edilen *L. monocytogenes* suşlarına karşı her iki fajın da A511 fajına kıyasla farklı litik konak spektrumu etkinliği göstermesini, izole edilen fajların *Listeria* ekolojisindeki potansiyel rollerinin ayrı olmasının bir göstergesi olmasıyla ilişkilendirmişlerdir. Balık işleme tesisi atık sularından faj izole edilen bir başka çalışmada ise, izole edilen üç fajın DNA'ları *ClaI* ve *SacI* enzimleri ile kesilerek ticari A511 fajı ile karşılaştırılmış ve LiMN4p kodlu fajın A511 ile yakınlık gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde diğer iki fajın DNA profillerinin aynı olduğu bildirilmiş, LiMN4p kodlu fajın ise *ClaI* enzim profilinin diğerlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar DNA profilleri aynı olsa da, farklı litik konak spektrumlarına sahip olmaları sebebiyle bu üç fajın birbirlerinden farklı olduklarını rapor etmişlerdir (380).

Bu çalışmada, izole edilen bakteriyofajların tümünde *L. monocytogenes*'in başlıca virülens genlerinin (*hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *vip*, *fbpA* ve *fri*) tamamının eksprese edildiği belirlenmiştir. Bu durum, faj ile konak arasındaki gen entegrasyonu sebebiyle konakta bulunan virülens genlerin fajlarda da eksprese edilmesi ile ilişkilendirilebilir. Bakteriyofajların, kodladıkları virülens genleri infekte ettikleri bakterilere aktarabildikleri bildirilmektedir (418, 419). Carlton ve ark. (44) ticari P100 fajının gen sekans analizi sonucunda *L. monocytogenes*'in patojenitesini direkt ya da indirekt olarak etkileyecek hiçbir virülens gen dizilimine ya da proteinine sahip olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen fajların da, ticari preparat haline

getirilmeden önce gen sekans analizlerinin yapılarak virülens genlerin aktarım potansiyeli yönünden incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, fajların asidik pH değerleri (pH 3,0 ve 4,0) ile yüksek sıcaklık değerlerini (50°C ve 60°C) tolere etme özellikleri incelenmiş ve fajların düşük pH değerleri ile 60°C sıcaklığı tolere edemediği, 50°C'ye ise 30 dakika kadar dayanabildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına benzer bir şekilde, üç listeriyofajın 50°C ve 60°C'lerdeki duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada, listeriyofajların sıcaklığa duyarlı oldukları belirtilmiştir. Buna göre, 50°C sıcaklıkta faj LiMN17'nin 10 dakikada tespit sınırının (< 1 log pob/ml) altında kaldığı, faj LiMN4p'nin 3 log azaldığı, faj LiMN4L'nin ise 60 dakikada sadece % 7'sinin hayatta kaldığı bildirilmiştir. 60°C'de ise, ilk 10 dakikada faj LiMN4L'nin sadece % 10'u hayatta kalabilirken, diğer iki fajın tamamen yok olduğu belirtilmiştir (380). Olsen ve ark. (420) ise, *Pseudomonas* fajlarını 60°C'de hayatta kalabilme yüzdelerine göre iki gruba ayırmışlardır. Buna göre, araştırmacılar psikotrofik fajların oluşturduğu grubun 60°C'de 10 dakikada yıkımlandığını, mezofilik fajlardan oluşan grupta ise fajların 60°C'ye 60 dakika maruz kalmalarına rağmen % 40'ının hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışma esnasında listeriyofaj izolatlarının en iyi üreyebildikleri sıcaklık 30°C olarak belirlenmiş, bu sebeple tüm faj inkübasyonları 30°C'de gerçekleştirilmiştir. Olsen ve ark. (420)'nin bulguları ışığında, bu çalışmada izole edilen fajlar psikotrofik olarak kategorize edilebilir. Bununla birlikte, çalışmada elde edilen fajların düşük pH değerleri ile orta-yüksek sıcaklık değerlerine duyarlı olmaları, özellikle uygulandıkları gıdada tüketim öncesinde uygulanacak işlemlerle kolayca yıkımlanabildiklerini ortaya koyması açısından bir avantaj olarak değerlendirilmiştir. Bu durum, alkali bir özelliğe sahip olan ve pişirildikten sonra tüketilen taze piliç etlerinde faj uygulamasının ideal bir gıda modeli olduğunu desteklemektedir.

Leverentz ve ark. (314)'nin yaptıkları bir çalışmada, faj kokteyli ile nisin kombinasyonu elma dilimlerine uygulanmış ve *L. monocytogenes* üzerindeki etkisinin yanı sıra, fajların asidik ortamdaki (pH < 5,0) litik etkinlikleri incelenmiştir. Araştırmacılar, faj sayısının düşük pH'da çok hızlı bir şekilde azaldığını ve tespit sınırının altına düştüğünü bildirmişlerdir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, fajların olumsuz koşullara karşı sahip olduğu direncin ait oldukları familya ile yakından ilişkili olduğu ve düşük/yüksek

sıcaklık, pH, tuz ile iyonlar gibi olumsuz fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı dirençte önemli rol oynadığı belirtilmektedir (421).

Faj terapilerinde birden fazla fajın kullanılmasının bakterilerin fajlara dirençli hale gelmesini kontrol altına aldığı ya da geciktirdiği belirtilmekle birlikte (39, 422), biyokontrol çalışmalarında bu durum özellikle geniş konak spektrumunu sağlayabilmek amacıyla tercih edilmektedir (423). O'Flynn ve ark. (424)'nın *E. coli* O157:H7'ye litik etki gösteren üç fajın in-vitro ortamda tek ve kokteyl halinde kullanarak etkinliklerini ortaya koydukları bir çalışmada, bakteri üremesinin optimal olduğu sıcaklıkta faj kokteylinin tek faj uygulamasına kıyasla bakteri sayısında daha yüksek bir düşüşe sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada faj kokteylinin litik etkinliği, piliç but gıda modelinde kullanılmadan önce in-vitro ortamda üç farklı bakteri kontaminasyonu uygulanarak 37°C'deki muhafazada 10^6 , 10^4 ve 10^2 pob/kob/ml MOI'lerde test edilmiştir. Buna göre, in-vitro ortamda en yüksek redüksiyon değerine bakteri başına düşen faj sayısının en fazla olduğu 10^6 pob/kob/ml MOI'de ulaşılmıştır. Yapılan araştırmalar bu deney sonucunu destekler nitelikte, yüksek MOI değerlerinde bakteri redüksiyonunda daha başarılı sonuçlar elde edildiğini ortaya koymaktadır (359, 364, 425).

Piliç but gıda modelinde ise, in-vitro analiz ile paralel bir şekilde 10^2 , 10^4 ve 10^6 kob/g kontaminasyon düzeyleri kullanılarak üç farklı MOI elde edilmiş ve bu farklı MOI seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla gıdada meydana getirdiği bakteri redüksiyonları karşılaştırılmıştır. Biyokontrol çalışmalarında fajların etkinliğinin gıdadaki başlangıç bakteri düzeyi ile yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir. Leverentz ve ark. (314) faj kokteyli ile elma ve kavun dilimlerinde etkenin *L. monocytogenes*'in biyokontrolünü araştırdıkları çalışmada, başlangıç bakteri popülasyonunun daha düşük olduğu konsantrasyonda faj uygulamasının daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir şekilde Guenther ve ark. (426)'nın yaptıkları çalışmada, aynı düzeyde (10^3 kob/ml(g)) *L. monocytogenes* ile kontamine edilen çeşitli gıdalara 10^6 - 10^8 pob/ml(g) düzeylerinde faj uygulayarak iki farklı MOI değerinin bakteri sayısındaki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, yüksek MOI'nin bakteri popülasyonunda daha yüksek düşüş meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Bigot ve ark. (365), izole ettikleri bir listeriyofajı bu çalışmada kullanılan materyale benzer bir şekilde tavuk göğüslerinde *L. monocytogenes*'in dekontaminasyonu amacıyla uygulamışlar ve en iyi sonucun birim

alan başına düşen yüksek faj sayısının artmasıyla sağlanabildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Dykes ve Moorhead (313)'in yaptıkları bir çalışmada 10^6 kob/cm² olacak şekilde kontamine ettikleri sığır etlerini (2,5 x 2,5 x 2,5 cm) 10^3 pob/ml düzeyindeki faj ile muamele etmiş ve bakteri sayısındaki düşüşün anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Ancak araştırmanın sonucu, Hagens ve Loessner (309) tarafından düşük faj konsantrasyonu kullanılmasına bağlanmış ve deneyde cm² başına düşen bakteri sayısının 1000 olmasına rağmen faj sayısının 0,5-1 olması sebebiyle fajın etkinlik gösterememesi ile ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada ise, gıda modelinde en yüksek redüksiyon değerine MOI'nin en düşük olduğu değerde ulaşılmıştır. Bunun sebebi MOI'den bağımsız olarak, ortamdaki bakteri sayısının artmasıyla fajların infekte edebileceği daha fazla bakteri bulması şeklinde açıklanabilir. Bu durum, 10^2 kob/ml düzeyinde bakteri bulunan grupta (en yüksek MOI) 24. saat sayımına kadar bakteri sayısının tespit sınırın (2 log kob/ml) altında kalması ile 10^4 kob/ml düzeyinde bakteri ile bulunan grupta ilk 1 saat içerisinde 2 log'dan fazla düşüş sağlaması ile ortaya konmaktadır. Tüm gruplara aynı seviyede faj inokule edilmesine rağmen 10^6 kob/ml düzeyinde bakteri bulunan grupta, başlangıç bakteri sayısının diğer iki gruba kıyasla daha yüksek olması sebebiyle, fajlar daha fazla sayıda bakteriyi infekte edebilmiş ve redüksiyon 3. saatte 3,30 log'a kadar ulaşabilmiştir. Bu redüksiyon değeri, kontrol grubundaki bakteri sayısı göz önüne alındığında *L. monocytogenes* sayısının % 99,9'unun yıkımlandığını ortaya koymaktadır. Gıdaya özgü uygulama protokollerinin optimizasyonun yapılmasını takiben, bu yüzdenin pek çok biyokontrol çalışmasında elde edilebileceği Hagens ve Loessner (309) tarafından da bildirilmektedir. Bu durum, elde edilen fajların sadece bu tez çalışmasında kullanılan piliç butlarında değil, daha pek çok gıda modelinde de uygulanabilir olduğunu işaret etmektedir.

L. monocytogenes'in olumsuz çevresel koşullara dayanma ve düşük sıcaklıklarda çoğalabilme yeteneği sebebiyle, etkenin biyokontrolünde faj uygulamalarının üretim sürecinin son basamaklarında ya da paketlenme esnasında kullanılmasının en uygun seçenek olduğu bildirilmektedir (308). Bu çalışmada, fajların piliç kesim prosesinin son basamaklarından biri olan soğutma ya da son yıkama suyuna katılması ile karkaslardaki *L. monocytogenes* sayısında anlamlı bir düşüş sağlanabileceği ortaya konmuştur ($p < 0,05$). Ayrıca, *Listeria* salgınlarında yer alan gıdaların genellikle gram veya mililitre

başına 3 log bakteri içerdiği göz önüne alındığında (427), bu çalışmada elde edilen listeriyofajların *L. monocytogenes* sayısının tüm kontaminasyon düzeyleri için (10^2 , 10^4 ve 10^6 kob/ml) yeterli seviyede redüksiyon sağladığı belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca, bakteriyofaj izolatlarının TÜBİTAK 114R104 no'lu proje kapsamında elektron mikroskobu ile morfolojileri belirlenmiş ve in-vivo akut toksisite deneyleri de gerçekleştirilmiştir. Buna göre, elektron mikroskobunda gösterdikleri morfolojik özelliklere göre fajların, *Caudovirales* takımı *Myoviridae* familyasında oldukları tespit edilmiştir. Balb-c farelerde gerçekleştirilen in-vivo akut toksisite deneyi neticesinde ise, fajlarının herhangi bir akut toksik etkisinin olmadığı ve yapılan patolojik incelemede hayvanların yemek borusu, mide, duodenum, jejunum, ileum, cecum ve colonunda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen listeriyofajların piliç kesim prosesinde soğutma veya son yıkama suyuna eklenmesi ile *L. monocytogenes*'in biyokontrolünün sağlanabileceği ortaya konmuştur. Bu noktada birkaç husus önem arz etmektedir. Mali yönden bakıldığında, yaklaşık 2,5 kg'lık bir piliç karkası için 1,5 lt soğutma suyuna 15 ml 10^{10} pob/ml bakteriyofaj kokteylinin katılması yeterli gözükmektedir. Bakteriyofajları üretim maliyetinin düşük olduğu ve yerli bir ürün olduğu göz önüne alındığında, piliç üretimine önemli ek bir maliyet getirmemektedir. Bir diğer husus ise, ülkemizde bakteriyofajların biyokontrol ajanı olarak gıdalara uygulanmasıyla ilgili henüz yasal bir düzenlemenin bulunmamasıdır. Ülkemizde de FDA ve EFSA onayları model alınarak gıdalarda patojenlerin kontrolünde bakteriyofaj kullanımının yasal zemine kavuşturulması önem arz etmektedir. Bununla birlikte, fajların fakmakokinetiği, sistemik yan etkileri, gen aktarım potansiyelleri (antibiyotik direnç genleri, virülens genler, toksin genler vb.) gibi konuların hala tam olarak ortaya konmamış olması fajların hem yasal zemine oturtulmasında hem de tüketicilerin faj içeren gıdaları tercih etmesinde problem teşkil etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada bir yıl süresince iki farklı kanatlı mezbahasından toplanan 120 piliç boyun derisinden 20'sinin (% 16,7) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Aynı süre içerisinde toplanan 60 kanatlı mezbahası atık suyundan ise *L. monocytogenes*'e litik etkili fajlar izole edilmiştir. İzole edilen *L. monocytogenes*'lerin ve bakteriyofajların detaylı bir şekilde karakterizasyonları yapılmış, faj izolatlarının konak spesifiteleri, plak karakterizasyonları, litik etki spektrumları ve DNA profilleri

göz önünde bulundurularak üç faj, kokteyl oluşturmak amacıyla seçilmiş ve daha önce denenmemiş bir gıda modeli olan piliç butlarında *L. monocytogenes*'in biyokontrolü amacıyla kullanılmıştır. Bu tez çalışması ile, tavuk etinin *L. monocytogenes* açısından potansiyel bir risk kaynağı olabileceğinin ortaya konmasının yanı sıra, elde edilen faj kokteylinin kanatlı mezbahalarında son yıkama ya da soğutma aşamasında piliç karkasları veya parça etlerindeki *L. monocytogenes*'lerin dekontaminasyonunda uygulanabilir olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, seçilen fajların gıdalarda *L. monocytogenes*'in biyokontrolünde kullanılmak üzere ticarileşme potansiyeli olabileceği ortaya konmuştur. Bu kapsamda ileriki çalışmalarda, listeriyofajların gen sekans analizlerinin yapılması, belirli muhafaza şartlarındaki raf ömrünün tespit edilmesi ve farklı gıda modellerinde uygulanabilirliğinin araştırılması gibi ek araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Bowman JP, Bittencourt CR, Ross T. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology* 2008; 154: 462-75
2. Bell C, Kyriakides A. *Listeria*: a practical approach to the organism and its control in foods. Springer Science and Business Media, North Yorkshire, 2012.
3. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17
4. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015; 13
5. Team EE. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles. European Communicable Disease Bulletin* 2012; 17
6. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, De Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 734
7. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991; 55: 476-511
8. Lyytikäinen O, Autio T, Maijala R et al. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J Infect Dis* 2000; 181: 1838-1841
9. Cosgrove S, Cronquist A, Wright G et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe—United States, August-September 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011; 60: 1357-1358
10. Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD et al. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1-9
11. Roche SM, Velge P, Bottreau E et al. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Intl J Food Microbiol.* 2001; 68: 33-44
12. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 2007; 71: 133-1340
13. Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 1992; 60: 1263-1267
14. Bustin S, Benes V, Nolan T, Pfaffl M. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601
15. Eleaume H, Jabbouri S. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *J Microbiol Methods* 2004; 59: 363-370
16. Jeršek B, Gilot P, Gubina M et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 103-109

17. Chen BY, Pyla R, Kim TJ, Silva JL, Jung YS. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. *Food Microbiol* 2010; 27: 645-252
18. Chen M, Wu Q, Zhang J, Yan Za, Wang J. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. *Food Control* 2014; 38: 1-7
19. Göğüş A. Et teknolojisi. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. 1986; 991.
20. Arslan P. Tavuk etinin sağlıklı beslenme için önemi. BESD-BİR yayınları, http://www.sagliklitavuk.org/assets/userfiles/files/uzmanlardan/Tavuk_Etinin_Saglikli_Beslenme_Icin_Onemi.pdf (19.02.2018).
21. Kahraman Z. Türkiye beyaz et sektörü http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/d24d7c78bb96fc2_ek.pdf (20.02.2018).
22. BESD-BİR (Beyaz Et Sanayicileri ve Damızlıkçıları Birliği Derneği). İstatistikler 2017. <http://www.besd-bir.org/istatistikler> (18.05.2018)
23. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Data 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (18.05.2018)
24. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif yayınları, Ankara, 2007
25. İşeri Ö, Erol İ. Hindi etinden kaynaklanan başlıca bakteriyel infeksiyon ve intoksikasyonlar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2009; 56: 47-54
26. Rørvik L, Aase B, Alvestad T, Caugant D. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 633-640
27. Lopez V, Ortiz S, Corujo A et al. Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish broiler abattoir. *Poult Sci* 2008; 87: 1874-1882
28. Arslan A. Et muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi. Medipres, Malatya, 2002
29. Şireli U, Erol İ. Hazır kıymalarda *Listeria* türlerinin araştırılması. *Turk J Vet Anim Sci* 1999; 23: 373-380
30. Doğru AK, Gençay YE, Ayaz ND. Comparison of virulence gene profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* chicken neck skin and faeces isolates. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 129-133
31. Citak S, Duman T. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* from raw chicken samples in Turkey: Prevalence and antimicrobial resistance. *J Food Agri Environ* 2011; 9: 156-158
32. Sakaridis I, Soultos N, Iossifidou E et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated in chicken slaughterhouses in Northern Greece. *J Food Prot* 2011; 74: 1017-1021
33. Garin B, Gouali M, Wouafo M et al. Prevalence, quantification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. on chicken neck-skins at points of slaughter in 5 major cities located on 4 continents. *Int J Food Microbiol* 2012; 157: 102-107
34. Lakicevic B, Nastasijevic I. *Listeria monocytogenes* in retail establishments: Contamination routes and control strategies. *Food Rev Int* 2016; 33: 247-269
35. USDA Food Safety and Inspection Service (FSIS). FSIS compliance guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. 2014
36. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, 29 Aralık 2011, sayı: 28157

37. Brüssow H, Kutter E. Phage ecology. In: Kutter E, Sulakvelidze A (eds), *Bacteriophages: Biology and Applications*. New York, CRC Press, 2005: p 129-163
38. Ackermann HW. Phage classification and characterization. In: Kropinski ABM, Clokie MRJ (eds), *Bacteriophages: Methods and Protocols Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Totowa, Humana Press, 2009: p 127-140
39. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* 2013; 8: 769-783
40. Campbell A. General aspects of lysogeny. In: Calendar R (ed), *The Bacteriophages*. 2 nd ed. New York, Oxford University Press, 2006: 66-73
41. Abedon ST. *Phages, Ecology, Evolution*. United Kingdom, Cambridge University Press, 2008: 1-28
42. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald G, Ross R. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett Appl Microbiol* 2005; 41: 274-279
43. Arachchi G, Mutukumira AN, Dias-Wanigasekera BM et al. Characteristics of three listeriaphages isolated from New Zealand seafood environments. *J Appl Microbiol* 2013; 115: 1427-1438
44. Carlton R, Noordman W, Biswas B, De Meester E, Loessner M. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005; 43: 301-312
45. Burrell MM. *Enzymes of Molecular Biology*: Totowa, Humana Press, 1993.
46. Roberts RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 5905-5908
47. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci* 1971;68 :2913-2917
48. Stern A, Sorek R. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays* 2011; 33: 43-51.
49. Murry E, Webb R, Swann M. Disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacterium *Bacillus monocytogenes* (n. Sp.). *J Pat Bact* 1926; 29: 407-439.
50. Pirie JH. A new disease of veld rodents 'tiger river disease'. *Publ S Afr Inst Med Res* 1927; 3: 163-187
51. Nyfeldt A. Etiologie de la mononucleose infectieuse. *CR Soc Biol* 1929; 101: 590-591
52. Schultz E, Terry M, Brice Jr A, Gebhardt L. Bacteriological Observations on a Case of Meningo-Encephalitis *Proc Soc Exp Biol Med*. 1934; 31: 1021-1023
53. Gill DA. Ovine bacterial encephalitis (circling disease) and the bacterial genus *Listerella*. *Aust Vet J* 1937; 13: 46-56
54. Pirie JH. The genus *Listerella pirie*. *Science* 1940; 91: 383
55. Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. New York, CRC Press, 2007.
56. Bergey DH. *Determinative Bacteriology*. JSTOR; 1934.
57. Sneath P, Mair N, Sharpe M, Holt J. The mycobacteria. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2*. Williams Wilkins Co, Baltimore, 1986; 1435-1457
58. Roccourt J, Grimont F, Grimont PA, Seeliger HP. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes sensu lato*. *Curr Microbiol* 1982; 7: 383-388.

59. Larsen HE, Seeliger H. A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. Proceedings of the third international symposium on listeriosis Bilthoven, The Netherland, 1966.
60. Welshimer H, Meredith AL. *Listeria murrayi* sp. n.: a Nitrate-Reducing Mannitol-Fermenting *Listeria*. Int J Syst Evol Microbiol 1971; 21: 3-7.
61. Seeliger H. Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. Clin Invest Med 1983; 7: 217-221.
62. Rocourt J, Grimont PA. Notes: *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 1983; 33: 866-869
63. Seeliger HP, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont PA, Jones D. *Listeria ivanovii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 1985; 35: 126
64. Stuart M, Pease PE. A numerical study on the relationships of *Listeria* and *Erysipelothrix*. Microbiology. 1972; 73:551-565
65. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti J-C. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. Int J Syst Evol Microbiol 1992; 42: 171-174
66. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60: 1280-1288
67. Leclercq A, Clermont D, Bizet C et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60: 2210-2214
68. Halter EL, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013; 63: 641-647
69. Bertsch D, Rau J, Eugster MR et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. Int J Syst Evol Microbiol 2013; 63: 526-532
70. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol 2014; 64: 1882-1889
71. Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. Int J Syst Evol Microbiol 2015;65: 286-292
72. Leclercq A, Tessaud Rita N, Bracq Dieye H, T et al. *Listeria thailandensis* sp. nov. isolated from food in Thailand. Problems of Listeriosis, Isopol XIX, 14–17 June 2016, Paris, France.
73. World Organisation for Animal Health (OIE). *Listeria monocytogenes* OIE Terrestrial manual 2014.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.09.06_LISTERIA_MONO.pdf (28.10.2017)
74. Wiedmann M. New *Listeria* species: genomics and beyond. Problems of Listeriosis, Isopol XIX, 14–17 June 2016, Paris, France.
75. Rasmussen OF, Skouboe P, Dons L, Rossen L, Olsen JE. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. Microbiology. 1995; 141: 2053-2061
76. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Listeria* annual summary 2011- National Enteric Disease Surveillance. <https://www.cdc.gov/listeria/pdf/listeria-annual-summary-2011-508c.pdf> (18.10.2017)

77. Jadhav S, Bhavne M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. J Microbiol Methods 2012; 88: 327-341
78. Borucki MK, Call DR. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 5537-5540
79. Gilot P, Genicot A, Andre P. Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. J Clin Microbiol 1996; 34: 1007-1010
80. Seeliger H, Höhne K. Chapter II serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Methods in Microbiology 1979; 13: 31-49
81. Seeliger H, Jones D. Genus *Listeria*-Bergey's manual of systematic bacteriology. 1986; 2: 1235-1245
82. Doyle M. Foodborne Bacterial Pathogens. New York, CRC Press, 1989.
83. Rocourt J, Buchrieser C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: Ryser ET, Marth EH (eds), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. New York, CRC Press, 2007: p 1-20
84. Vos P, Garrity G, Jones D et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology-Volume 3: The Firmicutes. Springer Science and Business Media, 2011.
85. Vázquez-Boland J, Domínguez L, Fernández-Garayzábal J, Suárez G. *Listeria monocytogenes* CAMP reaction. Clin Microbiol Rev 1992; 5: 343
86. Fernandez-Garayzabal J, Suarez G, Blanco M, Gibello A, Dominguez L. Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*. Int J Syst Evol Microbiol 1996; 46: 832-834
87. Huang G, Hussain MA. Advances in proteomics-based detection techniques of *Listeria monocytogenes*: a potential risk in New Zealand. J Food Safety 2012; 14: 70-74
88. Schmid B, Klumpp J, Raimann E et al. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. Appl Environ Microbiol 2009; 75: 1621-1627
89. Zheng W, Kathariou S. Host-mediated modification of Sau3AI restriction in *Listeria monocytogenes*: prevalence in epidemic-associated strains. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 3085-3089
90. Doyle ME, Mazzotta AS, Wang T, Wiseman DW, Scott VN. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 2001; 64: 410-429
91. Lunden J, Tolvanen R, Korkeala H. Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. Lett Appl Microbiol 2008; 46: 276-80
92. Jørgensen F, Hansen TB, Knøchel S. Heat shock-induced thermotolerance in *Listeria monocytogenes* 13-249 is dependent on growth phase, pH and lactic acid. Food Microbiol 1999; 16: 185-194
93. Golden DA, Beuchat LR, Brackett RE. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. Food Microbiol 1988; 5: 17-23
94. Mackey B, Pritchett C, Norris A, Mead G. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. Lett Appl Microbiol 1990; 10: 251-255
95. Casadei R, Harrison ST, Gaze JE. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products as affected by the growth medium. J Appl Microbiol 1998; 84: 234-239
96. Boyle D, Sofos J, Schmidt G. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and in ground beef. J Food Sci 1990; 55: 327-329

97. Foegeding PM, Leasor SB. Heat resistance and growth of *Listeria monocytogenes* in liquid whole egg. *J Food Prot* 1990; 53: 9-14
98. Harrison MA, Huang Y-W, Chao C-H, Shineman T. Fate of *Listeria monocytogenes* on packaged, refrigerated, and frozen seafood. *J Food Prot* 1991; 54: 524-527
99. Palumbo SA, Williams AC. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiol* 1991; 8: 63-68
100. El-Kest SE, Marth EH. Injury and death of frozen *Listeria monocytogenes* as affected by glycerol and milk components. *J Dairy Sci* 1991; 74: 1201-1208
101. McClure P, Roberts T, Oguru PO. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett Appl Microbiol* 1989; 9: 95-99
102. Hudson J. Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 1992; 14: 178-180
103. Sorrells KM, Enigl DC. Effect of pH, acidulant, sodium chloride and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Safety* 1990; 11: 31-37
104. Larson A, Johnson E, Nelson J. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *J Dairy Sci* 1999; 82: 1860-1868
105. Johnson J, Doyle M, Cassens R, Schoeni J. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 497-501
106. Sumner S, Sandros T, Harmon M, Scott V, Bernard D. Heat resistance of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *J Food Sci* 1991; 56: 1741-1743
107. Dykes G, Moorhead S. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int J Food Microbiol* 2000; 56: 161-166
108. Lianou A, Stopforth JD, Yoon Y, Wiedmann M, Sofos JN. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *J Food Prot* 2006; 69: 2640-2647
109. Ferreira A, Sue D, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of *Listeria monocytogenes* σ B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 2692-2698
110. Johansen J GL, Meyer SA. The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 1994; 57: 561-566
111. Choi H, Schaack M, Marth E. Survival of *Listeria monocytogenes* in cultured buttermilk and yogurt. *Milchwissenschaft* 1988; 43: 790-792
112. Piccinin DM, Shelef LA. Survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *J Food Prot* 1995; 58: 128-131
113. Cornu M, Billoir E, Bergis H, Beaufort A, Zuliani V. Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiol* 2011; 28: 639-647
114. Mellefont L, McMeekin T, Ross T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *Int J Food Microbiol* 2008; 121: 157-168
115. Jacobsen T, Budde B, Koch A. Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 242-249
116. Buchanan RL, Bagi LK. Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *J Food Prot* 1997; 60: 254-261

117. Buchanan R, Bagi L. Microbial competition: Effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 1999; 16: 523-529
118. Dramsi S, Biswas I, Maguin E et al. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inIB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 1995; 16:251-261
119. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 2007; 71: 133-140
120. Smith GA, Marquis H, Jones S et al. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1995; 63: 4231-4237
121. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mège R-M, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996; 84: 923-932
122. Kocks C, Hellio R, Gounon P, Ohayon H, Cossart P. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein *ActA* at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci* 1993; 105: 699-710
123. Ooi A, Hussain S, Seyedarabi A, Pickersgill RW. Structure of internalin C from *Listeria monocytogenes*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2006; 62: 1287-1293
124. Engelbrecht F, Chun SK, Ochs C 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; 21: 823-837
125. 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; 73: 6912-6922
126. Cabanes D, Sousa S, Cebriá A et al. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, *Vip*, a surface protein. *EMBO J* 2005; 24: 2827-2838
127. Kim K, Murano EA, Olson DG. Effect of heat shock on production of listeriolysin O by *Listeria monocytogenes*. *J Food Safety* 1994; 14: 273-279
128. Vadia S, Arnett E, Haghghat A-C et al. The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002356
129. Decatur AL, Portnoy DA. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* 2000; 290: 992-995
130. Conlan JW, North RJ. Roles of *Listeria monocytogenes* virulence factors in survival: virulence factors distinct from listeriolysin are needed for the organism to survive an early neutrophil-mediated host defense mechanism. *Infect Immun* 1992; 60: 951-957
131. Seveau S. Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. In: Anderluh G, Gilbert R (eds), *MACPF/CDC Proteins-Agents of Defence, Attack and Invasion*. Dordrecht, Springer, 2014: p 161-95
132. Rudi K, Nogva H, Naterstad K, et al. Subtyping *Listeria monocytogenes* through the combined analyses of genotype and expression of the *hlyA* virulence determinant. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 720-732
133. Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 1989; 109: 1597-1608

134. Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG, Portnoy DA. Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2000; 68: 999-1003
135. Jay JM. *Modern Food Microbiology*. Springer Science and Business Media, 2012.
136. Suarez M, González-Zorn B, Vega Y, Chico-Calero I, Vázquez-Boland JA. A role for *ActA* in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiol* 2001; 3: 853-864
137. Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58: 587-610
138. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. *InlB*-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the *Met* receptor tyrosine kinase. *Cell* 2000; 103: 501-510
139. Bergmann B, Raffelsbauer D, Kuhn M et al. *InlA*-but not *InlB*-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol* 2002; 43: 557-570
140. Engelbrecht F, Dickneite C, Lampidis R et al. Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (*inlC*) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *Mol Gen Genet* 1998; 257: 186-197
141. Liu D, Lawrence ML, Wiedmann M et al. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4229-4233
142. Camilli A, Goldfine H, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 1991; 173: 751-754
143. Marquis H, Doshi V, Portnoy DA. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect Immun* 1995; 63: 4531-4534
144. Vazquez-Boland JA, Kocks C, Dramsi S et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1992; 60: 219-230
145. Goldfine H, Johnston NC, Knob C. Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100-mixed micelles and in biological membranes. *J Bacteriol* 1993; 175: 4298-4306
146. Jung H-J, Park S-H, Ha S-D et al. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the *prfA* virulence gene cluster. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73: 1412-1415
147. Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71: 377-397
148. Sleator RD, Watson D, Hill C, Gahan CG. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. *Microbiology* 2009; 155: 2463-2475
149. Schauer K, Geginat G, Liang C et al. Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics* 2010; 11: 573
150. Dramsi S, Bourdichon F, Cabanes D, et al. *FbpA*, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* 2004; 53: 639-649
151. Lecuit M, Sonnenburg JL, Cossart P, Gordon JI. Functional genomic studies of the intestinal response to a foodborne enteropathogen in a humanized gnotobiotic mouse model. *J Biol Chem* 2007; 282: 15065-15072

152. Polidoro M, De Biase D, Montagnini B et al. The expression of the dodecameric ferritin in *Listeria* spp. is induced by iron limitation and stationary growth phase. *Gene* 2002; 296: 121-128
153. Fiorini F, Stefanini S, Valenti P, Chiancone E, De Biase D. Transcription of the *Listeria monocytogenes* *fri* gene is growth-phase dependent and is repressed directly by Fur, the ferric uptake regulator. *Gene* 2008; 410: 113-121
154. Hébraud M, Guzzo J. The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 190: 29-34
155. Dussurget O, Dumas E, Archambaud C et al. *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 250: 253-261
156. Nielsen PK, Andersen AZ, Mols M, et al. Genome-wide transcriptional profiling of the cell envelope stress response and the role of *LisRK* and *CesRK* in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 2012; 158: 963-974
157. Liu Y, Ream A. Gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* strain F2365 during growth in ultrahigh-temperature-processed skim milk. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 6859-6866
158. Liu Y, Ream A, Joerger RD, Liu J, Wang Y. Gene expression profiling of a pressure-tolerant *Listeria monocytogenes* *Scott A ctsR* deletion mutant. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38: 1523-1533
159. Hanawa T, Fukuda M, Kawakamis H et al. The *Listeria monocytogenes* *DnaK* chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages. *Cell Stress Chaperones* 1999; 4: 118
160. Gahan CG, O'Mahony J, Hill C. Characterization of the groESL Operon in *Listeria monocytogenes*: Utilization of Two Reporter Systems (*gfp* and *hly*) for Evaluating In Vivo Expression. *Infect Immun* 2001; 69: 3924-3932
161. Hu Y, Raengpradub S, Schwab U et al. Phenotypic and transcriptomic analyses demonstrate interactions between the transcriptional regulators CtsR and Sigma B in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 7967-7980
162. Giotis ES, Muthaiyan A, Natesan S et al. Transcriptome analysis of alkali shock and alkali adaptation in *Listeria monocytogenes* 10403S. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 1147-1157
163. Gaillot O, Pellegrini E, Bregenholt S, Nair S, Berche P. The *ClpP* serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 2000; 35: 1286-1294
164. Rouquette C, De Chastellier C, Nair S, Berche P. The *ClpC* ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol* 1998; 27: 1235-1245
165. Abram F, Starr E, Karatzas K-AG et al. Identification of components of the sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 6848-6858
166. Fraser KR, Sue D, Wiedmann M, Boor K, O'Byrne CP. Role of σ B in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of *opuC* is σ B dependent. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 2015-2022
167. Kocaman N, Sarimehmetoğlu B. Stress responses of *Listeria monocytogenes*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2016; 63: 421-427
168. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, Springer, 2004.

169. Andersson C. Regulatory pathways and virulence inhibition in *Listeria monocytogenes*, Doctoral Thesis, Umeå Universitet, Sweden 2016: 37
170. Ferreira A, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of ζ B in Heat, Ethanol, Acid, and Oxidative Stress Resistance and during Carbon Starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4454-4457
171. Norton DM, Braden CR. Foodborne Listeriosis. In: Ryser ET, Marth EH (eds), *Listeria*, listeriosis, and food safety. New York, CRC Press, 2007: p 305
172. Schlech III WF, Lavigne PM, Bortolussi RA et al. Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 1983; 308: 203-206
173. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* 1985; 312: 404-407
174. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Information for health professionals and laboratories <https://www.cdc.gov/listeria/technical.html> (15.11.2017)
175. Hellström S. Contamination routes and control of *Listeria monocytogenes* in food production, PhD Thesis, University of Helsinki, Finland 2011: 53
176. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF. Food-related illness and death in the United States. *J Environ Health* 2000; 62: 9
177. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Listeria* outbreaks <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/> (15.11.2017)
178. Heisick J, Wagner D, Nierman M, Peeler J. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 1925-1957
179. Kalender H. Detection of *Listeria monocytogenes* in faeces from chickens, sheep and cattle in Elazığ province. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27: 449-451
180. Ayaz ND, Ayaz Y, Kaplan YZ, Dogru AK, Aksoy MH. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in chicken carcasses by IMS-PCR. *Ann Microbiol* 2009; 59: 741-744
181. Yücel N, Cıtaç S, Önder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiol* 2005; 22: 241-245
182. Gürbüz OA. Tavuk kıyma, köfte ve burgerlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. *Turk J Vet Anim Sci* 2002; 26: 1271-1276
183. Ayaz N, Erol I. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ground turkey by immunomagnetic separation and polymerase chain reaction. *Rapid Methods Autom Microbiol* 2009; 17: 214-222
184. Skovgaard N, Morgen C-A. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int J Food Microbiol* 1988; 6: 229-242
185. Kerr KG, Rotowa NA, Hawkey PM, Lacey RW. Incidence of *Listeria* spp. in pre-cooked, chilled chicken products as determined by culture and enzyme-linked immunoassay (ELISA). *J Food Prot* 1990; 53: 606-629
186. Neal JA. Comparative analysis of training delivery methods for new employees cleaning and sanitizing retail deli slicers: an exploratory study. *Food Control* 2013; 29: 149-155
187. Küpel V, Gençer MK. Yaprak dönerin mikrobiyolojik kalitesi ve kimyasal bileşimi. *Turk J Vet Anim Sci* 2004; 28: 1097-1103
188. Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *Int J Food Microbiol* 1999; 53: 75-80.
189. Fantelli K, Stephan R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 2001; 70: 63-69

190. Bohaychuk V, Gensler G, King R et al. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *J Food Prot* 2006 ;69: 2176-2182
191. Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Nostro AL. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control* 2010; 21: 708-713
192. Endrikat S, Gallagher D, Pouillot R et al. A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail-sliced deli meat. *J Food Prot* 2010; 73: 612-619
193. Sancak YC, İşleyici Özgür, Sağun E. Van'da tüketime sunulan bazı et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. *YYÜ Vet Fak Derg* 2007; 18: 93-99
194. Kara R, Akkaya L. Geleneksel ve ısıl işlem uygulanarak üretilen türk sucuklarında *Salmonella Typhimurium*'un gelişimi. *Electron J Food Tech* 2010; 5: 1-8
195. Taşçı F, Türütoğlu H, Ögütçü H. Investigations of *Listeria* species in milk and silage produced in Burdur province. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2010; 16: 93-97
196. Doyle MP, Glass K, Beery J et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 1433-1438
197. Rudolf M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol* 2001; 63: 91-98
198. Gambarin P, Magnabosco C, Losio MN et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. *Int J Microbiol* 2012; doi: 10.1155/2012/497635
199. Siriken B, Ayaz ND, Erol I. Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* in salted anchovy, raw anchovy, and raw mussel using IMS-based cultivation technique and PCR. *J Aquat Food Prod Tech* 2013; 22: 77-82
200. Ericsson H, Eklöv A, Danielsson-Tham M-L et al. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2904-2907
201. Miettinen M, Siitonen A, Heiskanen P et al. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2358-2360
202. Brett MS, Short P, McLauchlin J. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int J Food Microbiol* 1998; 43: 223-229
203. Riedo FX, Pinner RW, de Lourdes Tosca M, Cartter ML, Graves LM, Reeves MW, et al. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J Infect Dis* 1994; 170: 693-696
204. Beuchat LR. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control* 1996; 7: 223-228
205. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). People at Risk - Pregnant Women and Newborns <https://www.cdc.gov/listeria/risk-groups/pregnant-women.html> (03.10.2017)
206. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases: Elsevier Health Sciences; 2014.
207. Buzby JC, Roberts T, Lin C-TJ, MacDonald JM. Bacterial foodborne disease. Medical Costs and Productivity Losses, USDA/ERS, Washington, DC, Report. 1996; 741
208. Bortolussi R. Listeriosis: a primer. *Can Med Assoc J* 2008; 179: 795-797

209. Slifman NR, Gershon SK, Lee JH, Edwards ET, Braun MM. *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor α -neutralizing agents. *Arthritis Rheum.*2003; 48: 319-324
210. Acha PN, Szyfres B. *Zoonoses- Volume 1.* Pan Amer Health Org, 2001.
211. Roberts A, Wiedmann M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 904-918
212. Krauss H, Schieffer H, Slenczka W. Zoonoses: infectious diseases transmissible from animals to humans. *American Society for Microbiology*; 2003; 38: 1198-1199
213. Mylonakis E, Paliou M, Hohmann EL, Calderwood SB, Wing EJ. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine* 2002; 81: 260-269
214. Silver HM. Listeriosis during pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1999; 54: 165-168
215. 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
216. European Commission. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. C3 - Management of scientific committees II; scientific co-operation and network. 1999
217. Meloni D. Presence of *Listeria monocytogenes* in mediterranean-style dry fermented sausages. *Foods* 2015; 4: 34-50
218. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* 2013; 13: 11
219. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 7-15
220. Jennison AV, Masson JJ, Fang N-X et al. Analysis of the *Listeria monocytogenes* population structure among isolates from 1931 to 2015 in Australia. *Front Microbiol* 2017; doi: 10.3389/fmicb.2017.00603
221. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015; 13
222. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59: 418-422
223. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool) <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> (18.11.2017)
224. de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014; 14: 1073-1082
225. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal.* 2015; 13
226. European Food Safety Authority (EFSA). *Listeria.* <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria> (18.10.2018)
227. De Valk H, Vaillant V, Jacquet C et al. Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999–February 2000. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 944-950
228. Olsen SJ, Patrick M, Hunter SB et al. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 962-967

229. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern Food Microbiology. Springer Science and Business Media; 2008.
230. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of listeriosis--northeastern United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51: 950-951.
231. European Food Safety Authority (EFSA). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006: EFSA Journal 2007; 130.
232. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial foodborne and diarrheal disease national case surveillance: annual report, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2008.
233. Todd E, Notermans S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control 2011; 22: 1484-1490
234. Helwich B, Korsgaard H, Chriél M. The community summary report on foodborne outbreaks in the European Union in 2007. EFSA Journal 2009; 7
235. Gaulin C, Ramsay D, Bekal S. Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008. J Food Prot 2012; 75: 71-78
236. European Food Safety Authority (EFSA). Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009. Eurosurveillance (Online Edition) 2011; 16: 5-8
237. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 EFSA Journal 2013; 18
238. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal. 2015; 13
239. Acciari V, Iannetti L, Gattuso A et al. Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: investigations in Italy. Epidemiol Infect 2016; 144: 2719-2727
240. Australian Institute of Food Safety. *Listeria* outbreak. <https://www.foodsafety.com.au/> (18.02.2017)
241. Kvistholm Jensen A, Nielsen EM, Björkman JT et al. Whole-genome sequencing used to investigate a nationwide outbreak of listeriosis caused by ready-to-eat delicatessen meat, Denmark, 2014. Clin Infect Dis 2016; 63: 64-70
242. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html> (18.02.2018)
243. Hernandez-Milian A, Payeras-Cifre A. What is new in listeriosis? Biomed Res Int 2014; doi: 10.1155/2014/358051
244. OzFoodNet Working Group. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2010. Commun Dis Intell Q Rep 2012; 36: 213-241
245. Huang Y-T, Liao C-H, Yang C-J et al. Listeriosis, Taiwan, 1996–2008. Emerg Infect Dis 2011; 17: 1731
246. Zolin A, Amato E, D'auria M et al. Estimating the real incidence of invasive listeriosis through an integrated surveillance model in use in Lombardy (Italy, 2006–2014). Epidemiol Infect 2017; 145: 2072-2080

247. Silk BJ, Date KA, Jackson KA et al. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 396-404
248. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks-United States, 2009-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013; 62: 448-452
249. Food and Drug Administration (FDA). Compliance Policy Guide Guidance for FDA Staff Sec. 555.320 *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm136694.htm> (12.11.2017)
250. USDA Food Safety and Inspection Service (FSIS). Policy on the Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat and Poultry Products 2014 <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf?MOD=AJPERES> (13.11.2017)
251. Rodrigues CS, Cordeiro de Sá CVG, Barros de Melo C. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural* 2017; 47: e2016072
252. Food Standards Australia New Zealand. Guidance on the application of limits for *Listeria monocytogenes* 2017 <http://www.foodstandards.gov.au/Search/pages/results.aspx?k=L.%20monocytogenes> (14.12.2017)
253. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, 29 Aralık 2011, sayı: 28157
254. Hellström S, Laukkanen R, Siekkinen K-M et al. *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *J Food Prot* 2010; 73: 641-648
255. Berger CN, Sodha SV, Shaw RK et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* 2010; 12: 2385-2397
256. Strawn LK, Gröhn YT, Warchocki S et al. Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79: 7618-2776
257. Stollewerk K, Cruz CD, Fletcher G, Garriga M, Jofré A. The effect of mild preservation treatments on the invasiveness of different *Listeria monocytogenes* strains on Greenshell™ mussels. *Food Control* 2017; 71: 322-328
258. Gyurova E, Krumova-Vulcheva G, Daskalov H, Gogov Y. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Bulgaria. *J Hyg Eng Design* 2014; 7: 112-118
259. Autio T, Hielm S, Miettinen M et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 150-155
260. Walker S, Archer P, Banks JG. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol* 1990; 68: 157-162
261. Vitas A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 349-356
262. Li Y, Brackett R, Chen J, Beuchat L. Mild heat treatment of lettuce enhances growth of *Listeria monocytogenes* during subsequent storage at 5C or 15C. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 269-275
263. Uyttendaele M, Rajkovic A, Van Houteghem N et al. Multi-method approach indicates no presence of sub-lethally injured *Listeria monocytogenes* cells after mild heat treatment. *Int J Food Microbiol* 2008; 123: 262-268

264. Grant IR, Patterson MF. Combined effect of gamma radiation and heating on the destruction of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in cook-chill roast beef and gravy. *Int J Food Microbiol* 1995; 27: 117-128
265. Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C, Sleator RD. High-pressure processing—effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 281: 1-9
266. Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int Dairy J* 2004; 14: 273-285
267. Ritz M, Tholozan J, Federighi M, Pilet M. Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol* 2002; 79: 47-53
268. Murano EA, Murano PS, Brennan RE, Shenoy K, Moreira AG. Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. *J Food Prot* 1999; 62: 480-483
269. Koseki S, Mizuno Y, Yamamoto K. Use of mild-heat treatment following high-pressure processing to prevent recovery of pressure-injured *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiol* 2008; 25: 288-293
270. Buchanan RL, Golden MH. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J Food Prot* 1994; 57: 567-570
271. Hwang C-A, Tamplin ML. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad. *Int J Food Microbiol* 2005; 102: 277-285
272. Gonzalez-Fandos E, Herrera B. Efficacy of acetic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *Foods* 2014; 3: 527-540
273. USDA Food Safety and Inspection Service FSIS. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bab10e09-aefa-483b-8be8-809a1f051d4c/7120.1.pdf?MOD=AJPERES> (02.02.2018)
274. Doyle M. Use of organic acids to control *Listeria* in meat. American Meat Institute Foundation, 1999 <http://meatpoultryfoundation.org/namif/wp-content/uploads/99-230.pdf> (03.12.2017)
275. Siragusa GR, Dickson JS. Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* 0157: H7 on beef muscle tissue by lactic or acetic acid contained in calcium alginate gels. *J Food Safety* 1993; 13: 147-158
276. Conte M, Longhi C, Petrone G et al. *Listeria monocytogenes* infection of Caco-2 cells: role of growth temperature. *Res Microbiol* 1994; 145: 677-682
277. Olesen I, Vogensen FK, Jespersen L. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathog Dis* 2009; 6: 669-680
278. Garner MR, James KE, Callahan MC, Wiedmann M, Boor KJ. Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 5384-5395
279. Yousef AE, Gajevski RJ, Marth EH. Kinetics of growth and inhibition of *Listeria monocytogenes* in the presence of antioxidant food additives. *J Food Sci* 1991; 56: 10-13
280. Taormina P, Beuchat L. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2555-2563

281. Church IJ, Parsons AL. Modified atmosphere packaging technology: a review. *J Sci Food Agri* 1995; 67: 143-152
282. Hudson JA, Mott SJ, Penney N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J Food Prot* 1994; 57: 204-208
283. Allende A, Jacxsens L, Devlieghere F, Debevere J, Artés F. Effect of superatmospheric oxygen packaging on sensorial quality, spoilage, and *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas caviae* growth in fresh processed mixed salads. *J Food Prot* 2002; 65: 1565-1573
284. Whitley E, Muir D, Waites W. The growth of *Listeria monocytogenes* in cheese packed under a modified atmosphere. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 52-57
285. Farber J, Cai Y, Ross W. Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *Int J Food Microbiol* 1996; 32: 133-144
286. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control* 2014; 35: 177-183
287. Møretro T, Langsrud S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 2004; 1: 107-121
288. Mafu AA, Roy D, Goulet J, Savoie L, Roy R. Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces. *J Dairy Sci* 1990; 73: 3428-3432
289. Robbins JB, Fisher CW, Moltz AG, Martin SE. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J Food Prot* 2005; 68: 494-498
290. Bredholt S, Nesbakken T, Holck A. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in cooked, sliced, vacuum-and gas-packaged meat. *Int J Food Microbiol* 1999; 53: 43-52
291. Amézquita A, Brashears M. Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. *J Food Prot* 2002; 65: 316-325
292. Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 2014; 5: 241
293. Norhana MW, Poole SE, Deeth HC, Dykes GA. Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 C. *Food Microbiol* 2012; 31: 43-50
294. Ye M, Neetoo H, Chen H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiol* 2008; 25: 260-268
295. Davies E, Bevis H, Delves-Broughton J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24: 343-346
296. Settanni L, Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 2008; 121: 123-138
297. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 2002; 74: 65-72
298. Ye M, Neetoo H, Chen H. Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* 2008; 127: 235-240

299. Beverly RL, Janes ME, Prinyawiwatkula W, No HK. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 2008; 25: 534-537
300. Desai MA, Soni KA, Nannapaneni R, Schilling M, Silva JL. Reduction of *Listeria monocytogenes* in raw catfish fillets by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *J Food Sci* 2012; 77: 516-522
301. Millezi AF, Caixeta DS, Rossoni DF, Cardoso MdG, Piccoli RH. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important foodborne pathogens. *Food Sci Tech* 2012; 32: 167-172
302. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2007; 18: 414-420
303. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-253
304. Leistner L, Gould GW. The hurdle concept. In: Barbosa-Cánovas, Gustavo V. (eds) *Food Engineering Series*. Springer, 2002: p 17-28
305. Garcia P, Rodriguez L, Rodriguez A, Martinez B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci Technol* 2010; 21: 373-382
306. Koutsoumanis KP, Sofos JN. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 2005; 104 :83-91
307. Fang TJ, Lin L-W. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packaging/nisin combination system. *J Food Prot* 1994; 57: 479-485
308. Hagens S, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76: 513-519
309. Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11: 58-68
310. Pérez Pulido R, Grande Burgos MJ, Gálvez A, Lucas López R. Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 2016; 36: 851-861
311. Soni KA, Nannapaneni R. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *J Food Prot* 2010; 73: 1519-1524
312. Bigot B, Lee WJ, McIntyre L, Wilson T, Hudson JA, Billington C, et al. Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiol* 2011; 28: 1448-1452
313. Dykes G, Moorhead S. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *Int J Food Microbiol* 2002; 73: 71-81
314. Leverentz B, Conway WS, Camp MJ et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4519-4526
315. Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 1915; 186: 1241-1243
316. d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad Sci Paris* 1917; 165: 373-375

317. Summers WC. Bacteriophage research: early history. *Bacteriophages: Biol Applications* 2005; 5-27
318. Chanishvili N. Phage therapy—history from Twort and d’Herelle through Soviet experience to current approaches. *Bacteriophages* 2012; 83: 1
319. Schless RA. *Staphylococcus aureus* meningitis: treatment with specific bacteriophage. *Am J Dis Child* 1932; 44: 813-822
320. Stout B. Bacteriophage therapy. *Texas State J Med* 1933; 29: 205-209
321. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 649-659
322. Goodridge L, Abedon ST. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: application of phage therapy to industry. *SIM News* 2003 ;53: 254-262
323. Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. Bacteriophages and their role in food safety. *Int J Microbiol* 2012; doi:10.1155/2012/8639
324. Aminov R, Caplin J, Chanishvili N et al. Application of bacteriophages. *Microbiol Aust* 2017; 38: 63-66
325. Guttman B, Raya R, Kutter E. Basic phage biology. In: *Bacteriophages: Biology and Applications*. New York, CRC Press, 2005: p 4
326. Bergh Ø, Børshem KY, Bratbak G, Heldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 1989; 340: 467-468
327. Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 69-114
328. Brüssow H, Kutter E. Genomics and evolution of tailed phages. In: *Bacteriophages: Biology and Applications* New York, CRC Press, 2005: p 91
329. Kutter E, Sulakvelidze A. *Bacteriophages: Biology and Applications*: CRC Press, 2005.
330. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) . Myoviridae. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/70/myoviridae-figures (10.10.2017)
331. Serwer P. Agarose gel electrophoresis of bacteriophages and related particles. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1987; 418: 345-357
332. Kerr B, West J, Bohannan B. Bacteriophages: models for exploring basic principles of ecology. In: Abedon ST (ed), *Bacteriophage Ecology*. Cambridge University Press, 2008: p 31-63
333. Reece JB, Urry LA, Cain ML et al. *Campbell Biology*. Boston, Pearson, 2011.
334. Zink R, Loessner MJ. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 296-302
335. Letellier L, Boulanger P, Plançon L, Jacquot P, Santamaria M. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci* 2004; 9: 1228-1339
336. Lobočka M, Szybalski WT. *Bacteriophages*. Academic Press, 2012.
337. Miller ES, Kutter E, Mosig G et al. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 86-156
338. Mathews CK. *Bacteriophage T4*. Wiley Online Library, 1983.
339. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 2004; 186: 4808-4812
340. Seltmann G, Holst O. *The bacterial cell wall*. Springer Science and Business Media, 2013.

341. Nelson DC, Schmelcher M, Rodriguez-Rubio L, et al. Endolysins as Antimicrobials. *Adv Virus Res* 2012; 83: 299
342. Abedon ST. Lysis from without. *Bacteriophage* 2011; 1:46-49
343. Stanford K, McAllister T, Niu Y et al. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157: H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* 2010; 73: 1304-1312
344. Goodridge LD, Bisha B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage* 2011; 1: 130-137
345. Microeos. PhageGuard. <http://www.micreos.com/content/food-safety.aspx> (10.10.2017)
346. Intralytix. SalmoFresh <http://www.intralytix.com/index.php?page=prod&id=3> (10.10.2017)
347. Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, de Meester ED, Loessner MJ. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005; 43: 301-312
348. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2874-2878
349. Sulakvelidze A. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J Sci Food Agric* 2013; 93: 3137-3146
350. Pasternack GR, Sulakvelidze A. *Listeria monocytogenes* bacteriophage and uses thereof. Google Patents, 2009.
351. European Food Safety Authority (EFSA). The use and mode of action of bacteriophages in food production. *EFSA Journal* 2009; 1076: 1-26
352. Leverentz B, Conway WS, Janisiewicz W, Camp MJ. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J Food Prot* 2004; 67: 1682-1686
353. Schellekens M, Wouters J, Hagens S, Hugenholtz J. Bacteriophage P100 application to control *Listeria monocytogenes* on smeared cheese. *Milchwissenschaft* 2007; 62: 284-287
354. Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 93-100
355. Holck A, Berg J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 6944-6946
356. Rossi LP, Almeida RC, Lopes LS et al. Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. *Food Control* 2011; 22: 954-958
357. Chibeu A, Agius L, Gao A et al. Efficacy of bacteriophage LISTEXT™ P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int J Food Microbiol* 2013; 167: 208-214
358. Silva ENG, Figueiredo ACL, Miranda FA, Almeida RC. Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. *Braz J Microbiol* 2014; 45: 11-16

359. Soni KA, Shen Q, Nannapaneni R. Reduction of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by bacteriophage P100, nisin and lauric arginate, singly or in combinations. *Int J Food Sci Technol* 2014; 49: 1918-1924
360. Figueiredo ACL, Almeida RCC. Antibacterial efficacy of nisin, bacteriophage P100 and sodium lactate against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham. *Braz J Microbiol* 2017; 48: 724-729
361. Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Fernández L et al. Applicability of commercial phage-based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control* 2017; 73: 1474-1482
362. Soni KA, Nannapaneni R, Hagens S. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 427-434
363. Soni KA, Nannapaneni R. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J Food Prot* 2010; 73: 32-38
364. Guenther S, Loessner MJ. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage* 2011; 1: 94-100
365. Bigot B, Lee W-J, McIntyre L et al. Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiol* 2011; 28: 1448-1452
366. Oliveira M, Vinas I, Colas P et al. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiol* 2014; 38: 137-142
367. Ayaz ND, Erol I. Relation between serotype distribution and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ground turkey. *J Food Prot* 2010; 73: 967-972
368. Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, Cossart P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res Microbiol* 1992; 143: 271-280
369. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3819-3822
370. International Organization for Standardization (ISO). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. 2017; 11290: 1-2017
371. Aznar R, Alarcón B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 958-966
372. Liu Y, Ream A. Gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* strain F2365 during growth in ultrahigh-temperature-processed skim milk. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 6859-6866
373. Rudi K, Nogva HK, Naterstad K et al. Subtyping *Listeria monocytogenes* through the combined analyses of genotype and expression of the hlyA virulence determinant. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 720-732
374. Zhou X, Jiao X. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting *actA* gene. *Food Control* 2005; 16: 125-130
375. Jung HJ, Park SH, Ha SD et al. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the *prfA* virulence gene cluster. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73: 1412-1415

376. Mariscotti JF, Quereda JJ, Pucciarelli MG. Contribution of sortase A to the regulation of *Listeria monocytogenes* LPXTG surface proteins. *Int Microbiol* 2012; 15: 43-51
377. Dramsi S, Bourdichon F, Cabanes D et al. *FbpA*, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* 2004; 53: 639-649
378. Fiorini F, Stefanini S, Valenti P, Chiancone E, De Biase D. Transcription of the *Listeria monocytogenes* *fri* gene is growth-phase dependent and is repressed directly by Fur, the ferric uptake regulator. *Gene* 2008; 410: 113-121
379. Kim JW, Siletzky RM, Kathariou S. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 6623-6630
380. Arachchi GJ, Mutukumira AN, Dias-Wanigasekera BM et al. Characteristics of three listeriaphages isolated from New Zealand seafood environments. *J Appl Microbiol* 2013; 115: 1427-1438
381. Osaili TM, Alaboudi AR, Nesiar EA. Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control* 2011; 22: 586-590
382. Pini P, Gilbert R. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int J Food Microbiol* 1988; 6: 317-326
383. Rørvik LM, Yndestad M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *Int J Food Microbiol* 1991; 13: 97-104
384. Uyttendaele M, Neyts K, Lips R, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abbatoirs. *Food Microbiol* 1997; 14: 339-345
385. Genigeorgis CA, Dutulescu D, Garayzabal JF. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J Food Prot* 1989; 52: 618-624
386. Cox N, Bailey J, Berrang M. The presence of *Listeria monocytogenes* in the integrated poultry industry. *J Appl Poult Res* 1997; 6: 116-119
387. Bailey J, Fletcher D, Cox N. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the southeastern United States. *J Food Prot* 1989; 52: 148-150
388. Lawrence LM, Gilmour A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4600-4604
389. Cook A, Odumeru J, Lee S, Pollari F. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin. *J Food Prot* 2012; 75: 34-40
390. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 131-140
391. Indrawattana N, Nibaddhasobon T, Sookrung N et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. *J Health Popul Nutr* 2011; 29: 26
392. Goh S, Kuan C, Loo Y et al. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. *Poult Sci* 2012; 91: 2686-2690
393. Ishola O, Mosugu J, Adesokan H. Prevalence and antibiotic susceptibility profiles of *Listeria monocytogenes* contamination of chicken flocks and meat in Oyo

- State, south-western Nigeria: Public health implications. *J Prev Med Hyg* 2016; 57: E157
394. Kalorey D, Barbuddhe S, Kurkure N, Gunjal P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat in Vidharba region of India. Proceedings of the 17th European Symposium on the Quality of Poultry Meat Doorwerth, Netherlands, 2005.
395. Bilir Ormanci F, Erol I, Ayaz N, Iseri O, Sariguzel D. Immunomagnetic separation and PCR detection of *Listeria monocytogenes* in turkey meat and antibiotic resistance of the isolates. *Br Poult Sci* 2008; 49: 560-565
396. Erol I, Ayaz N. Serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from Turkey meat by multiplex PCR in Turkey. *J Food Safety* 2011; 31: 149-153
397. Siriken B, Ayaz ND, Erol I. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Turkey. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2014; 127: 43-49
398. Gudbjörnsdóttir B, Suihko M-L, Gustavsson P et al. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiol* 2004; 21: 217-225
399. Ojeniyi B, Wegener HC, Jensen N, Bisgaard M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. *J Appl Microbiol* 1996; 80: 395-401
400. Miettinen MK, Palmu L, Björkroth KJ, Korkeala H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant, and retail level. *J Food Prot* 2001; 64: 994-999
401. Lawrence LM, Gilmour A. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2139-2144
402. Thévenot D, Delignette-Muller M-L, Christieans S et al. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products. *Int J Food Microbiol* 2006; 112: 153-161
403. Lovett J, Francis D, Hunt J. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *J Food Prot* 1987; 50: 188-192
404. MacGowan AP, Bowker K, McLauchlin J, Bennett PM, Reeves DS. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int J Food Microbiol* 1994; 21: 325-334
405. Cohen N, Ennaji H, Bouchrif B, Hassar M, Karib H. Comparative study of microbiological quality of raw poultry meat at various seasons and for different slaughtering processes in Casablanca (Morocco). *J Appl Poult Res* 2007; 16: 502-508
406. Uyttendaele M, Van Hoorde I, Debevere J. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese. *Int J Food Microbiol* 2000; 54: 205-212
407. Hudson J, Lake R, Savill M, Scholes P, McCormick R. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 614-621
408. Adzitey F, Huda N, Ali GRR. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *Biotech.* 2013; 3: 97-107
409. Flori P, Bellete B, Durand et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis*

- jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 2004; 53: 603-607
410. Alarcon B, Vicedo B, Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. J Appl Microbiol 2006; 100: 352-364
411. O'Driscoll B, Gahan C, Hill C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 1693-1698
412. Butte AJ, Dzau VJ, Glueck SB. Further defining housekeeping, or "maintenance," genes focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". Physiol Genomics 2001; 7: 95-96
413. Chen M, Wu Q, Zhang J, Wang J. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. Food Control 2014; 38: 1-7
414. Loessner MJ, Busse M. Bacteriophage typing of *Listeria* species. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 1912-1918
415. Hodgson DA. Generalized transduction of serotype 1/2 and serotype 4b strains of *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol 2000; 35: 312-323
416. Oliveira M, Vinas I, Colas P et al. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. Food Microbiol 2014; 38: 137-142
417. Mizoguchi K, Morita M, Fischer CR et al. Coevolution of bacteriophage PP01 and *Escherichia coli* O157: H7 in continuous culture. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 170-176
418. Boyd EF, Brüssow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. Trends Microbiol 2002; 10: 521-529
419. Wagner PL, Waldor MK. Bacteriophage control of bacterial virulence. Infect Immun 2002; 70: 3985-3993
420. Olsen R, Metcalf ES, Brandt C. Conditional temperature-sensitive restriction of *Pseudomonas* bacteriophage CB3. J Virol 1968; 2: 1393-1399
421. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages. Folia Microbiol 2011; 56: 191-200
422. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M et al. Toward rational control of *Escherichia coli* O157: H7 by a phage cocktail. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 64: 270-274
423. Kazi M, Annapure US. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. J Food Sci Technol 2016; 53: 1355-1362
424. O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 3417-3424
425. Gencay YE, Ayaz ND, Copuroglu G, Erol I. Biocontrol of shiga toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Turkish raw meatball by bacteriophage. J Food Safety 2016; 36: 120-131
426. Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Appl Environ Microbiol 2009; 75: 93-100
427. Tompkin R. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J Food Prot 2002; 65: 709-725

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Gizem ÇUFAOĞLU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 24 Nisan 1989, Ankara

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90318 357 4242 / 6578

E-posta: gizemcufaoglu@kku.edu.tr

Yazışma Adresi: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 71450, Yahşihan/KIRIKKALE

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	AÜ Veteriner Fakültesi	2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013-	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce