

***Listeria monocytogenes* –bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen.**

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

NMKL 136:2010
ISO/DIS11290-1:20144

(1/2- Fraser 30 °C / 24 ±2 h, ALOA ja LMBA 37 °C / 24-48 h; Fraser 37 °C / 24 ± 2 h, ALOA ja LMBA 37 °C / 24-48 h, naudanveriagar 37 °C / 24 h, β-hemolyysi; ramnoosi- ja ksyloosiliemi 37 °C / 1-5 vrk / API Listeria; valinnaisena katalaasikoe, gramvärjäys, liikkuvuus- ja CAMP-koe.)

Ei poikkeamia viitemenetelmästä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *Listeria monocytogenes* -bakteerin osoittamiseen elintarvikkeista ja rehuista (kvalitatiivinen eli rikastusmenetelmä). Sitä sovelletaan myös ympäristönäytteiden tutkimiseen.

3 Määritelmä(t)

Listeria monocytogenes on lyhyt, ohut, grampositiivinen sauvabakteeri, joka on katalaasiposiivinen, oksidaasinegatiivinen, liikkuva, hydrolysoi eskuliinia ja muodostaa kapean β-hemolyyttisen vyöhykkeen veriagarilla. *L. monocytogenes* muodostaa happoa ramnoosista, mutta ei ksyloosista.

4 Periaate

Näyte homogenoidaan ja rikastetaan kaksivaiheisesti.

Eristämiseen käytetään kahta, eri toimintaperiaalle perustuvaa *L. monocytogenes* -selektiivistä agaralustaa, ALOA ja LMBA, jotka viljellään esirikasteesta ja rikasteesta. Eristetty kanta tunnistetaan morfologisten ja biokemiallisten ominaisuuksien perusteella. Mikäli *L. monocytogenes* todetaan 1/2 –Fraser –rikasteesta, tutkimusta ei tarvitse jatkaa Fraser-rikasteesta. Serotyypitys tehdään menetelmäohjeen Evira 3498 mukaisesti.

5 Mahdolliset virhelähteet

Homejuustot ja muut pastöroimattomasta maidosta valmistetut pehmeät juustot ovat vaikeita matriiseja. Mm. *Bacillus* –suvun bakteerit voivat häiritä osoittamista.

Jotkut *L. monocytogenes* –kannat (esim. hapon vuoksi stressaantuneet) muodostavat LMBA-alustalla pesäkkeitä, joissa hemolyysi on rajoittunut pesäkkeen alle. On myös todettu *L. monocytogenes* –kantoja, jotka eivät ole β -hemolyyttisiä, mutta nämä ovat todennäköisesti hyvin harvinaisia.

ALOA-maljalla *L. monocytogenes* –lajia ei voida erottaa *L. ivanovii* –lajista, koska pesäkemorfologia on samanlainen.

Jotkut stressaantuneet (erityisesti hapon vuoksi stressaantuneet) *L. monocytogenes* –kannat voivat muodostaa ALOA-alustalla hyvin kapeakehäisiä tai kehättömiä pesäkkeitä.

Joillakin harvoilla *L. monocytogenes* –kannoilla on kuvattu hidas fosfatidyyli-inositoli fosfataasi C (PIPLC) –aktiivisuus. Tällaiset kannat voidaan todeta, mikäli ALOA-maljoja inkuboidaan enemmän kuin esim. 4 vrk. Jotkut tällaisista kannoista voisivat olla patogeenisiä. Yhtään PIPLC-negatiivista *L. monocytogenes* –kanta ei ole kuvattu.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

L. monocytogenes on patogeeninen bakteeri ja voi aiheuttaa vakavan sairauden. Mm. raskaana olevat sekä henkilöt, joiden immuunivaste on heikentynyt, ovat erityisen herkkiä.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher-400 pusseja tai tasoravistelijä
- 3) 30 ± 1 °C lämpökaappi
- 4) 37 ± 1 °C lämpökaappi

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) 1/2-Fraser -liemi, à 225 ml
 - 2) Fraser-liemi, à 10 ml
 - 3) ALOA-maljat
 - 4) LMBA-maljat (*Listeria monocytogenes* –veriagar magnesiumsulfaatti- ja nalidiksiinihappolisällä)
 - 5) Naudanveriagar
-

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Listeria monocytogenes –bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen

- 6) Ramnoosiliemiputket
- 7) Ksyloosiliemiputket
- 8) Katalaasireagenssi, 3 % vetyperoksidi
- 9) Gramvärjäysliuokset
- 10) API Listeria

9 Kontrollikannat

- 1) *L. monocytogenes* L 3326.
- 2) *L. innocua* EELA133, tarvittaessa

10 Näytteen esikäsittely

Suorita mahdollinen esikäsittely toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11 Suoritus

Näyte saatetaan tutkia ensin kvalitatiivisella eli osoitusmenetelmällä, josta saadun alustavan positiivisen tuloksen (tyypillistä kasvua selektiiviagarilla) jälkeen aloitetaan kvantitatiivinen tutkimus *L. monocytogenes* –lukumäärän määrittämiseksi, mutta näyte voidaan tutkia samanaikaisesti myös molemmilla menetelmillä.

11.1 Näytteen koostaminen

Näyte koostetaan samanaikaisesti sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista tutkimusta varten esim. pilkkomalla saksien ja lusikan tai pinsettien avulla 50-150 g näytettä Stomacher-pussiin. Näytekohtaisesti saatetaan ottaa mukaan joko vain pintaosaa (esim. juusto) tai sekä pinta- että sisäosaa (esim. siivutetut leikkeleet) edustavasti eri puolilta näytettä. Näyte homogenoidaan varovasti ja siitä punnitaan erikseen 25 g toiseen Stomacher-pussiin kvalitatiivista tutkimusta varten. Loppuosa pilkotusta näytemassasta säilytetään tiiviisti pakattuna jääkaapissa, jonka lämpötila on enintään 4°C, mieluiten 1-2°C. Kvantitatiivinen tutkimus aloitetaan välittömästi, kun on saatu alustava positiivinen tulos kvalitatiivisellä menetelmällä. Kvantitatiivinen tutkimus voidaan tarvittaessa/sovittaessa aloittaa myös samanaikaisesti kvalitatiivisen tutkimuksen kanssa. Näin on tehtävä esim. siinä tapauksessa, että kvantitatiivista tutkimusta ei muutoin pystyisi aloittamaan ennen tuotteen viimeistä käyttöpäivää (VKP) tai parasta ennen päiväystä.

11.2 Esirikastus

Näytteet esirikastetaan ½-Fraser –liemessä, joka lämmitetään inkubointilämpötilaan (30 ± 1 °C) ennen siirrostusta. Näytteen suhde esirikastusliemen tilavuuteen on 1:10 eli 1 osa näytettä + 9 osaa esirikastuslientä. Esirikastusliemi inkuboidaan 30 ± 1 °C/24 ± 2 h. Liemi saattaa mustua inkuboinnin aikana. Inkubointiajaksi suositellaan vähintään 24 h erityisesti silloin, kun kyseessä ovat stressaantuneet solut tai epäillään vähäistä saastumista.

Esirikasteesta siirrostetaan rikastusliemeen kohdan 11.3 mukaisesti ja viljellään maljoille kohdan 11.4 mukaisesti.

Esirikaste voidaan siirtää inkuboinnin jälkeen jääkaappiin (2-8 °C) enintään 72 tunniksi, mikäli rikastusta ei voida välittömästi jatkaa. Tällöin esirikaste siirretään noin tunniksi 30 ± 1 °C lämpötilaan ennen rikastusliemeen siirrostamista.

11.2.1 Elintarvike- ja rehunäytteet

Punnitse/mittaa aseptisesti Stomacher-pussiin 25 g/ml näytettä. Lisää 225 ml 1/2-Fraser-lientä. Homogenoi Stomacherissa 30 sekuntia (Toimintaohje LAB 728). Rehumatriisilla käsittelytapa valitaan näytetyypin mukaan.

11.2.2 Ympäristönäytteet

Esirikasta superlonpaloihin otetut näytteet 225 ml:ssa ½-Fraser -lientä ja vanupuikkoihin otetut näytteet 1-5 puikkoa 10-20 ml:ssa ½-Fraser -lientä. Kaada liemi superlonpalan päälle tai siirrä superlonpala aseptisesti liemipussiin. Siirrä vanupuikko/-puikot aseptisesti rikastusliemeen. Tarkasta, että liemi peittää puikkojen pumpuliosan. Puristele / ravistele kevyesti, jotta näytemateriaali irtoaisi liemeen.

Jos näyte on otettu vanupuikoilla, jotka ovat 25 ml:ssa nestettä, kaada neste puikkoineen Stomacher-pussiin. Huuhtele näyteastia osalla ½-Fraser -lientä (225 ml) ja kaada se näytepussiin samoin kuin jäljellä oleva ½-Fraser -liemi.

11.3 Rikastus

Mikäli esirikaste on siirretty vapaapäivien vuoksi jääkaappiin, siirrä se noin tunniksi 30 ± 1 °C lämpötilaan ennen Fraser-liemeen siirrostamista.

Siirrä 0,1 ml hyvin sekoitetusta ½-Fraser -esirikasteesta 10 ml:aan Fraser-lientä. Inkuboi 37 ± 1 °C/24 ± 2 h. Mikäli halutaan eristää muitakin listerialajeja kuin *L. monocytogenes*, inkubointiajan jatkaminen 24 h:lla saattaa tehdä mahdolliseksi näiden osoittamisen.

Fraser –rikaste voidaan siirtää inkuboinnin jälkeen jääkaappiin (2-8 °C) enintään 72 tunniksi, mikäli majausta ei voida tehdä välittömästi inkubointiajan päätyttyä.

11.4 Viljely maljoille

Mikäli ½-Fraser -esirikaste on siirretty vapaapäivien vuoksi jääkaappiin, siirrä se noin tunniksi 37 ± 1 °C lämpötilaan ennen maljoille siirrostamista.

Viljele hyvin sekoitetusta **esirikasteesta (1/2-Fraser)** 10 µl silmukalla hajoitusviljelyt (toimintaohje LAB 728) selektiivisille ALOA- ja LMBA-maljoille. Inkuboi 37 ± 1 °C/ (24 ± 2 h) - 48 ± 2 h.

Viljele hyvin sekoitetusta rikasteesta (**Fraser**) 10 µl silmukalla hajoitusviljelyt selektiivisille ALOA- ja LMBA-maljoille.
Inkuboi 37 ± 1 °C/ (24 ± 2 h) - 48 ± 2 h.

Inkuboidut maljat voidaan siirtää ennen lukemista jääkappiin enintään 48 h:ksi.

11.5 Maljojen lukeminen

Lue maljat 24 ± 2 h ja / tai vasta 48 ± 4 h inkuboinnin jälkeen.

11.5.1 ALOA

ALOA:lla *Listeria monocytogenes*- ja *L. ivanovii* –lajit kasvavat 48 h inkuboinnin jälkeen suurehkoina sinivihreinä pesäkkeinä, joita ympäröi vaalea kehä (samentumavyöhyke), joka 24 h inkuboinnin jälkeen on yleensä heikko tai puuttuu. Pesäkkeiden halkaisija on n. 3 mm. Muilta listerialajeilta kehä (samentumavyöhyke) puuttuu.

11.5.2 LMBA

LMBA:lla *L. monocytogenes* kasvaa pieninä, vaaleina pesäkkeinä, joita ympäröi kapea, kirkas β-hemolyysivyöhyke, joka voi olla rajoittunut pesäkkeen alle. Pesäkkeet voivat olla tunnistettavissa jo 24 h:n inkuboinnin jälkeen, mutta pesäke koko ja hemolyysivyöhyke kasvavat inkuboitessa toiset 24 h. *L. ivanovii* –pesäkkeitä ympäröi leveä hemolyysivyöhyke.

12 Varmistuskokeet

Käytä varmistuskokeissa positiivisena kontrollina *L. monocytogenes* L 3326 -kantaa. Ramnoosi- ja ksyloosiliemet ovat vaihtoehtoisia API Listeria -tunnistustestisarjalle.

12.1 Puhdasviljelmät ja β –hemolyysin toteaminen

Tee selektiivisiltä agareilta yhteensä viidestä (mikäli mahdollista) *L. monocytogenes* -bakteeriksi epäilystä pesäkkeestä puhdasviljelmä naudanveriagarille β –hemolyysin toteamiseksi. Inkuboi 37 ± 1 °C/24 -28 h.

Tee vähintään yhdestä veriagarilla tyypillisinä β-hemolyyttisinä pesäkkeinä kasvavasta puhdasviljelmästä tai *L. monocytogenes* –bakteeriksi epäilystä puhdasviljelmästä varmistuskokeet kohtien 12.2-12.5 mukaisesti. Jos teit jatkovarmistukset vain yhdestä puhdasviljelmästä, eikä se osoittaudu *L. monocytogenes* –bakteeriksi, varmista (yksitellen) myös loput neljä puhdasviljelmää, kunnes toteat *L. monocytogenes* –bakteerin.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Listeria monocytogenes –bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen

12.2 Katalaasikoe

Tee **tarvittaessa** katalaasikoe työohjeen LAB 2054 mukaisesti.
L. monocytogenes on katalaasipositiivinen.

12.3 Gramvärjäys

Tee **tarvittaessa** gramvärjäys työohjeen LAB 2053 mukaisesti.
L. monocytogenes on grampositiivinen, ohut, lyhyt sauva. Jotkut solut voivat olla taipuneita. Solut ovat järjestäytyneet yksittäisiksi, lyhyiksi ketjuiksi tai U- tai V-muodostelmiksi tai ryhmiksi.

12.4 Ramnoosi ja ksyloosi

Siirrosta muutama pesäke puhdasviljelmästä ramnoosi- ja ksyloosiliemiputkien pohjalle. Negatiivisena kontrollina on viljelemätön putki. Inkuboi 37 ± 1 °C /1 - 5 vrk.

Hapon muodostus eli positiivinen reaktio havaitaan keltaisena värinä usein jo 24 - 48 h inkuboinnin jälkeen. Jatka kuitenkin tarvittaessa inkubointia 5 vrk:een asti.

L. monocytogenes on yleensä (>90%) ramnoosipositiivinen ja ksyloosinegatiivinen. *L. monocytogenes* L3326 on ramnoosipositiivinen ja ksyloosinegatiivinen. Negatiivisten kontrollien värin tulisi olla muuttumaton eli vihreä.

12.5 API Listeria

API Listeria –tunnistustestisarjaa voidaan käyttää **vaihtoehtoisena** varmistuskokeena ramnoosi- ja ksyloosiliemien sijasta tai tarvittaessa lisävarmistukseen. Tee API Listeria valmistajan ohjeiden mukaisesti. Mikäli DIM-reaktion tulkinnessa on epävarmuutta, käytä kontrollikantana *L. monocytogenes* L 3326 -kannan lisäksi *L. innocua* EELA 133 -kantaa. Mikäli kahden positiivisen (keltainen väri) taskun välissä olevan taskun väri on oranssi, luetaan reaktio negatiiviseksi.

13 Tulokset

Tulos ilmoitetaan:

- Listeria monocytogenes* todettu / 25 g tai 25 ml näytettä tai tutkittu näytemäärä
- Listeria monocytogenes* ei todettu / 25 g tai 25 ml näytettä tai tutkittu näytemäärä

14 Menetelmän validointi

Evira 3463/3 on yhdenmukainen menetelmän NMKL 136 (4 painos, 2007) kanssa, joka on validoitu kollaboratiivisella tutkimuksella (Loncarevic, S. and Johansson, T. 2006). Validointitulokset on esitetty menetelmäohjeen liitteessä 1.

EELAn Bakteriologian tutkimusyksikön elintarvikemikrobiologian ryhmä (ELMI) osallistui tutkimukseen. Tutkittavana oli 16 positiivista elintarvike- ja rehunäytettä. Näistä ELMI totesi positiiviseksi ½-Fraser –rikastuksen jälkeen 15 kaikilla käytetyillä *L. monocytogenes* –spesifisillä alustoilla (ALOA valmiina maljoina ja kuivaelatusaineesta valmistettuna, OCLA ja LMBA). Kaikki vertailussa oleet alustat antoivat virhenegatiivisen tuloksen samasta näytteestä (kinkku, pieni pitoisuus). Fraser-rikastuksen jälkeen ELMI totesi positiiviseksi kaikilla alustoilla, kaikki 16 näytettä. Negatiiviset näytteet (N=8) todettiin negatiiviseksi.

15 Menetelmän status

Standardimenetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Virallinen menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Referenssimenetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Sisäinen menetelmä	<input type="checkbox"/>

16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Vertailukantojen / kontrollikantojen käyttö putkivarmistuskokeissa	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>

17 Viitteet

*)NMKL No. 136:2010, 5th ed. *Listeria monocytogenes*. Detection in foods and feeding stuffs and enumeration in foods.

*)ISO/DIS 11290-1:2014. Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. - Part 1: Detection method.

Loncarevic S. & Johansson T. 2006. Collaborative study of NMKL method No 136, 4th ed. 2004: *Listeria monocytogenes*. Detection and enumeration in foods. Final test report. November 2006. National Veterinary Institute, Oslo, Norway. 21 pp.

*) Alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä

18 Muutokset edelliseen versioon

11.6.2015. Muutettu rehujen menetelmä yhteneväksi elintarvikematriisiin kanssa eli Palcam-agar korvattu ALOA-agarilla. Poistettu laadunvarmistuksista menetelmävertailut, muita vähäisiä muokkauksia.

Tämän ohjeen laadinta: Tuula Johansson ja Satu Hakola

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

***Listeria monocytogenes* –bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen**
LIITE 1

 NMKL Method No 136, 4th ed., 2007, ANNEX 1, page 1 (2)

 Table 1. The sensitivities and specificities of ALOA, LCA, OCLA and LMBA to detect of *Listeria monocytogenes* from cheese, salmon and ham samples after enrichment according to the draft NMKL No. 136 4th ed. 2004.

	Half-Fraser enrichment				Half-Fraser + Fraser enrichment			
	ALOA	LCA	OCLA	LMBA	ALOA	LCA	OCLA	LMBA
Number of laboratories	18	18	18	16	18	18	18	16
Number of each sample matrix per level and per laboratory	2	2	2	2	2	2	2	2
Total number of results per level*	36	36	36	32	36	36	36	32
CHEESE – Sensitivity (%)								
low level **	97.2	94.4	94.4	93.8	97.2	94.4	97.2	100
high level ***	97.2	97.2	97.2	96.9	100	100	97.2	100
Specificity (%)								
blank****	97.2	97.2	97.2	100	94.4	97.2	97.2	96.9
SALMON – Sensitivity (%)								
low level	94.4	94.4	97.2	100	97.2	94.4	100	100
high level	97.2	100	100	100	97.2	100	100	100
Specificity (%)								
blank	100	100	97.2	100	100	100	97.2	100
HAM – Sensitivity (%)								
low level	83.3	80.5	83.3	87.5	97.2	97.2	97.2	100
high level	100	100	100	100	100	100	100	100
Specificity (%)								
blank	100	100	100	100	100	100	100	100
WHEAT GRAIN–Sensitivity (%)								
low level	83.3	75.0	83.3	78.1	88.9	83.3	88.9	84.4
high level	94.4	94,4	91.7	93.8	97.2	97.2	91.7	100
Specificity (%)								
blank	100	100	100	100	100	100	100	100

ALOA, Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ready-to-use agar in bottles with supplements)

LCA, a medium with equal composition as ALOA, i.e. *Listeria* Chromogenic Agar (dehydrated powder with supplements)

OCLA, Chromogenic *Listeria* Agar, medium basically alike ALOA Plate (ready-to-use plates)

LMBA, *Listeria monocytogenes* blood agar medium (dehydrated powder with supplements)

* no excluded results

** *L. monocytogenes* 12-25 cfu/25 g with or without *Listeria innocua* 30-80 cfu/25 g

*** *L. monocytogenes* 3000-6250 cfu/25 g with or without *L. innocua* 7500-20 000 cfu/25 g

**** *Listeria innocua* 30-80 cfu/25 g or 7500-20 000 cfu/25 g