

***Listeria monocytogenes* Analizi (Kaynak 2)¹**

[01. Standart Analiz Yöntemi](#)

[02. İzolasyon](#)

[03. İdentifikasyon](#)

[04. Serolojik Testler](#)

[05. Faj Tiplendirmesi](#)

[06. Genetik Analizler](#)

[07. Listeria Sayımı](#)

[08. Hızlı Yöntemler](#)

[08.01. İmmunomanyetik Ayırma](#)

[08.02. Clearview \(Oxoid\) *L. monocytogenes* Hızlı Test Kiti](#)

[08.03. Pathalert \(Merck\) Listeria Hızlı Test Kiti](#)

[08.04 Diğer Hızlı ve Gelişmiş Analizler](#)

01. Standart Analiz Yöntemi

Gıdalarda *Listeria* aranması ve sonucun var/yok şeklinde verilmesi yaygın bir analiz yöntemi olmakla beraber, son zamanlarda *Listeria* sayımı için EMS yöntemi dışında selektif katı besiyeri kullanılarak yapılan sayımlar üzerinde de standart yöntem çalışmaları sürdürülmektedir.

L. monocytogenes 54 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda, dondurma işleminde ve diğer çeşitli uygulamalarda hasar görmüş olarak canlılığını sürdürebilir. Selektif olmayan besiyerlerinde bu hücreler kendilerini onararak normal gelişmelerini sürdürebilirler. Bununla beraber, selektif besiyerlerinde selektif inhibitörler hücrelerin kendilerini onararak normal gelişme sürecine girmelerine izin vermeyebilir. Bu nedenle *L. monocytogenes* 'i öldürmeyecek ancak sadece zarar verecek düzeyde işlem görmüş gıdalarda *L. monocytogenes* sayımında farklı besiyerlerinde selektif inhibitörlerin çeşidi ve/veya konsantrasyonuna bağlı olarak kabul edilebilir limitlerin çok üzerinde farklı sayım sonuçları alınabilmektedir. Ayrıca *L. monocytogenes* hiç bir şekilde *Salmonella* 'dan daha az tehlikeli bir bakteri değildir. Bu nedenle gıdaların *L. monocytogenes* açısından analizinde sayım yerine doğrudan 25 g örnekte var/yok testi tartışmasız bir şekilde çok daha akılcıdır.

Bu çerçevede standart var/yok testi ile selektif olmayan/yarı selektif/selektif besiyerlerinde bağımsız veya ardışık ön zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme, tipik kolonilerin izolasyonu ve identifikasyonu ile analiz tamamlanır.

Listeria, psikrotrofik özelliğinden yararlanılarak önceleri selektif olmayan zenginleştirme ortamında 2 aya kadar süren bir soğuk zenginleştirme ve bunu izleyen katı besiyerine sürme

¹ Kaynak : Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları ; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 891112005

yöntemi kullanılarak belirlenirken, bugün selektif besiyerlerinde yapılan zenginleştirme tekniklerinin uygulanması ile analiz süresi oldukça kısalmıştır. Bununla beraber çeşitli uluslararası kuruluşlarda kullanılan yöntemlerin hiçbirisi *Listeria* izolasyonu için %100 duyarlı ve etkili değildir.

Gıdalarda aranması veya sayılması üzerinde pek çok çalışmalar yapılmasına karşın *Listeria* halen gıda mikrobiyolojisinde en zor belirlenen bakteriler arasındadır. Bunun nedeni *Listeria* 'nın gıdalarda az sayıda olmasına karşın çok sayıda refakatçi bakteri ile birlikte olmasıdır. Ayrıca *Listeria* için kullanılan selektif katı besiyerlerinde *Listeria* küçük koloniler oluştururken, gelişmesi engellenemeyen bakterilerin bu küçük kolonileri örtecek şekilde büyük koloni meydana getirebilmeleri *Listeria* belirlenmesinde bir diğer zorluktur. Dolayısıyla gıdalarda *Listeria* aranmasında sıklıkla sahte negatif sonuçlar alınmaktadır.

Listeria ile çalışılması zor ve tehlikelidir. Laboratuvarında *L. monocytogenes* ve *L. innocua* 'nın şahit olarak denemelerde kullanılması dahi laboratuvarında çok fazla sayılarda *L. monocytogenes* bulunmasına neden olmaktadır. Çocuk düşürmeye yol açabilmesi nedeni ile gebelerin ve gebelik şüphesi olanların *Listeria* analizlerine katılmamaları başta ISO olmak üzere çeşitli uluslararası kuruluşlar tarafından uyarılmıştır.

Diğer mikroorganizma gruplarında olduğu gibi, uluslararası nitelikteki kontrol kuruluşları tarafından gıdalarda *Listeria* spp. aranmasına yönelik yöntemler arasında başta kullanılan besiyerleri olmak üzere çeşitli uygulama farklılıkları bulunmaktadır. Aşağıda bu yöntemler özet olarak verilmiştir.

02. İzolasyon

ISO (International Standards Organization) : 25 g-ml gıda örneği 225 ml ½ konsantrasyonda (inhibitörleri yarım konsantrasyonda içeren) Fraser broth besiyerinde ön zenginleştirme amacı ile 30 °C 'da 24 saat süre ile inkübe edilir. Bu sürenin sonunda kültürden polymyxin - acriflavine - lithium chloride - ceftazidime - esculin - mannitol (PALCAM) ve/veya Oxford agar besiyerlerine sürme yapılırken aynı zamanda 0,1 ml kültür 10 ml tam konsantrasyonda (inhibitörleri normal konsantrasyonda içeren) Fraser broth besiyerine aşılanır ve 35-37 °C 'da 24-48 saat inkübe edilir. Bu inkübasyon sürelerinin bitiminde bu kültürlerden de PALCAM ve/veya Oxford agar besiyerlerine sürme yapılır. PALCAM ve/veya Oxford agar besiyerleri 30-37 °C 'da 48 saate kadar inkübe edilir ve inkübasyonun 24 ile 48. saatlerinde tipik en az 5 koloni tryptone soy - yeast extract agar (TSA-YE) besiyerine sürülür. Bu besiyerinde 30 / 35-37 °C 'da 24 saat inkübasyonlardan sonra elde edilen koloniler tanımlama amacı ile ileri aşama testlere alınır. Refakatçi floranın az olduğu tahmin edilen örneklerde Oxford agar besiyerinde 30 °C, çok olduğu örneklerde ise 37 °C 'da inkübasyon yapılması gerekmektedir. Refakatçi floranın yoğunluğu hakkında ön bilgi yoksa doğal olarak inkübasyon 37 °C 'da yapılır. Hangi inkübasyon sıcaklığı seçilirse seçilsin analiz raporunda inkübasyon sıcaklığı belirtilmelidir. ISO yönteminde selektif inhibitörlerin yarım konsantrasyonda kullanılması ile yapılan yarı selektif ön zenginleştirme ile hasar görmüş *Listeria* hücrelerinin onarılması sağlanmaktadır.

FDA (Food and Drug Administration) : 25 g-ml gıda örneği selektif inhibitörler katılmadan 225 ml *Listeria* enrichment broth (LEB) besiyerinde homojenize edilip, 30 °C 'da 4 saat inkübe edilir, sonra selektif inhibitörler katılıp 44 saat süre ile aynı sıcaklıkta inkübasyona devam edilir. Toplam inkübasyon süresi olan 48 saat sonunda buradan Oxford agar ve lithium

chloride-phenyletanol-moxalactam (LPM) agar besiyerlerine sürülür, Oxford agar 35 °C 'da, LPM agar 30 °C 'da ve her bir besiyerinden 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra tipik en az 5 koloni TSA-YE besiyerine sürülür. 37 °C 'da 24 ve 48 saat inkübasyonlardan sonra elde edilen koloniler tanımlama amacı ile ileri aşama testlere alınır. FDA yönteminde de selektif inhibitörler katılmadan önce 4 saat süre ile yapılan ön zenginleştirme işlemi ile hasar görmüş *Listeria* hücrelerinin onarılmasına izin verilmektedir.

IDF (International Dairy Federation) : 25 g-ml gıda örneği 225 ml *Listeria* enrichment broth (LEB) besiyerinde homojenize edilip, 30 °C 'da 48 saat süreli ön zenginleştirmeden sonra PALCAM ve/veya Oxford agar besiyerlerine sürülür, 30 °C 'da 48 saat inkübasyondan sonra tipik en az 5 koloni TSA-YE besiyerine sürülür. 37 °C 'da 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen koloniler tanımlama amacı ile ileri aşama testlere alınır.

USDA (United States Department of Agriculture) : Et ve tavuk etleri için 25 g-ml gıda örneği 225 ml University of Vermont (UVM) I broth besiyerinde homojenize edilir ve 30 °C 'da 48 saat süre ile inkübe edilip buradan alınan 0,1 ml kültür 10 ml UVM II broth besiyerinde 30 °C 'da 24 saat süre ile inkübe edilir ve LPM agar besiyerine sürülür. 30 °C 'da 24 saat inkübasyondan sonra tipik en az 5 koloni TSA-YE besiyerine sürülür. 35 °C 'da 24 saat süreli inkübasyondan sonra elde edilen koloniler tanımlama amacı ile ileri aşama testlere alınır.

Bu yöntem kargaşalığının ötesinde aynı isimli besiyerlerinde de bileşim farklılıkları görülmektedir. Örneğin LEB, FDA 'ya ve IDF 'ye göre farklı selektif katkıların ilavesi ile hazırlanmaktadır. *Listeria* aranmasında kullanılan selektif besiyerlerinin hazırlandıktan sonra çok kısa süreli depolanma özellikleri bu bakterinin analizini güçleştiren ve pahalı kılan bir başka olumsuzluktur. Bununla beraber kullanılan tüm besiyerleri ve katkıları ticari preparat olarak rahatlıkla sağlanabilmektedir.

Listeria aranmasında selektif zenginleştirme ortamı olarak besiyeri üreten firmalar tarafından önerilen ve çoğu standart metotlarda verilenlerin modifikasyonu olan başka besiyerleri de vardır. ISO 9000 serisi uygulamalarında bu besiyerleri de kullanılabilmektedir.

Selektif katı besiyerlerinde *Listeria* tipik kolonileri ile tanımlanır. LPM agar çok yüksek selektivitede olmakla beraber ayırt edici (diferansiyel) bir besiyeri değildir. *Listeria*, PALCAM agar besiyerinde 1,5-2 mm çapında zeytin yeşili-gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu kolonileri ile, Oxford Agar besiyerinde ise 2-3 mm çapında siyahımsı-yeşil renkli ve çökük merkezli, siyah-kahverengi zonlu kolonileri ile tanınır.

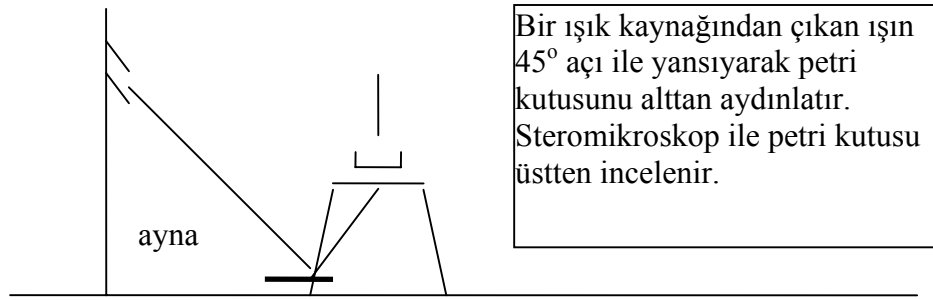
Selektif katı besiyerlerinden elde edilen tipik koloniler yukarıda 4 grup halinde verilen analiz yöntemlerinin tümünde TSA-YE besiyerine sürülmekte ve burada oluşan kolonilerin morfolojik incelenmesi ile ön doğrulama işlemi yapılmaktadır. *Listeria* kolonileri bu besiyerinde 35-37 °C 'da 18-24 saat inkübasyon sonunda 1-2 mm çapında konveks, renksiz ya da opak düzgün kenarlı koloniler oluşturur.

Yapılan son çalışmalar ile ısı işlemi ile hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in izolasyonu için zenginleştirme besiyerine 0,5 g/l düzeyinde L-cysteine ilavesi ile daha yüksek düzeyde izolasyon sağlanabildiği gösterilmiştir.

03. İdentifikasyon

TSA-YE besiyerinde tipik *Listeria* morfolojisi veren koloniler basit testler ile ön identifikasyona alınır. İzolatın Gram pozitif, asılı damla testinde takla atar gibi hareketli, yarı katı hareket besiyerinde tipik şemsiye görünümü verecek şekilde hareketli, katalaz pozitif, D-glikozdan asit oluşturan, eskulin hidrolizi, metil red ve Voges-Proskauer pozitif olduğunun saptanması ile *Listeria* cins olarak doğrulanır. 25 °C üzerinde yapılan hareket testlerinde *Listeria* 'nın hareketsiz olacağı dikkate alınmalı ve özellikle yarı katı hareket besiyerinde hareket testi oda sıcaklığında 24-48 saat süren inkübasyon ile yapılmalıdır.

Listeria ön identifikasyonunda yaygın olarak kullanılan bir test, Henry aydınlatması olarak da tanımlanan, 45° 'lık özel bir ışık yansıması ile steromikroskopta 15-25 büyütme ile koloni renginin incelendiği analizdir. Bu analizde TSA-YA besiyerinde gelişen koloniler incelenir. *Listeria* kolonileri bu besiyerinde Henry aydınlatması ile mavi renkte, diğer bakteri kolonileri sarımsı - turuncu renkte görülür. Petri kutusu alttan ışık alabilecek bir yere konulur, standart bir beyaz ışık kaynağından çıkan ışınlar önce 45° açı ile düz (ya da bazı araştırmacıların önerdiği şekilde konkav ; içbükey) bir aynaya gelir, buradan petri kutusuna 45° açı ile yansır. *Enterococcus faecium* gibi selektif katı besiyerinde gelişebilen ve *L. monocytogenes* 'in küçük koloniler yapmasına neden olan refakatçı floranın yoğun varlığında dahi Henry aydınlatması ile *L. monocytogenes* belirlenebilmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Henry aydınlatması

İzolat cins bazında *Listeria* olarak doğrulandıktan sonra çeşitli kültürel ve biyokimyasal testler ile tür bazında standart identifikasyon yapılır. Bu amaçla en çok kullanılan testler ile *Listeria* türlerinin ayrımı Çizelge 1' de verilmiştir. *Listeria* 'nın biyokimyasal identifikasyonunda başta API olmak üzere minyatürize hazır ticari kitler de kullanılmaktadır.

Çizelge 1. *Listeria* türlerinin biyokimyasal test sonuçları

Testler	<i>monocyt.</i>	<i>ivanovii</i>	<i>innocua</i>	<i>welshime.</i>	<i>seeligeri</i>	<i>grayi</i>
Ramnoz	+	–	v (2)	v(2)	–	–
Ksiloz	–	+	–	+	+	–
Mannitol	–	–	–	–	–	+
Hippurat	+	+	+	+	+	–
β-Hemoliz	+	+	–	–	+	–
Nitrat	–	–	–	–	–	–
H ₂ S (1)	–	–	–	–	–	+
CAMP S.a.	+	–	–	–	+	–
CAMP R.e.	–	+	–	–	–	–

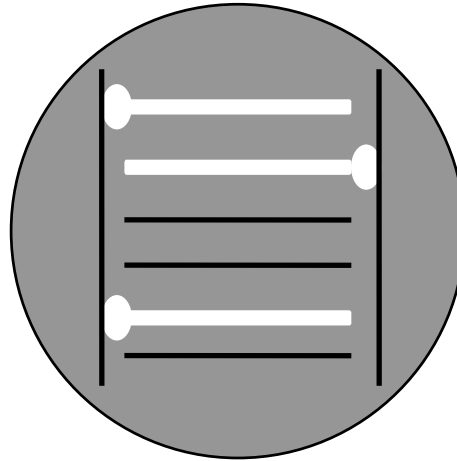
(1) Kurşun asetat şerit ile , (2) değişken, S.a.: *Staphylococcus aureus*, R.e. : *Rhodococcus equi*

Listeria identifikasyonunda önemli bir yer tutan Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) testi aşağıda açıklanmıştır. Diğer testler standart şekilde yapılır.

Staphylococcus aureus ve *Rhodococcus equi* kültürleri koyun kanı ile hazırlanan kanlı agar plağına birbirine paralel ve zıt kutuplarda olacak şekilde çizgi ekim tarzında bir hat boyunca ekilir. İnokulum ince ve düz olmalıdır. Bunun için inokülasyon özesi agara dik açı yapacak şekilde tutulur. Deney suşları benzer şekilde dik açıyla ve çizgi ekim tarzında ekilir. Deney kültürü ile *S. aureus* ve *R. equi* kültürleri birbirine temas etmemeli, ancak 1-2 mm ayrı olacak şekilde çok yakın olmalıdır. Bir kaç deney suşu aynı petri kutusuna ekilebilir. Aynı zamanda *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *L. ivanovii* kontrol kültürleri de çizgi ekim tarzında ekilir. Ekimi yapılan petri kutuları 35 - 37 °C 'da 18-24 saat inkübe edilir.

S. aureus ve *R. equi* kültürleri ile deney kültürlerinin kesiştiği noktada β-hemoliz zonunun artması pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. *R. equi* ile *L. ivanovii* hemoliz reaksiyonu oluşturur. *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri*, *S. aureus* ile kesiştiği alanda geniş hemoliz reaksiyonu oluşturmaktadır. *L. innocua* ise hemoliz negatiftir (Şekil 2). *S. aureus* veya *R. equi* ile kuvvetlenen hemoliz ters ok başı, raket, şişe şeklinde tanımlanmaktadır.

	S	R	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	⇒
<i>L. ivanovii</i>	-	+	⇒
<i>L. innocua</i>	-	-	⇒
<i>L. welshimeri</i>	-	-	⇒
<i>L. seeligeri</i>	+	-	⇒
<i>L. grayi</i>	-	-	⇒



S: *S. aureus*, R: *R. equi*

Şekil 2. CAMP Testi ; Petri kutusunda soldaki dikey çizgi *S. aureus*, sağdaki dikey çizgi ise *R. equi* 'dir.

Şekil 2 'de de görüldüğü gibi *L. innocua*, *L. welshimerii* ve *L. grayii* hemolitik olmadıkları için besiyerinde sadece normal gelişme gösterirler, diğer türler ise zaten hemolitik oldukları için gelişme hattı çevresinde hemoliz gösterirler. Hemoliz, *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* 'de *S. aureus* 'a yaklaştıkça, *L. ivanovii* 'de ise *R. equi* 'ye yaklaştıkça artar. Bu durumda izolatin tür bazında tanımlı gerekiyorsa her iki bakteri de dikey olarak petri kutusuna sürülmeli, sadece *L. monocytogenes* olup olmadığı araştırılıyor ise sadece *S. aureus* sürülmesi yeterlidir. Hatta bu koşulda *S. aureus* ortaya dikey bir çizgi olarak sürülüp sağına ve soluna yatay olarak daha fazla sayıda izolat sürülebilir. Nitekim CAMP testi, koyun kanı ile hazırlanmış petri kutularında *S. aureus* 'dan elde edilmiş β-Lysine içeren disklerin

kullanılması ile de yapılabilir. Bu şekilde *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* 'nin hemoliz reaksiyonları disk etrafında kuvvetlendirilir.

CAMP testinde kullanılan koyun kanı ilave edilmiş agarlı besiyerinin olanaklar ölçüsünde taze hazırlanması ve normalinden biraz daha ince dökülmesi ile hemoliz reaksiyonu daha kolay değerlendirilmektedir. *L. monocytogenes* 'in nadir olmak üzere *R. equi* ile de pozitif sonuç veren suşlarına rastlandığı gibi *S. aureus* ile reaksiyon vermeyen atipik suşları da vardır. Biyokimyasal testleri *L. monocytogenes* 'i tanımlayan ancak CAMP testinde (S-) alınan sonuçlar bu şekilde atipik *L. monocytogenes* olarak identifiye edilir.

04. Serolojik Testler

Diğer bakterilerde olduğu gibi serotiplendirme somatik O ve flagellar H antijenlerine göre yapılır ancak, diğer bakterilerden farklı olarak aynı serotipin farklı türlerde de olması nedeni ile serotiplendirme identifikasyon değil, daha ziyade hastalık etmeninin hangi serotipte olduğunu belirlenmesi için uygulanır. Çizelge 2 'de *Listeria* serotiplerinin türlere dağılımı verilmiştir.

Çizelge 2. *Listeria* serotiplerinin türlere dağılımı.

Türler	Serotipler
<i>L. grayi</i>	S (spesifik)
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. seeligeri</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4d, 6b
<i>L. welshimeri</i>	1/2a, 4c, 6a, 6b

05. Faj Tiplendirmesi

Lizogenik türlere ait bütün *Listeria* fajları özellikle klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Salgınlarda aynı faj tipine giren suşların izole edilmesi epidemiyolojik olarak önemli olduğu gibi gıdadan ve hastadan aynı suşun izole edilmesi gıdaların salgınlardaki rolünü de belirlemektedir. Bununla beraber bazı suşların fajlar ile tiplendirilememesi bu yöntemin yaygın kullanımını azaltmaktadır. Fajlar ile tiplendirilemeyen suşların oranı değişken olup genel olarak gıda ve çevresel izolatlarda bu oran daha yüksektir.

06. Genetik Analizler

1989 yılından bu yana multilokus enzim elektroforezi, ribotiplendirme, DNA mikrostrestriksiyon ve makrostrestriksiyon profil analizi, polimorfik DNA 'nın rastgele amplifikasyonu (Random Amplified Polimorfik DNA ; RAPD) gibi moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak *L. monocytogenes* tiplendirmesi yapılmaktadır.

07. *Listeria* Sayımı

Listeria, standart EMS yöntemi ile sayılabileceği gibi yukarıda belirtilen selektif katı besiyerlerine doğrudan ekim ile de sayılabilir. Bu yöntemde seyreltme çözeltisi olarak inhibitör katılmamış Fraser broth kullanılır ve 10-1 seyreltiden Fraser agar, PALCAM agar ve yumurta sarısı içeren PALCAM (PALCAM +EY) agar besiyerlerine ekim yapılır. 10-2, 10-3 seyreltilere gerek duyulursa yine aynı seyreltme çözeltisi kullanılır. 35 - 37 °C 'de yapılan inkübasyonda 24 ve 48 saatlerde koloniler kontrol edilir. PALCAM agar ve Oxford agar besiyerlerinde tipik *Listeria* koloni morfolojileri yukarıda verilmiştir. PALCAM + EY agar besiyerindeki koloniler standart PALCAM agar besiyerindeki morfolojide onlardan daha büyük olarak 2 - 2,5 mm çaplıdırlar. *Listeria* sayımında tipik koloniler sayıldıktan sonra çalışma bu aşamada doğrulamanın ve tür tayininin yapılmadığı, sadece kullanılan besiyerinde oluşan tipik *Listeria* koloni sayısı ile bu sonucun verildiği belirtilerek bitirilebilir. Eğer tür bazında doğrulanmış sayı verilmesi gerekiyor ise standart yöntemle göre (bkz. bölüm 06) tipik koloniler sayılır, bunları temsilen 5 adetten az olmamak üzere koloniler izole edilir, her biri yukarıda belirtildiği gibi ayrı ayrı doğrulanır ve identifiye edilir, burada bulunan doğrulanmış ve *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiş izolat sayısı toplam tipik koloni sayısına oranlanarak ve seyreltme faktörü dikkate alınarak gıdanın 1 g ya da ml 'sindeki *L. monocytogenes* sayısı verilir.

08. Hızlı Yöntemler

08.01. İmmunomanyetik Ayırma

İmmunomanyetik ayırma (Immunomagnetik Seperasyon ; IMS) yöntemi 1990 'lı yılların başında geliştirilmiş bir yöntemdir. Yöntemin prensibi manyetik taşıyıcılar üzerine tutuklanmış antikorların hedef mikroorganizma hücrelerini tutabilmeleridir. Özgül monoklonal veya poliklonal antikorlar ya da lektinler ve agglutininler hedef hücreleri bağlamak için kullanılmaktadır. Kullanılan partiküllerin çoğu süper manyetik olup bunlar sadece dış bir manyetik alan varlığında bu özelliği göstermekte ve bu şekilde kolaylıkla bu süspansiyondan ayrılmaktadırlar. Ancak bu partiküller normal ortamda birbirlerini çekmedikleri için kolaylıkla homojen bir karışım olarak süspanse edilebilmektedirler. Yöntem, gıda mikrobiyolojisinde *L. monocytogenes* ile *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 gibi diğer patojenlerin ve *S. aureus*, *C. perfringens*, *B. cereus* gibi bazı patojen toksinlerinin belirlenmesinde kullanılabilmektedir. İmmunomanyetik ayırma yöntemi ile gıdalarda *L. monocytogenes* belirlenmesi için önce standart bir şekilde önzenginleştirme yapılır ve bu kültür immunomanyetik ayırma tekniğinin uygulanması için antikorları içeren özel bir süspansiyon ile karıştırılır. Daha sonra manyetik uygulama aşaması ile ayırma ve konsantrasyon işlemi tamamlanır. Bu yöntemin en önemli özelliği ayrılan kısmın rekonstrüte edilerek bu kısmın standart kültürel ve/veya serolojik testlere alınabilmesidir. İşlem önzenginleştirme aşamasından sonra 30 dakika içinde tamamlanmaktadır.

08.02. Clearview (Oxoid) *L. monocytogenes* Hızlı Test Kiti

Listeria türlerinde bulunan A, B, C ve D flagellar antijenlerinden en yaygın olarak bulunan B antijenidir (bkz. çizelge 2). Clearview hızlı test kiti B antijeninin varlığının araştırılması ile

Listeria spp. varlığının gösterilmesi üzerine kurulmuş bir hızlı test kitidir. 2 aşamalı zenginleştirme, ekstraksiyon ve Clearview ünitesinin kullanımı ile sonucun alınmasına kadar geçen süre toplam analiz süresi 43 saattir. Analizin ilk aşaması yarım konsantrasyonda hazırlanmış Fraser Broth ile örneğin homojenizasyonudur. Standart şekilde 25 g örnek 225 ml önzenginleştirme besiyeri ile uygun bir şekilde homojenize edilir. 30 °C 'da yapılan inkübasyon süresi en az 21 saat iken bu süre 24 saati geçmemelidir. Önzenginleştirme sonunda 0,1 ml kültür 10 ml Buffered *Listeria* Enrichment broth (BLEB) besiyerine aktarılır ve aynı şekilde 30 °C 'da 21 - 24 saat inkübasyona bırakılır. Selektif zenginleştirme kültürünün sarsılmasına ve karıştırılmamasına dikkat edilerek tüpün üst kısmından 2 ml alınır ve somatik antijenlerin eliminasyonu amacıyla 80 °C 'daki su banyosunda 20 dakika süre ile tutulur. Oda sıcaklığında kendi halinde bırakılarak soğutulan bu ekstraktan 135 µl alınıp kitin örnek koyma penceresine aktarılır. Bu işlem sırasında pıhtı ve/veya viskoz bir materyalin alınmamasına dikkat edilir. 20 dakika içinde kontrol penceresinde mavi bir renk oluşumu kitin doğru olarak çalıştığını gösterir. Sonuç alma penceresindeki mavi çizgi ise *Listeria* flagella antijeninin varlığını ve dolayısı ile analiz edilen örnekte *Listeria* olduğunu gösterir. Pozitif sonuç alındıktan sonra selektif zenginleştirme kültüründen standart yöntemlerle uygun bir selektif katı besiyerine sürme yapılır ve analize devam edilir.

08.03. Pathalert (Merck) *Listeria* Hızlı Test Kiti

Flagella antijenlerinin yüksek inkübasyon sıcaklığında gelişmemesi ve dolayısıyla sahte negatif reaksiyonların alınabilmesine karşın bu kit flagella antijenlerini değil *Listeria* 'ya özgü ekstraselüler protein olan p60 'ın belirlenmesi ve dolayısıyla analiz edilen örnekte *Listeria* olup olmadığını gösteren hızlı bir sistemdir. *L. monocytogenes* ve *Listeria* spp. için kullanılan iki ayrı formu vardır. *L. monocytogenes* belirlenmesi için 25 g örnek 225 ml yarım konsantrasyonda Fraser Broth ya da PALCAM Broth besiyerinde homojenize edilip, 37 °C 'da 16 - 24 saat inkübasyondan sonra 10 ml tam kuvvette Fraser Broth besiyerine 0,1 ml aktarılır. 37 °C 'da 22 - 24 saat inkübasyondan sonra diğer işlemlere *Listeria* spp. 'de anlatıldığı şekilde devam edilir. Selektif bir besiyerinden izole edilen tipik bir koloninin *L. monocytogenes* olup olmadığı bu kit ile çok hızlı bir şekilde belirlenebilir. İdentifiye edilecek koloninin 0,2 ml distile su içinde süspande edilmesi ve yukarıda özetlendiği şekilde kaynatılıp santrifüjlendikten sonra Pathalert *L. monocytogenes* kitine uygulanması ile çok kısa bir süre içinde tanımlama işlemi bitirilebilir.

08.04 Diğer Hızlı ve Gelişmiş Analizler

Çeşitli enzim immuno analiz kitleri ile DNA - RNA hibridizasyon teknikleri *L. monocytogenes* belirlenmesinde yüksek duyarlıkta kullanılmaktadır. Bu kitlerin bir kısmı AOAC ve/veya AFNOR tarafından onaylanmıştır. Standart impedans yöntemi ile de *Listeria* spp. belirlenmesi mümkündür. Bu yöntemde tür bazında ayırım yapılamamaktadır.