



## KOLORİMETRİK LOOP-MEDIATED İZOTERMAL AMPLİFİKASYON METODU İLE *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN TAVUK ETLERİNDE HIZLI TESPİTİ

Mehmet Yüksel<sup>1\*</sup>, Selahattin Sert<sup>1</sup>, Arzu Kavaz Yüksel<sup>2</sup>, Bülent Çetin<sup>1</sup>, Mustafa Gürses<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Erzurum, Türkiye

Geliş / Received: 21.09.2021; Kabul / Accepted: 17.02.2022; Online baskı / Published online: 14.02.2022

Yüksel, M., Sert, S., Kavaz Yüksel, A., Çetin, B., Gürses, M. (2022). Kolorimetrik loop-mediated izotermal amplifikasyon metodu ile *Listeria monocytogenes*'in tavuk etlerinde hızlı tespiti. GIDA (2022) 47 (1) 121-135 doi: 10.15237/gida.GD21125

Yüksel, M., Sert, S., Kavaz Yüksel, A., Çetin, B., Gürses, M. (2022). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in chicken meats with colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. GIDA (2022) 47 (1) 121-135 doi: 10.15237/gida.GD21125

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı tavuk etlerinden (n:50; bütün kanat, göğüs, bageç; toplamda N: 150) *Listeria monocytogenes*'in tespitinde kolorimetrik loop-mediated izotermal amplifikasyon'un (LAMP) performansını değerlendirmektir. Bu amaçla, tavuk etleri 10<sup>0</sup>-10<sup>4</sup> CFU/25 g (veya bütün tavuk eti) seviyede *L. monocytogenes* ve rekabetçi mikrobiyotaya olarak kullanılan 5 diğer bakteri (*Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*) ile inoküle edildi. Ön zenginleştirme sonrası örnekler geleneksel kültürel, gerçek zamanlı PZR ve LAMP kullanılarak analiz edildi. Virulans *hlyA* gen'in primer setleri (*L. monocytogenes*-özü) hidroksinaftol mavisi (HNB) ile görselleştirilmiş LAMP için kullanıldı. Bu hedef gen 65°C 45 dakikada spesifik primerler kullanılarak çoğaltıldı. Üç metot ile gerçekleştirilen analizlerin sonucunda doğal olarak kontamine olmuş 150 örneğin 9'unda (%6) *L. monocytogenes* varlığı tespit edildi. LAMP, qPCR ve klasik metot doğal ve yapay olarak kontamine olmuş örneklerden *L. monocytogenes* için aynı tespit performansını gösterdi. Bu sonuçlar HNB-LAMP yönteminin, PCR'a alternatif olarak, izotermal koşullar altında *L. monocytogenes*'e duyarlı, spesifik, basit, hızlı bir tespit tekniği olarak kullanılabileceğini ve *L. monocytogenes*'in tavuk etlerinden saptanma potansiyeline sahip olduğunu gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Loop-mediated izotermal amplifikasyon (LAMP), gerçek zamanlı PZR, *Listeria monocytogenes*, tavuk etleri, hızlı tanımlama

## RAPID DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN CHICKEN MEATS WITH COLORIMETRIC LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHOD

### ABSTRACT

The object of this study is to evaluate the performance of the colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in detecting *Listeria monocytogenes* from chicken meats (n: 50; whole wing, breast,

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉: mehmet.yuksel@atauni.edu.tr

☎: (+90) 442 231 5808

☎: (+90) 442 236 0958

Mehmet Yüksel; ORCID no: 0000-0001-6566-1385

Selahattin Sert; ORCID no: 0000-0003-1733-4843

Arzu Kavaz Yüksel; ORCID no: 0000-0001-8292-9259

Bülent Çetin; ORCID no: 0000-0002-4679-2555

Mustafa Gürses; ORCID no: 0000-0001-6859-4085

drumstick; totally N: 150). For this purpose, the chicken meats were artificially contaminated with  $10^0$ - $10^4$  CFU/25 g (or sample) of *L. monocytogenes* and 5 others bacteria were used as competitive microbiota. After pre-enrichment, the samples were analyzed using conventional cultural, LAMP and real-time PCR methods. Primer sets of virulence gene *hlyA* were used for the *L. monocytogenes*-specific visualized LAMP with hydroxynaphthol blue (HNB) dye and amplified the target gene using specific primers at 65 °C for 45 min. As a result of analysis performed by three methods in the naturally contaminated samples, the presence of *L. monocytogenes* was detected in 9 of 150 samples (6%). The LAMP, qPCR and conventional method showed similar detection performances for *L. monocytogenes* in the naturally or artificially contaminated samples. These results demonstrated the use of HNB-LAMP method for, as an alternative to PCR, sensitive and specific to *L. monocytogenes* under isothermal conditions, could use as a simple, rapid detection technique and has the potential for detection of *L. monocytogenes* from the chicken meats.

**Keywords:** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Real-time PCR, *Listeria monocytogenes*, chicken meats, rapid detection

## GİRİŞ

Listeriyozis vakalarına sebebiyet veren *L. monocytogenes*; zorlu çevre koşullarında hayatta kalabilen bir patojendir. Bu patojen pişmemiş veya yetersiz ısı işlem uygulanmış et, çiğ süt ve ürünlerinde, meyve ve sebzelerde bulunabilir. Ayrıca; gıdaların işlenmesi esnasında çeşitli kaynaklardan kontaminasyon riski de ortaya çıkabilir. Özellikle kontaminasyon olan bir üründen pişmiş ürüne, çiğ tüketilen sebze ve meyve gibi gıdalara çapraz bulaşı listeriyozis vaka olasılıklarını arttırmaktadır (Wang vd. 2015; Feng vd. 2018).

Gıda Güvenliği açısından *L. monocytogenes*, buzdolabı sıcaklıklarında canlı kalabilen ve çoğalan, ozmotik stresi tolere edebilme yeteneğiyle önemli bir patojendir (Rhoades vd. 2009; Goh vd. 2012). *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdaların potansiyel insan sağlığı riskini değerlendirmek için güvenilir, özgün, hassas belirleme yöntemlerine ihtiyaç vardır. Süregelen geleneksel kültürel metotta kontamine şüphesi olan gıdanın selektif sıvı besiyerlerinde ön zenginleştirme, seçici agarlarda izolasyon ve şüpheli kolonilerin tanımlanması amacıyla biyokimyasal testler yapılmaktadır. Bu kültürel metot standart olarak kabul görmüş olsa da zaman (5 gün) alıcıdır. Hem de bu analizler sarf malzemeyle birlikte iş gücü ve donanımlı bir laboratuvar gerektirmektedir (Lee vd., 2015; Feng vd., 2018).

Nükleik asit temelli (Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), izotermal amplifikasyon vb.) moleküler

tanı teknolojilerinin gelişimiyle birlikte analiz süresi önemli ölçüde kısaltılmıştır. Gıdalarda *L. monocytogenes*'in hızlı aranması için multiplex PCR (Jamali vd., 2015; Wiczorek and Osek, 2017), immunomagnetic separation ile birlikte PCR (Ayaz vd., 2009), real-time PCR (Traunsek vd., 2011), ve multiplex realtime PCR (Xiao vd., 2014) gibi yöntemler kullanılmıştır. Ancak; nükleik asit temelli bu yöntemler pahalı ekipman ve sarf malzemenin yanı sıra daha eğitimli personel ve donanımlı laboratuvara ihtiyaç duymaktadır. Örneğin; klasik PCR yönteminde DNA ekstraksiyonu, genetik materyalin amplifikasyonu için primerler ve uygun çözeltiler, değişken termal döngüyü sağlayıcı cihazlar, amplifikasyonun kontrolü amacıyla görüntüleme kimyasalları ve ekipmanları lazımdır. Nükleik asit temelli metotlardan birisi olan Loop-mediated izotermal amplifikasyon (LAMP, döngüye dayalı izotermal amplifikasyon) çoğaltılması arzu edilen DNA kısımlarını yüksek duyarlılık ve etkinlikte, izotermal koşullarda (63-65°C), iplikcik yer değiştirmesi esasına dayanarak çoğaltabilen nükleik asit temelli bir yöntemdir (Notomi vd. 2000).

LAMP metodu, çoğaltılması istenen DNA'da altı farklı bölgeden tanımlanıp özel olarak dizayn edilen 4 veya 6 primer eşliğinde DNA polimeraz sayesinde gerçekleştirilir. Bu şekilde LAMP, izotermal olarak inkübe edilmiş reaksiyon ortamında spesifik bir gen bölgesini çoğaltıp belirleyebilir (Notomi vd. 2000; Nagamine vd. 2002; Sagcan ve Kara, 2019).

Diğer nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden farklı olarak, LAMP basitliğinin yanı sıra yüksek amplifikasyon etkinliği gibi avantajlara sahiptir. LAMP için bir termal döngü cihazı olmaksızın bir su banyosu veya standart bir ısıtıcı blok ile amplifikasyon işlemi başarılabilir. Ayrıca, amplifikasyonun kontrolünde jel elektroforezi ve görüntüleme ekipmanı da gerekmez (Tomlinson and Boonham 2008). LAMP reaksiyon sonucu, interkalatör özelliğe sahip PicoGreen, SYBR Green I, Etidyum bromür gibi özel boya ile veya hidrosinaftol mavisi (HNB), Malaşit yeşili (MG), Kalsein gibi metal indikatörlerle görülebilir (Paridavd. 2008).

LAMP reaksiyonu sonucunda amplifikasyonun negatif veya pozitif olduğu reaksiyon ortamına hidrosinaftol mavisi (HNB) ilave edilerek tespit edilebilmektedir. Bu metal indikatörü reaksiyon ortamının pH'sına bağlı olarak renk değiştirmektedir. İzotermal sürece girmemiş olan reaksiyon ortamı HNB ilave edildiğinde normalde mor menekşe rengindedir. Fakat; amplifikasyon gerçekleştiğinde HNB'nin rengi gök mavisine döner ve reaksiyonun pozitif olduğu bu şekilde çıplak gözle yorumlanabilir. Reaksiyon boyunca ortamda yan ürün olarak oluşan pirofosfatların HNB+Mg<sup>2+</sup> kompleksinden Mg<sup>2+</sup> iyonlarını uzaklaştırarak ortam pH'sında değişiklik meydana getirdiği için rengin gök mavisine (sky blue) dönüştüğü belirtilmiştir. Bu boya LAMP için bazı avantajlar sağlamaktadır: reaksiyon ortamında inhibe edici değildir ve kapalı reaksiyon ortamına önceden ilave edilir. İkincisi çıplak gözle renk değişimi kolayca görülebilir ve belirgindir. Son olarak hazırlanması kolay (suda çözünür) ve ucuzdur (Goto vd. 2009; Srisrattakarn vd. 2017; Wang vd., 2017).

Bu çalışmada, tavuk etlerinden *L. monocytogenes*'in hızlı tespiti için *hlyA* gene göre oluşturulan primerlerle kolorimetrik (HNB) LAMP yönteminin hassasiyeti, özgünlüğü geleneksel kültürel yöntem ve real-time PCR ile kıyaslanarak yorumlanması amaçlandı.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Tavuk etleri

Toplamda 150 adet (bütün kanat, göğüs, bageç; n: 50) tavuk eti Erzurum ilinde 2017 yılı Mart-Nisan aylarında perakende satış yapan marketlerden temin edildi. Örnekler PVC ambalajlarda paketlenmiş halde satıcıdan alınmıştır. Her paket bir numune olarak kabul edildi. Temin edilen örnekler en kısa zamanda ve soğuk zincir şartlarında (+2°C ile +8°C) laboratuvara ulaştırıldı. Materyaller sıcaklığın korunması için buz aküleri içeren strafor kutu içerisinde taşınmış ve analizlere kadar sıcaklığı 4°C ayarlanmış soğutucuda muhafaza edildi. Örnekler laboratuvara ulaştırıldıktan sonra en geç 30 dakika sonrasında analizlere alındı.

### Çalışmada kullanılan kültürler

Bu çalışmada, mikrobiyolojik ve/veya moleküler genetik analizlerde Çizelge 1'de verilen kültürler kullanılmıştır. Bu kültürler Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı'na ait kültür koleksiyonundan temin edildi. Laboratuvarında -80°C'de muhafaza edilen kültürlerin aktifleştirilmesi Trypticase Soy Yeast Extract (TSYE) sıvı besiyerinde yapıldı. *C. jejuni* ve *C. coli* için TSYE besiyerine %5 oranında defibrine at kanı ilave edildi.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan kültürler

Table 1. Cultures used in this study

Kültürler / Cultures	Diğerleri / Others
<i>Listeria</i> spp.	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Salmonella</i> Typhimurium (RSSK 95091)
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 10527	<i>Campylobacter jejuni</i> (ATCC 33560) <i>Campylobacter coli</i> (ATCC 33559) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Citrobacter freundii</i> (NCTC 6272)
<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	
<i>L. innocua</i> NCTC 11288	

ATCC: American Type Culture Collection, NCTC: National Collection of Type Cultures, RSSK: Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu

### Örneklerin inokülasyonu

*In vitro* koşullarda inokülasyonları yapılacak tavuk etleri mikrobiyota ve diğer kalıntılardan arındırılması için steril saf su ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Kısaca; 25 g örnek 225 mL (veya ağırlıklarına göre 1:10 oranında) steril saf su ile 3 dk yıkandı. Bu işlem her örnek için 3 defa tekrar edildi. Tavuk etleri yıkandıktan sonra inokülasyon öncesi kontrol amacıyla paketlerden numune alınmış ve belirtilen analizler bu numunelere de uygulanmıştır. Yıkamadan sonra *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *Listeria monocytogenes* (NCTC 10527) ile  $10^0$ - $10^4$  CFU/25 g olacak şekilde uygun kültür dilüsyonları hazırlandı. Aynı şekilde rekabetçi mikrobiyota olarak seçilen 5 kültür karışımı için dilüsyonlar hazır hale getirildi. Hem *L. monocytogenes* suşları için hem de rekabetçi mikrobiyota için hazırlanan inokülasyonların konsantrasyonu McFarland densitometer (DEN-1 McFarland Densitometer, Biosan) kullanılarak kontrol edilmiştir. Steril fizyolojik tuzlu su (%0.85 NaCl) ile yaklaşık olarak  $10^8$  CFU/mL olacak şekilde ana dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu ana inokülasyon çözeltileri 10-kat seyreltme metoduyla 25 g tavuk eti için  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  CFU olacak şekilde optimize edilmiştir. Uygun dilüsyonlardan 100 µL alınarak mikropipet ile yıkanan örnekler steril stomacher içerisinde çoklu noktasal olarak inoküle edildi ve kültür-örnek etkileşimi için 1-2 saat 4°C'de bekletildi (Arunrut vd. 2018).

### *Listeria monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri için kültürel metot

ISO 11290-1:2017 koduyla standart metot olarak sunulan ve TSE tarafından ülkemizde de geçerliliği olan TS EN ISO 11290-1 yönteme göre *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri için analizler iki aşamalı zenginleştirme, izolasyon ve doğrulama testlerini içermektedir. Kısaca; örnekler öncelikle ağırlıklarına göre 1:10 oranında Buffered Peptone Water (Tamponlanmış Peptonlu Su, TPS) ile filtreli stomacher poşeti içerisinde rinsing (yıkama) işlemine tabi tutuldu. Ön zenginleştirme amacıyla steril kavanoz içerisinde 10 mL tavuk yıkama suyuna 90 mL Half Fraser Broth eklendi ve 30°C'de aerob koşullarda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ön zenginleştirme işlemine tabi tutulan her bir örnekten 1 mL

homojenizat alınıp 9 mL Fraser Broth içeren tüplere aktarılıp 37°C,  $48 \pm 2$  aerobik inkübasyon uygulandı. Zeytin yeşili-siyah renk veren tüplerden birer öze dolusu Chromocult Listeria Selective Agar (Merck 1.00427), Oxford Listeria Selective Agar (Merck 1.07004) ve PALCAM Agar (Merck 1.11755) besiyerlerine çizim yapılmıştır. Bu seçici agarlarda üreyen yaklaşık 1 mm çaplı tipik kolonilerden 1-5 adet seçilerek biyokimyasal ve diğer testler yapılmak üzere, TSA-YE'ye (Tryptic Soy Agar-Yeast Extract; Oxoid CM 131) aktarıldıktan sonra 30°C'de 1 gün inkübasyona bırakıldı. Üreyen kolonilere sırası ile; Gram boyama, katalaz (%3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile), oksidaz (Bactident oxidase, Merck 113300), Christie, Atkins ve Munch-Peterson (CAMP) hemoliz testleri yapıldı. Biyokimyasal doğrulama amacıyla API Listeria (bioMerieux) kit ile birlikte karbonhidrat testleri (Ksiloz, Ramnoz, Mannitol) uygulandı (Hitchins vd. 2017). Gram pozitif, Katalaz pozitif, oksidaz negatif, CAMP pozitif, Ramnoz pozitif, Ksiloz ve Mannitol negatif ve API web system software ile sonucu %90 *L. monocytogenes* üzeri olan kültürler *L. monocytogenes* olarak belirlendi. Ayrıca, *L. monocytogenes*'in örneklerden identifikasyonu için Singlepath® L'mono (Merck Millipore, 104148) immünolojik hızlı kit üretici yönergesine göre kullanıldı.

### PCR ve LAMP için bakteriyel DNA ekstraksiyonu

Ön zenginleştirmeye tabi tutulmuş homojenizatlardan 1 mL alınarak mikrosantrifüj tüplere transfer edildi. Sırasıyla; i) 900 x g, 1 dakika santrifüjleme, ii) süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpe alındıktan sonra 10.000 x g, 5 dakika santrifüjleme, iii) süpernatant elemine edildikten sonra geriye kalan pellet üzerine Tris-EDTA (pH 8.0) Buffer ilave edildi. Bu karışım 95-100°C'de 10 dakika süreyle ısıtıcı blokta ısıtıldı. Oda sıcaklığına getirilen bu karışım 13.700 x g 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant LAMP ve PCR işlemleri için DNA kalıp olarak kullanıldı. DNA saflığı ve konsantrasyonu Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, USA) cihazında Take3 Micro-Volume Plate kullanılarak gerçekleştirildi. A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> oranı 1.8-2.0 aralığındaki DNA'lar kullanıldı (Yamazaki vd. 2009; Van Tongeren vd., 2011; Tang vd. 2011).

LAMP analizinde kullanılan primerlerin özgünlüğünü kontrol etmek amacıyla referans kültürlerden DNA ekstraksiyonu *mericon* DNA Bacteria Kit (QIAGEN, Cat. No. / ID: 69525) kullanılmıştır. Bu amaçla üreticinin yönergesi takip edilmiştir.

### LAMP protokolü

LAMP reaksiyonu için *Bst* 3.0 DNA Polimeraz ve bu enzimin optimum aktivite gösterdiği ortamı sağlayan Isothermal Amplification Buffer II Pack (New England Biolabs), dNTP (Sigma Aldrich), LAMP Primer karışımı, sonucun gözlenmesi için

hidroksinaftol mavisi (HNB) (Sigma Aldrich, Product No: 1.04593) ve reaksiyon hacmini tamamlamak için moleküler saf su kullanıldı. HNB çözeltisi moleküler ağırlığı: 620,47 g/mol olan HNB'den 0,02325 g alınarak 10 mL saf su içerisinde çözündürülerek hazırlandı. 25 µL LAMP reaksiyon hacminde 1 µL ilave edildiğinde konsantrasyonu 150 µM olarak optimize edildi. Reaksiyonda kullanılan bileşenler ve miktar/konsantrasyonları Çizelge 2'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 2. LAMP için kullanılan bileşenler ve miktar/konsantrasyonları

Table 2. Ingredients used for LAMP and their amount/concentration

Bileşen / Ingredients	Hacim (25 µL/Reaksiyon) / Volume
10X Isothermal Amplification Buffer II	2.5 µL
10 mM dNTPs	3.5 µL (1.4 mM final)
100 mM MgSO <sub>4</sub>	1.5 µL (6 mM+2 mM buffer=8 mM final)
Primerler Primers	1.3 µL (1.6 µM FIP/BIP, 0.2 µM F3/B3, 0.8 µM LoopF/B)
<i>Bst</i> 3.0 (8,000 U/mL)	1 µL (0.32 U/µL)
DNA template	2 µL (50 µg/mL)
HNB	1 µL (150 µM)
H <sub>2</sub> O	Saf su ile 25 µL'ye tamamlanır

LAMP reaksiyonunda kullanılan primerler *L. monocytogenes hlyA* gen hedef alınarak dizayn edildi (Çizelge 3). Bu primerler liyofilize halde HPLC

saflığında olup üreticinin (Integrated DNA Technologies, IDT, Leuven, Belçika) yönergesine göre ultra saf su ile hazırlandı.

Çizelge 3. LAMP için kullanılan primerler

Table 3. Primers used in LAMP

Hedef/Referans	Primer <sup>b</sup>	Sekans (5'-3')
Tang vd. (2011) <sup>a</sup> ;	FIP	CGTGT'TTCTT'TTCGATTGGCGTCTT'TTTTCAT CCATGGCACCACC (F1c-F2)
	BIP	CCACGGAGATGCAGTGACAAATGTT'TGGATT TCTTCTT'TTCTCCACAAC (B1-B2c)
	F3	TTGCGCAACAAACTGAAGC (F3)
	B3	GCTTTTACGAGAGCACCTGG (B3c)
	LF	TAGGACTTGCAGGCGGAGATG (LFc)
	LB	GCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGG (LB)

<sup>a</sup>*L. monocytogenes hlyA* gen (GenBank erişim numarası NC012488)

<sup>b</sup>F3: forward internal primer; B3: backward inward primer; FIP: forward inner primer; BIP: backward inner primer; LF: loop forward primer; LB: loop backward primer

Çizelge 2’de belirtilen bileşenler uygun hacimlerde alınarak toplamda 25 µL reaksiyon karışımı 0,2 mL PCR tüplerinde ısıtıcı blokta 60°C ve 65°C sıcaklık, 15, 30, 45, 60, 120 dk süre kombinasyonu uygulandı. Bu süreler sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 80-82°C’de 2 dakika daha ısıtma yapıldı. Bu işlemler sonucunda tüpler bir beyaz zeminde konumlandırıldı ve 10 dk içerisinde HNB’ye bağlı renk değişimi gözlemlendi.

#### LAMP analizinin spesifikliğinin belirlenmesi

Yöntemin spesifikliğini belirlemek için, LAMP analizi, dört *Listeria* suşundan ve beş *Listeria* olmayan suştan (Çizelge 1) elde edilen DNA kalıplarıyla yukarıda açıklanan koşullar altında gerçekleştirildi. Her DNA örneği en az iki kez LAMP analizine alındı.

#### LAMP analizinin hassasiyetinin belirlenmesi

LAMP metodunun duyarlılığı, pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* suşu ATCC 7644 kullanılarak belirlendi. Metodun belirleme limiti (limit of detection, LOD) aynı DNA kalıplarında PCR ile karşılaştırılarak tespit edildi. *L. monocytogenes* kültürünün ddH<sub>2</sub>O (double distilled water) ile 5-5x10<sup>6</sup> CFU/mL aralığındaki dilüsyonlarından 100 µL alınarak DNA

ekstraksiyonu yapıldı. Bu DNA örnekleri PCR ve LAMP hassasiyetlerinin belirlenmesi için kullanıldı. Saf kültür dilüsyonlarından 100 µL PALCAM ve Chromocult *Listeria* Selective Agar’a ekildi. Agarlarda 36-48 saat, 37°C inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerin sayımı gerçekleştirildi. LOD, *L. monocytogenes*’in en düşük konsantrasyonda üç tekrarlar tespit edildiği değer olarak verildi. Ayrıca saflaştırılmış DNA ekstraktları 10 kat seyreltme (800 ng, 80 ng, 8 ng, 800 pg, 80 pg, 8 pg) ile de her iki yöntemle analize alındı.

#### qPCR protokolü

Tavuk eti örneklerinden *L. monocytogenes* tespiti için mericon *L. monocytogenes* Kit (QIAGEN, Cat. No. / ID: 290123) kullanılmıştır. Kit içeriğinde Internal Control (iç kontrol), Positive Control (pozitif kontrol), Multiplex PCR Master Mix, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer, RNase-free water mevcuttur. Üreticinin reaksiyon hazırlama yönergesine uyularak PCR reaksiyonu Rotor-Gene Q real-time PCR cihazında Çizelge 4. ve Çizelge 5’te belirtilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonuçları Rotor-Gene Q Ver. 2.3.1.49 (QIAGEN) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. Materyal ve kontrol reaksiyonları için hacimler

Table 4. Setup of sample and control reactions

Bileşen/ Component	Materyal için PCR/PCR for material	Pozitif PCR kontrol/Positive PCR control	Negatif PCR kontrol/Negative PCR control
Sulandırılmış mericon PCR karışımı <i>Reconstituted mericon Assay</i>	10 µL	10 µL	10 µL
Bakteriyel DNA <i>Bacterial DNA</i>	10 µL	-	-
Çözündürülmüş pozitif Kontrol DNA <i>Dissolved Positive Control DNA</i>	-	10	-
QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer Veya RNase-free water	-	-	10 µL
Toplam Hacim/ <i>Total Volume</i>	20 µL	20 µL	20 µL

Çizelge 5. Rotor-Gene Q ile PCR protokolü  
Table 5. PCR protocol with Rotor-Gene Q

Adım/ Step	Süre/Time	Sıcaklık/Temperature	Açıklama/Comments
Başlangıç aktivasyonu <i>Initial activation</i>	5 dakika	95°C	HotStarTaq Plus DNA polimeraz aktivasyonu
3 aşamalı Döngü			
Denatürasyon <i>Denaturation</i>	15 saniye	95°C	40 Döngü 60°C'de veri toplama/ <i>Data collection at 60°C</i>
Bağlanma <i>Annealing</i>	15 saniye	60°C	
Uzatma <i>Extension</i>	10 saniye	72°C	

### İstatistiksel analizler

İstatistiksel analiz, Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak yapıldı. LAMP analizi, gerçek zamanlı PCR ve standart kültür yönteminin sonuçlarına göre tanısal kalite kriterleri belirlenerek değerlendirildi. Bu değerlendirmede tanısal duyarlılık (diagnostic sensitivity, SE), özgüllük (specificity, SP) ve doğruluk (accuracy, AC) ile pozitif (positive, PPV) ve negatif (negative, NPV) tahmin değerleri hesaplandı. Sonuçların uyumu gerçek pozitif (TP) veya gerçek negatif (TN) şeklinde verildi. Sonuçların uyuşmaması yanlış pozitif (FP) veya yanlış negatif (FN) olarak belirtildi. Bu parametrelerin hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Garrido-Maestu vd., 2017; Kreitlow vd., 2021).

$$SE = \left[ \frac{TP}{TP + FN} \right] \times 100 \quad (1)$$

$$SP = \left[ \frac{TN}{TN + FP} \right] \times 100 \quad (2)$$

$$AC = \left[ \frac{TP + TN}{N} \right] \times 100 \quad (3)$$

(N = analize alınan toplam numune sayısı)

$$PPV = \left[ \frac{TP}{TP + FP} \right] \times 100 \quad (4)$$

$$NPV = \left[ \frac{TN}{TN + FN} \right] \times 100 \quad (5)$$

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### Tavuk etlerinde LAMP ve diğer yöntemlerle *L. monocytogenes* varlığı

LAMP metodunun gıdalarda *L. monocytogenes* tespiti için kullanılabilirliğini göstermek için 150 tavuk eti örneği LAMP, qPCR ve standart kültürel metot ile analize alındı. Bu üç yöntemin sonuçları Çizelge 6'da özetlenmiştir. Tavuk eti örneklerinde, LAMP, qPCR ve kültürel metot ile 9 (9/150, %6) örnek *L. monocytogenes* pozitif bulundu. Standart kültürel metot ile kıyaslandığında qPCR ve LAMP tespit doğruluğu açısından %100 uyum sağlamıştır. Tang et al (2011) yaptıkları çalışmada LAMP yönteminin doğruluğunu "altın standart" olarak kabul edilen kültürel metotla kıyasladığında aynı sonucu bulduklarını bildirmişlerdir.

Geleneksel kültürel yöntemde PALCAM ve Chromocult besiyerlerinde tipik kolonilerin oluşumuna takiben gerekli identifikasyon testleri yapıldıktan sonra 9 örneğin *L. monocytogenes* pozitif olduğu tespit edildi. Bu isolatların hedef patojen olduğu API Listeria ve Singlepath® L'mono kitleriyle de doğrulandı (Şekil 1). API kit sonucu yazılımla değerlendirildiğinde %98,69 ihtimalle 9 örnekte şüpheli isolatların *L. monocytogenes* olduğu görüldü. *Listeria* türleri içerisinde insanlarda listeriozis rahatsızlıklarına sebep olabilen bu türün gıdalarda varlığı risk olarak değerlendirilmektedir (Setiani vd., 2015).

**LAMP ve qPCR için bakteriyel DNA kalitesi**  
Nükleik asit örneklerinin hızlı bir şekilde saflığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan en temel yöntemlerden birisi örneklerin 260 nm ve 280 nm

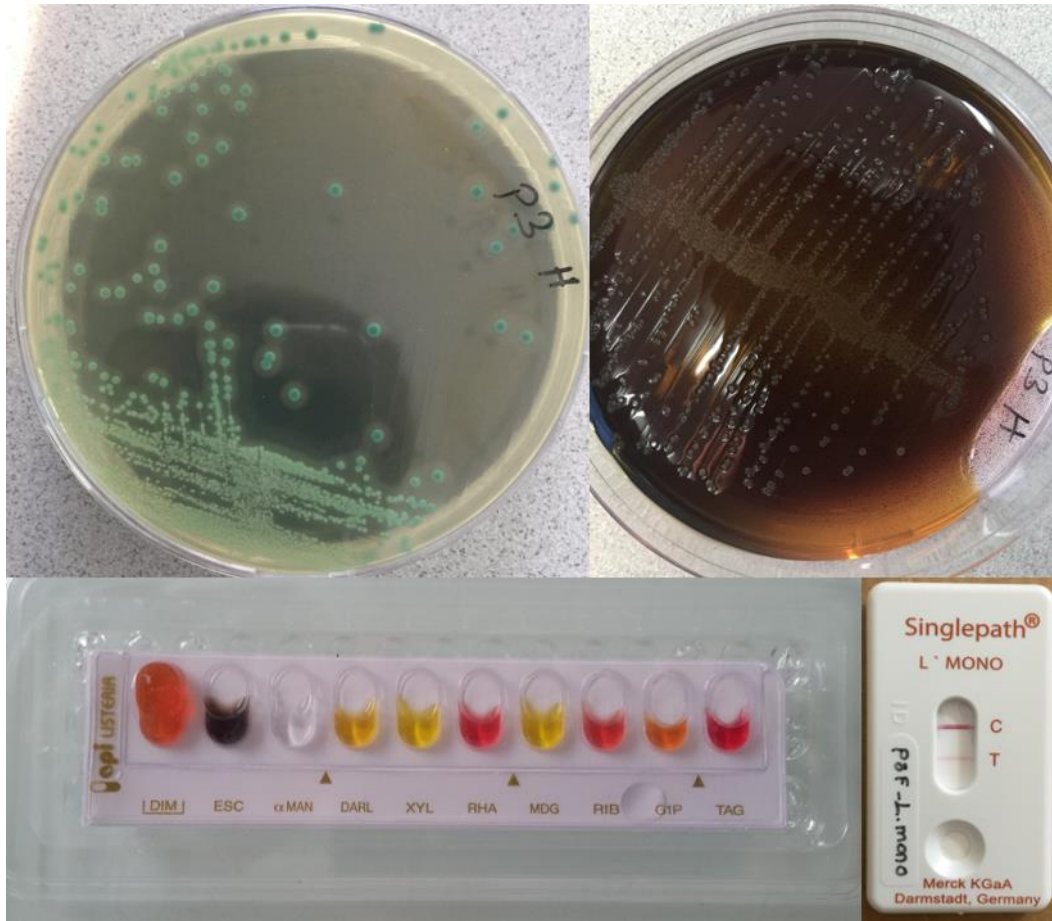
spektrofotometrik absorbans ölçümlerinin oranıdır. *L. monocytogenes* ATCC 7644, NCTC 10527 kültürlerinden belirtilen metot ile DNA ekstraksiyonu yapılmış ve kalite tespit edilmiştir

(Şekil 2). Bu yöntemin kültürlerden genomik ekstraksiyon saflığında yüksek derecede etkili olduğu görüldü.

Çizelge 6. Tavuk etlerinde LAMP, qPCR ve geleneksel metot sonuçları

Table 6. Results of LAMP, qPCR and traditional method in chicken meats

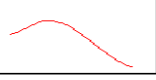
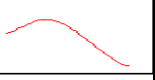
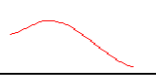
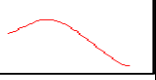
Metot	Örnekler (150 adet)/ Samples (n:150)					
	Bütün kanat (50) <i>Whole wing</i>		Göğüs (50) <i>Breast</i>		Baget (50) <i>Drumstick</i>	
	Pozitif <i>Positive</i>	Negatif <i>Negative</i>	Pozitif <i>Positive</i>	Negatif <i>Negative</i>	Pozitif <i>Positive</i>	Negatif <i>Negative</i>
LAMP	2	48	4	46	3	47
qPCR	2	48	4	46	3	47
Kültürel/ <i>Cultural</i>	2	48	4	46	3	47
Toplam/ <i>Total</i>	9 Pozitif/ Positive, 141 Negatif/Negative (9/150, %6)					



Şekil 1. Spesifik besiyerlerinde olası *L. monocytogenes* izolatları ve identifikasyonu

Figure 1. Isolates of *L. monocytogenes* in the specific media and their identification



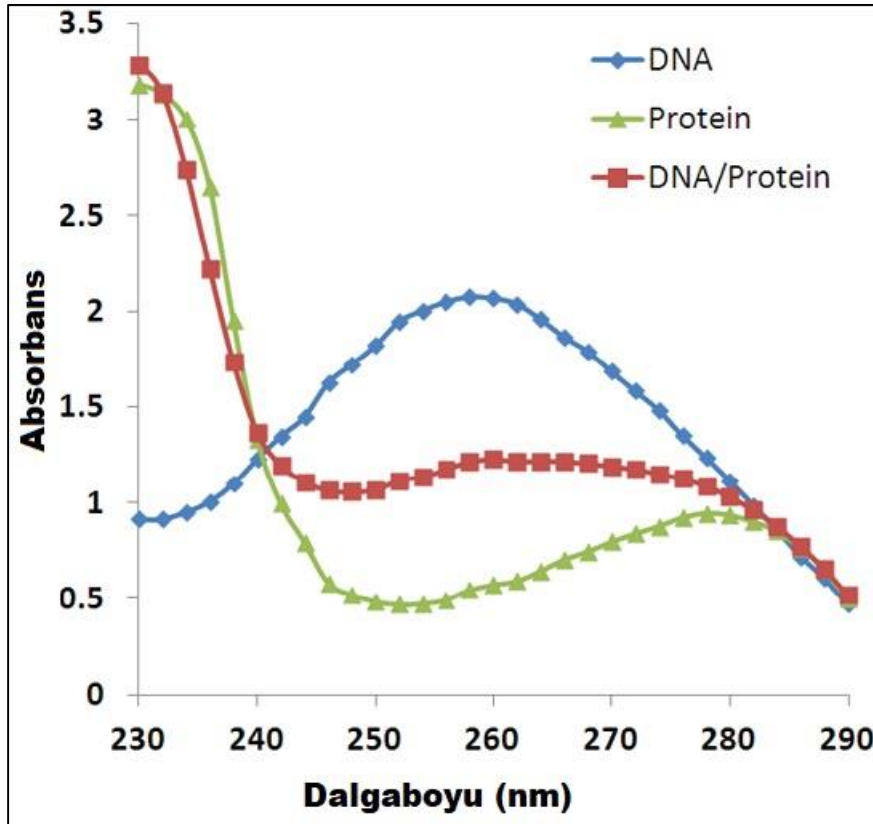
ATCC 7644	NCTC 10527	Well ID	Örnek1	Örnek1Tek	Well ID
		Spectrum			Spectrum
1,8 <b>832,388</b>	1,799 <b>844,302</b>	260/280 ng/ $\mu$ L	1,903 <b>193,811</b>	1,899 <b>196,302</b>	260/280 ng/ $\mu$ L

Şekil 2. *L. monocytogenes* ATCC 7644, NCTC 10527 kültürlerinden ve ön zenginleştirme sonrası materyalden izole edilen bakteriyel DNA kalitesi

Figure 2. Quality of bacterial DNA isolated from cultures of *L. monocytogenes* ATCC 7644, NCTC 10527 and material after pre-enrichment

DNA kalitesinin standarda yakın çıkması (Şekil 3); protein gibi safsızlıkların düşük seviyede olduğunu göstermektedir. Bu safsızlıkların düşük seviyede olması, PCR ve LAMP işlemlerinde inhibisyon riskinin elemine edilmesi açısından önemlidir (Brescia, 2012; Piskata vd., 2019). Bu çalışmada kullanılan termal lizasyon yöntemi

yüksek kalitede DNA sağlamıştır. Özellikle ön zenginleştirme sıvılarında çoğalan hedef bakterilerden DNA izolasyonunda 3 aşamalı santrifüj yöntemi sıvı besiyerinden ve tavuk etlerinden gelen inhibitörlerin elemine edilmesinde etkili olduğu görülmektedir (Van Tongeren vd., 2011).



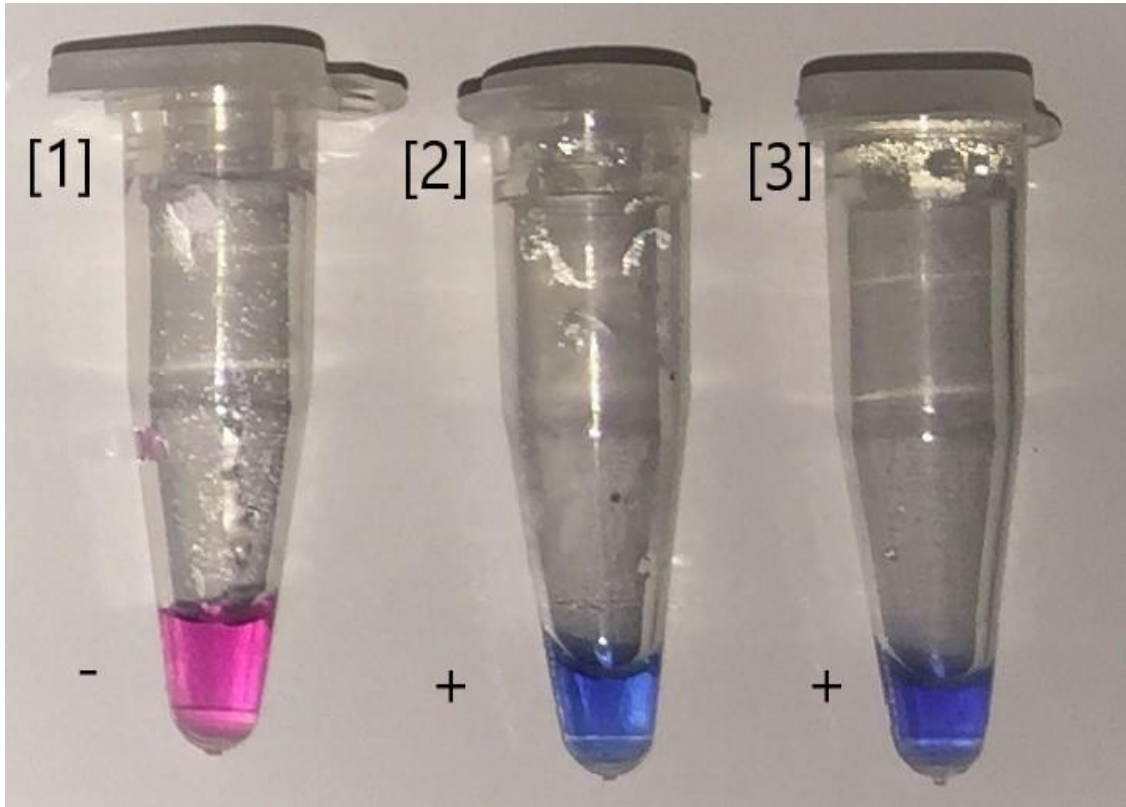
Şekil 3. DNA, protein ve DNA/protein biyomoleküllerin spektral karşılaştırılması (Brescia, 2012)

Figure 3. Spectral comparison of DNA, protein and DNA/protein biomolecules

### LAMP sonucun HNB ile gözlenmesi

Bu çalışmada, LAMP sonucu oluşan amplifikasyon ürünleri kolorimetrik olarak belirlendi. Bu amaçla reaksiyon ortamına ilave edilen HNB (150 µM) izotermal işleme tutulmadan önce mor menekşe bir renk oluşturmaktadır. LAMP sonucunda amplifikasyon ürünlerinin oluşmasıyla reaksiyon ortam rengi çıplak gözle görülebilecek şekilde gök mavi renge dönmektedir (Şekil 4). HNB boyasının

LAMP ürünlerinin belirlenmesinde kullanımı Goto vd. (2009) tarafından valide edilmiştir. HNB ile optimize edilen LAMP reaksiyon karışımlarıyla görsel belirleme birçok çalışmada kullanılmıştır (Soli vd. 2013; Mohon vd. 2014; Pang vd. 2019). Bu boya reaksiyon ortamına izotermal uygulamadan önce ilave edildiği için DNA inhibisyonuna sebep olabilecek kontaminasyonların da önüne geçilmektedir (Jin vd. 2019).



- [1] LAMP termal reaksiyon öncesinde ve sonrasında negatif kontrol  
[1] after and before LAMP thermal reaction for negative control  
[2] *L. monocytogenes* ATCC 7644 kültürüne ait DNA amplifikasyon sonucu,  
[2] *L. monocytogenes* ATCC 7644 DNA amplifications result  
[3] *L. monocytogenes* NCTC 10527 kültürüne ait DNA amplifikasyon sonucu  
[3] *L. monocytogenes* NCTC 10527 DNA amplifications result

Şekil 4. HNB-LAMP ürünlerinin çıplak gözle belirlenmesi  
Figure 4. Visual detection of HNB-LAMP products by naked eye

### LAMP için optimizasyon

Çalışmada LAMP için uygulanan 60°C ve 65°C sıcaklığın amplifikasyon açısından bir farklılığı görülmemiştir. Ancak; bazı çalışmalarda 65°C

izotermal uygulamanın amplifiye edilen LAMP ürünlerinin daha fazla miktarda oluştuğu bildirilmiştir (Zhao vd. 2010a; Zhao vd. 2010b; Wang vd. 2012).

Wu et al (2014) gıdalarda LAMP ile *L. monocytogenes* tespiti için yaptığı çalışmada 59-65°C sıcaklık aralığındaki uygulamadan 63°C sıcaklığın daha iyi sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir. Bu sürenin 45 dk uygulanmasıyla *L. monocytogenes* türüne ait *hlyA* veya *iap* geninin çoğaltıldığını da bildirmişlerdir. Belirtilen araştırmalara paralel olarak bu çalışmada 60-65°C sıcaklık aralığının 45 dk uygulanmasının yeterli olduğu görülmüştür.

### LAMP analizinin duyarlılığı ve belirleme limiti

*L. monocytogenes* ATCC 7644 kültürünün 5x10<sup>6</sup> CFU/mL, 5x10<sup>5</sup> CFU/mL, 5x10<sup>4</sup> CFU/mL, 5x10<sup>3</sup> CFU/mL, 5x10<sup>2</sup> CFU/mL, 5x10<sup>1</sup> CFU/mL, 5 CFU/mL dilüsyonlardan DNA ekstraktları LAMP ve qPCR için değerlendirildi. Bu saf kültür qPCR ve LAMP yöntemlerinin 5 CFU/mL seviyesinde belirleme limitine sahip oldukları görüldü. Bu kıyasla iki yöntemin *L. monocytogenes* için hassas olduğu belirlendi (Şekil 5). Shan vd. (2012) 96 *L. monocytogenes* ve 11 *Listeria* olmayan kültürle yaptıkları *hlyA* gen tabanlı LAMP çalışmada belirleme limitlerini 6 CFU/reaksiyon olarak bulmuşlardır. Wang vd. (2015) aynı geni hedef alarak yürüttükleri çalışmada LAMP için belirleme limitinin tampon sıvıda 2.4 CFU/reaksiyon, sütte ise 24 CFU/reaksiyon olduğunu belirtmişlerdir.

Saflaştırılmış genomik DNA için LAMP ve qPCR 800 ng-80 pg aralığını pozitif olarak tespit edebildi. Kısacası; saflaştırılmış DNA için de yöntemlerin aynı hassasiyetlere sahip olduğu görüldü. Geleneksel kültürel yöntem, LAMP ve PCR yönteminin aynı örneklerde pozitif veya negatif sonuçlar vermesi her üç yöntemin performansının aynı olduğunu göstermektedir. Fakat; LAMP yöntemi klasik kültür yöntemine kıyasla daha az zaman alıcıdır. Klasik kültürel yöntemin en az 72 saate kadar verebildiği bir sonucu LAMP 24 saate kadar verebilmektedir. Bu süre örneklerin ön zenginleştirilmesi ve DNA izolasyon aşamalarıyla en fazla 25-26 saat sürebilmektedir.

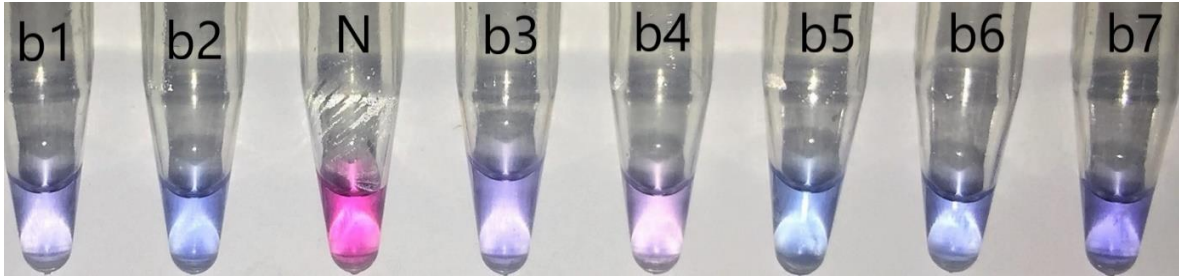
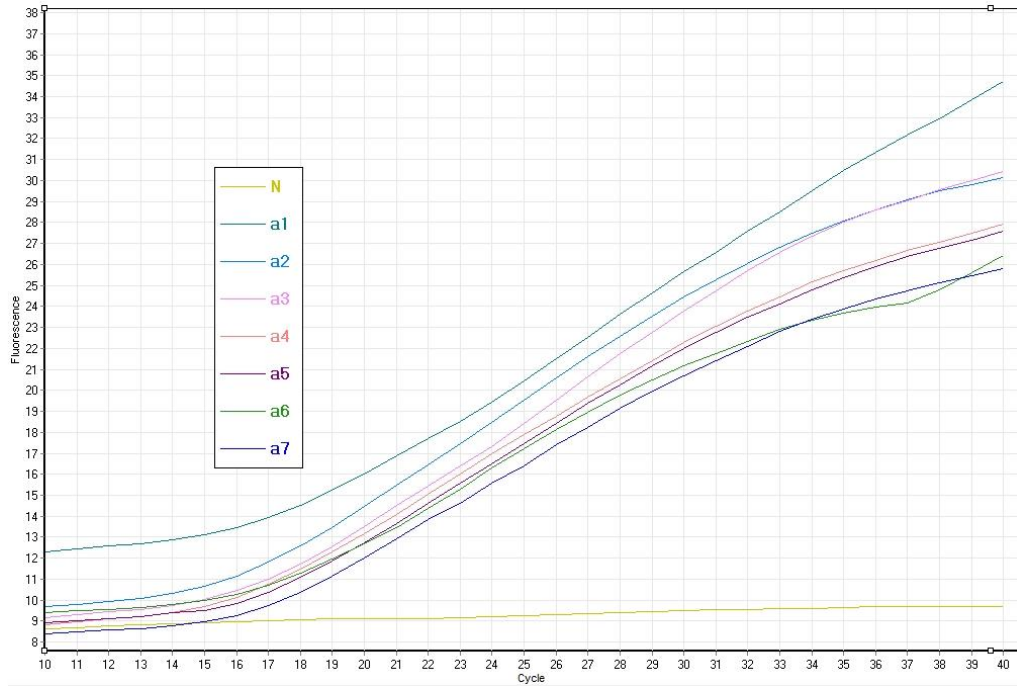
Klasik PCR ve LAMP uygulamasının karşılaştırıldığı birçok çalışmada LAMP'ın PCR'dan 10-100 kat daha hassas olduğu

vurgulanmıştır (Wang vd. 2010; Wang vd. 2012; Wu vd. 2014; Wachiralurpan vd. 2017). Klasik PCR ile kıyaslandığında LAMP için klasik bir laboratuvar termal döngüyü sağlayan bir cihaza ihtiyaç olmadan standart bir blok ısıtıcı ile amplifikasyon sağlanabilmektedir. Ayrıca qPCR için termal döngüyü gerçekleştiren cihaza ve sonuçları yorumlamayı sağlayan yazılımlara ihtiyaç vardır. Bunların aksine Şekil 4'de görüldüğü gibi LAMP sonucu çıplak gözle rahatlıkla yorumlanabilmektedir. qPCR ile karşılaştırıldığında LAMP kullanım kolaylığı ve ekipman gereksinimi gibi avantajlara sahiptir (Kiddle vd. 2012; Yan vd. 2019).

### LAMP primerlerinin özgüllüğü

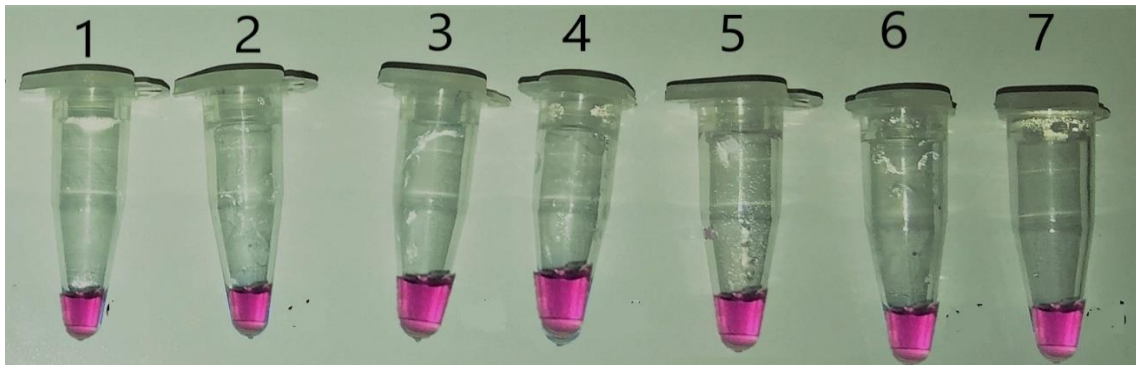
LAMP primerlerinin özgüllüğünü kontrol etmek amacıyla farklı bakterilerle eşleşip eşleşmediği kontrol edildi. Bu doğrultuda, (1) *L. ivanovii* ATCC 19119, (2) *L. innocua* NCTC 11288, (3) *Salmonella Typhimurium* (RSSK 95091), (4) *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560), (5) *Campylobacter coli* (ATCC 33559), (6) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25 923), (7) *Citrobacter freundii* (NCTC 6272) kültürlerine ait DNA ekstraktları kullanıldı. Primerler, *L. monocytogenes* ATCC 7644, NCTC 10527 haricinde pozitif amplifikasyon vermemiştir (Şekil 6).

LAMP reaksiyonun özgüllüğü, doğrudan amplifikasyon için hedeflenen genin dizisini kapsayan primer gruplarına bağlıdır. Bu nedenle hedef mevcut olmadıkça amplifikasyon gerçekleşmeyecektir (Parida vd. 2008; da Costa vd. 2014). Çalışmada kullanılan primerler *L. monocytogenes hlyA* genine göre dizayn edildiğinden diğer kültürlerle ait DNA kısımlarını çoğaltmamıştır. Bu veriler gıdalardan *L. monocytogenes*'in tespiti için LAMP yönteminde *hlyA* genin kullanımının doğruluğunu göstermektedir (Ledlod vd. 2020).



a1-a7: qPCR için 5 CFU-5x10<sup>6</sup> CFU/mL aralığındaki dilisüyonlar, N: Negatif kontrol (DNA olmadan)  
a1-a7: 5 CFU-5x10<sup>6</sup> CFU/mL serial dilutions for Qpcr, N: Negativecontrol (without DNA)  
b1-b7: LAMP için 5 CFU-5x10<sup>6</sup> CFU/mL aralığındaki dilisüyonlar, N: Negatif kontrol (DNA olmadan)  
b1-b7: 5 CFU-5x10<sup>6</sup> CFU/mL serial dilutions for Qpcr, N: Negativecontrol (without DNA)

Şekil 5. qPCR (a) ve LAMP (b) ve yöntemlerinin hassasiyeti  
Figure 5. Sensitivity of qPCR (a) and LAMP (b) methods



Şekil 6. LAMP primerlerinin özgüllüğü  
Figure 6. Specificity of LAMP primers

**SONUÇ**

Sonuç olarak; LAMP yöntemi ile tavuk etlerinden *L. monocytogenes* varlığının tespiti başarılı bir şekilde kısa sürede yapılabileceği görüldü. Klasik kültürel yöntemle kıyaslandığında %100 doğruluk gösteren bu yöntem qPCR ile de sonuçlar açısından uyum gösterdi. Fakat; hız açısından qPCR ve LAMP daha öncelikli bir tercih olabilir. Bununla birlikte PCR ekipmanları olmayan laboratuvarlarda LAMP reaksiyonu ısıtıcı blok yardımıyla izotermal koşullarda gerçekleştirilebilir. Ayrıca genetik materyalin amplifikasyon kontrolü LAMP reaksiyon ortamına ilave edilen HNB ile çıplak gözle anlık olarak gözlenebilmektedir.

**ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI**

Bu makalede yazarların, başka kişiler veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**YAZAR KATKILARI**

Bu çalışma MY ve SS tarafından tasarlanmış, analizler MY, AKY ve BÇ tarafından gerçekleştirilmiştir. Yazarlar makalenin yazımına katkıda bulunmuş, son halini okuyarak onaylamışlardır.

**TEŞEKKÜR**

Bu çalışmayı 2476 ID ve PRJ2016/267 kodlu proje ile maddi olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

**KAYNAKLAR**

Ayaz, N.D., Ayaz, Y., Kaplan, Y. Z., Dogru, A. K., & Aksoy, M. H. (2009). Rapid detection of *Listeria monocytogenes*, in chicken carcasses by IMS-PCR. *Annals of Microbiology*, 59(4), 741e744.

Brescia, P. (2012). Micro-volume purity assessment of nucleic acids using A260/A280 ratio and spectral scanning. BioTek Instruments, Winooski, VT, Tech. Rep. AN060112-12, Rev, 06-04.

da Costa, A. , de Lira Nunes, M. , Mendes-Marques, C. , de Almeida, A. and Leal, N. (2014) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Detection of *Listeria monocytogenes* and Major Pathogenic Serotypes. *American Journal of Analytical*

*Chemistry*, 5, 1057-1064. doi: 10.4236/ajac.2014.516112.

Feng, J., Dai, Z., Tian, X., & Jiang, X. (2018). Detection of *Listeria monocytogenes* based on combined aptamers magnetic capture and loop-mediated isothermal amplification. *Food Control*, 85, 443-452.

Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Carvalho, J., Abalde-Cela, S., Carbó-Argibay, E., Diéguez, L., vd. (2017). Combination of microfluidic loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles for rapid detection of *Salmonella* spp. in food samples. *Frontiers in Microbiology*, 8:2159.

Goh, S. G., Kuan, C. H., Loo, Y. Y., Chang, W. S., Lye, Y. L., Soopna, P., ... & Son, R. (2012). *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. *Poultry science*, 91(10), 2686-2690.

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46(3), 167-172.

Hitchins, A.D., Jinneman, K. and Chen, Y., 2017. BAM: Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Bacteriological Analytical Manual*.

Jamali, H., Paydar, M., Ismail, S., Looi, C. Y., Wong, W. F., Radmehr, B., vd. (2015). Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. *BMC Microbiology*, 15(1), 144.

Jin, Z., Ding, G., Li, G., Yang, G., Han, Y., Hao, N., ... & Li, W. (2020). Rapid detection of foodborne bacterial pathogens using visual high-throughput microfluidic chip. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(5), 1460-1466.

Kiddle, G., Hardinge, P., Buttigieg, N. vd. GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology* 12, 15 (2012). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-15>

Kreitlow, A., Becker, A., Ahmed, M., Kittler, S., Schotte, U., Plötz, M., & Abdulmawjood, A.

- (2021). Combined Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Rapid Detection and One-Step Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Meat Products. *Frontiers in Microbiology*, 12, 668824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.668824>
- Ledlod, S., Bunroddith, K., Areekit, S., Santiwatanakul, S., & Chansiri, K. (2020). Development of a duplex lateral flow dipstick test for the detection and differentiation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in meat products based on loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Chromatography B*, 1139, 121834.
- Lee, S. H., Ahn, J. Y., Lee, K. A., Um, H. J., Sekhon, S. S., Park, T. S., ... & Kim, Y. H. (2015). Analytical bioconjugates, aptamers, enable specific quantitative detection of *Listeria monocytogenes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 272-280.
- Mohon, A. N., Elahi, R., Khan, W. A., Haque, R., Sullivan Jr, D. J., & Alam, M. S. (2014). A new visually improved and sensitive loop mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of symptomatic falciparum malaria. *Acta Tropica*, 134, 52-57.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., vd. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), 63e69.
- Pang, B., Yao, S., Xu, K., Wang, J., Song, X., Mu, Y., ... & Li, J. (2019). A novel visual-mixed-dye for LAMP and its application in the detection of foodborne pathogens. *Analytical Biochemistry*, 574, 1-6.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18(6), 407-421.
- Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G. (2019). The quality of DNA isolated from processed food and feed via different extraction procedures. *Molecules*, 24(6), 1188.
- Rhoades, J. R., Duffy, G., & Koutsoumanis, K. (2009). Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiology*, 26(4), 357-376.
- Sagcan, H., & Kara, N. T. (2019). Detection of Potato ring rot Pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Scientific Reports*, 9(1), 1-8.
- Setiani, B. E., Elegado, F. B., Perez, M. T. M., Mabesa, R. C., Dizon, E. I., & Sevilla, C. C. (2015). API Listeria rapid kit for confirmatory phenotypic conventional biochemical test of the prevalence *Listeria monocytogenes* in selected meat and meat products. *Procedia Food Science*, 3, 445-452.
- Shan, X., Zhang, Y., Zhang, Z., Chen, M., Su, Y., Yuan, Y., ... & Shi, L. (2012). Rapid detection of food-borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 101-106.
- Srisrattakarn, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Wonglakorn, L., Saenjamla, P., ... & Chanawong, A. (2017). Rapid and simple identification of carbapenemase genes, bla NDM, bla OXA-48, bla VIM, bla IMP-14 and bla KPC groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2295-5>
- Tang, M. J., Zhou, S., Zhang, X. Y., Pu, J. H., Ge, Q. L., Tang, X. J., & Gao, Y. S. (2011). Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification. *Current Microbiology* 63(6), 511-516.
- Traunsek, U., Toplak, N., Jersek, B., Lapanje, A., Majstorovic, T., & Kovac, M. (2011). Novel cost-efficient real-time PCR assays for detection and quantitation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 40e46.

- Van Tongeren, S. P., Degener, J. E., & Harmsen, H. J. M. (2011). Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(9), 1053-1061.
- Wang DG, Huo GC, Ren DX, Li YG (2010) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detecting *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Journal of Food Safety* 30:251-262.
- Wang, G., Qian, W., Zhang, X., Wang, H., Ye, K., Bai, Y., & Zhou, G. (2015). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China. *Food Control*, 50, 202-208.
- Wang, L., Li, Y., Chu, J., Xu, Z., & Zhong, Q. (2012). Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains. *Molecular Biology Reports*, 39(1), 445-449.
- Wang, T., Kim, S. and An, J.H., 2017. A novel CMOS image sensor system for quantitative loop-mediated isothermal amplification assays to detect food-borne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 133, 1-7.
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2017). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiology*, 64, 164e171.
- Wu, R., Liu, X., Guo, B., Chen, F., & Wang, X. (2014). Development of double loop-mediated isothermal amplification to detect *Listeria monocytogenes* in food. *Current Microbiology*, 69(6), 839-845.
- Xiao, X. L., Zhang, L., Wu, H., Yu, Y. G., Tang, Y. Q., Liu, D. M., vd. (2014). Simultaneous detection of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*, by multiplex real-time PCR assays using high-resolution melting. *Food Analytical Methods*, 7(10), 1960e1972.
- Yan H, Zhang J, Ma D, Yin J. 2019. qPCR and loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Ustilago tritici*. *PeerJ* 7:e7766 <https://doi.org/10.7717/peerj.7766>
- Yamazaki W, Taguchi M, Kawai T, Kawatsu K, Sakata J, Inoue K, Misawa, N. 2009. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1597-1603.
- Zhao X, Li Y, Wang L, You L, Xu Z, Li L, He X, Liu Y, Wang J, Yang L (2010) Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Molecular Biology Reports*, 37, 2183–2188.