

Listeria monocytogenes –bakteerin määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

NMKL 136:2010
ISO/DIS 11290-2:2014

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

Poikkeamat ISO/DIS -menetelmästä:

- 1) ALOA-alustan sijasta voidaan sovittaessa käyttää LMBA-alustaa, mikäli ei edellytetä ALOA-alustan käyttöä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *Listeria monocytogenes* -bakteerin lukumäärän määrittämiseen elintarvikkeista (kvantitatiivinen eli ns. suoraviljelymenetelmä).

3 Määritelmä(t)

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

4 Periaate

Lukumäärän määrittämiseen käytetään ensisijaisesti *L. monocytogenes* –spesifistä ALOA-alustaa. Sovittaessa voidaan käyttää LMBA-alustaa, mikäli ei edellytetä ALOA-alustan käyttöä. Alustalle viljellään alkususpensio ja laimennokset. Mikäli ei viljellä peräkkäisiä laimennoksia, viljellään rinnakkaismaljat. Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan morfologisten ja biokemiallisten ominaisuuksien perusteella. Serotyypitys tehdään menetelmäohjeen Evira 3498 mukaisesti.

5 Mahdolliset virhelähteet

Lukumäärän määrittäminen homejuustoista ja muista pastöroimattomasta maidosta valmistetuista pehmeistä juustoista saattaa olla vaikeaa runsaan häiritsevän bakteeriston vuoksi. Mm. *Bacillus* –suvun bakteerit voivat häiritä määrittämistä.

Listeria monocytogenes –bakteerin määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

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

Erityisesti hapon vaikutuksesta stressaantunut *L. monocytogenes* kasvaa ALOA-alustalla turkooseina pesäkkeinä, joita ympäröi hyvin heikko vaalea kehä (samentumavyöhyke) tai kehä puuttuu kokonaan.

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

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.

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 tasoravistelija
- 3) Lämpökaappi 37 ± 1 °C

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Peptonisuolaliuos (PEPSU: peptoni 0,1 %, suola 0,85%) á 90 ml
- 2) ALOA –maljat
- 3) LMBA-maljat (*Listeria monocytogenes* –veriagar magnesiumsulfaatti- ja nalidiksiinihappolisällä) vaihtoehtoisesti, sovittaessa
- 4) Lampaanveriagar
- 5) Ramnoosiliemiputket
- 6) Ksyloosiliemiputket
- 7) Katalaasireagenssi, 3 % vetyperoksidi
- 8) Gramvärjäysliuokset
- 9) API *Listeria*

9 Kontrollikannat

- 1) *L. monocytogenes* L 3326
- 2) *L. innocua* EELA 133, tarvittaessa

10 Näytteen esikäsittely

Suorita mahdollinen esikäsittely toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11 Suoritus

Yleensä näyte tutkitaan ensin kvalitatiivisella (rikastus) eli osoitusmenetelmällä ja jos se antaa alustavan positiivisen tuloksen (tyypillistä kasvua selektiivisellä agarilla), aloitetaan välittömästi kvantitatiivinen tutkimus. Näyte voidaan tutkia myös samanaikaisesti sekä kvalitatiivisella että kvantitatiivisella menetelmällä tai vain kvantitatiivisella menetelmällä.

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 Alkuspension ja laimennoksien valmistaminen

Kiinteä näyte

Valmista alkuspensio punnitsemalla 10 g näytettä 90 ml:aan PEPSUa. Homogenoi alkuspensio Stomacherissa ½ -1 min (Toimintaohje LAB 728).

Alkuspensio voidaan valmistaa myös ½-Fraser –liemen pohjaliemeen tai käyttää valmista ½-Fraser-lientä tai ½-Fraser –lientä, joka sisältää vain osan selektiivisistä lisäaineista. Näin kannattaa menetellä silloin, kun sekä osoittaminen että määrittäminen tehdään yhtäaikaista.

Nestemäinen näyte

Tutki näyte laimentamattomana ja tee lisäksi 10-kertainen laimennos pipetoimalla 10 ml näytettä 90 ml:aan PEPSU:a. Mikäli pitoisuuden oletetaan olevan hyvin pieni, ei 10-kertaista laimennosta tarvitse tehdä edellyttäen, että viljellään rinnakkaismaljat.

Jos näytteen *L. monocytogenes* –pitoisuuden epäillään oleva suuri, tehdään lisälaimennoksia. Yleensä ei kuitenkaan tarvitse laimentaa pidemmälle.

11.3 Viljely agarmaljoille

Kiinteä näyte

Viljele homogenoidusta alkususpensiosta pintaviljelynä yhteensä 1 ml kolmelle normaalikokoiselle ALOA–maljalle (LMBA sovittaessa) siten, että jokaiselle pipetoidaan n. 0,3 ml suspensiosta. Näin on tehtävä, koska yhteen normaalikokoiseen maljaan ei imeydy 1 ml suspensiota. Täten saadaan määritysrajaksi <10 pmy/g. Viljele rinnakkaismaljat.

Viljele lisäksi 0,1 ml alkususpensiota yhdelle ALOA-maljalle, jolloin voidaan vielä määrittää pitoisuus n. 10 000 pmy/g (maljalla kasvaa n. 100 pmy).

Nestemäinen näyte

Viljele hyvin sekoitetusta näytteestä pintaviljelynä yhteensä 1 ml kolmelle normaalikokoiselle ALOA–maljalle (LMBA sovittaessa) siten, että jokaiselle pipetoidaan n. 0,3 ml suspensiosta. Näin on tehtävä, koska yhteen normaalikokoiseen maljaan ei imeydy 1 ml suspensiota. Viljele rinnakkaismaljat.

Viljele lisäksi 0,1 ml näytettä sekä laimennosta. 10⁻¹ ALOA-maljoille, jolloin voidaan määrittää vielä pitoisuus n. 10 000 pmy/g (maljalla kasvaa n. 100 pmy). Rinnakkaismaljoja ei viljellä, koska viljellään peräkkäiset laimennokset.

Inkuboi 37 ± 1 °C.

11.4 Maljojen lukeminen

Lue maljat alustavasti 24 ± 2 h tai vasta 48 ± 4 h inkuboinnin jälkeen, jolloin saadaan lopullinen tulos.

Mikäli alkususpensiota viljeltäessä on käytetty kolmea maljaa, niillä olevat pesäkkeet lasketaan yhteen ja kultakin maljalta varmistetaan tyypillisiä/epäilyttäviä pesäkkeitä.

11.4.1 ALOA

ALOA:a on yleensä inkuboitava vähintään 36 h, mieluiten 48 ± 4 h. ALOA:lla *L. 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 samentumavyöhyke puuttuu.

Laske tyypillisten pesäkkeiden lukumäärä maljoilta, joilla on yhteensä <100 tai <150 tyypillistä tai epätyypillistä pesäkettä.

11.4.2 LMBA

LMBA:lla *L. monocytogenes* kasvaa pieninä, vaaleina pesäkkeinä, joita ympäröi kapea, kirkas β -hemolyysivyöhyke, joka voi olla rajoittunut pesäkkeen alle. Pesäkkeet ovat tunnistettavissa jo 24 h:n inkuboinnin jälkeen, mutta pesäkekoko ja hemolyysivyöhyke kasvavat inkuboitessa toiset 24 h. *L. ivanovii* –pesäkkeitä ympäröi leveä hemolyysivyöhyke. Laske tyypillisten pesäkkeiden lukumäärä maljoilta, joilla on yhteensä <150 tyypillistä tai epätyypillistä pesäkettä.

12 Varmistuskokeet

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

12.1 Puhdasviljelmät ja β –hemolyysin toteaminen

Viljele puhtasviljelmät β –hemolyysin toteamiseksi lampaanveriagarille viidestä (mikäli mahdollista) *L. monocytogenes* -bakteeriksi epäillyistä pesäkkeestä/laskettavissa oleva malja/laimennos. Inkuboi $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/18\text{-}24$ h tai kunnes kasvu on riittävä.

Tee viidestä β -hemolyyttisinä pesäkkeinä (hemolyysi kapea tai voi rajoittua pesäkkeen alle) kasvavasta puhtasviljelmästä varmistuskokeet kohtien 12.2-12.5 mukaisesti. Katalaasikoe ja Gram-värijäys tehdään siinä tapauksessa, että tunnistustulos ei ole yksiselitteinen.

Jotkut harvat *L. monocytogenes* –kannat eivät muodosta β -hemolyysivyöhykettä tai anna positiivista CAMP-reaktiota. Tällöin suositellaan tekemään lisäkokeita (Gram-värijäys, katalaasi, PCR...), jotta voidaan varmistaa, onko kyseessä non-hemolyyttinen *L. monocytogenes*.

12.2 Katalaasikoe

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

Veriagarilta poimitusta pesäkkeestä tehty katalaasikoe saattaa joskus antaa virhepositiivisia tuloksia.

12.3 Gramvärijäys

Tee **tarvittaessa** gramvärijäys 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 puhtasviljelmästä ramnoosi- ja ksyloosiliemiputkien pohjalle. Viljele rinnalla positiivinen kontrolli *L. monocytogenes* L 3326 -bakteerikanta. 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* L 3326 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. Suorita API Listeria -koe valmistajan ohjeiden mukaisesti. Käytä positiivisena kontrollina *L. monocytogenes* L 3326 bakteerikantaa. Mikäli DIM-reaktion tulkinnessa on epävarmuutta, käytä kontrollikantana *L. monocytogenes* -kannan lisäksi *L. innocua* –kantaa EELA 133. Mikäli kahden positiivisen (keltainen väri) taskun välissä olevan taskun väri on oranssi, luetaan reaktio negatiiviseksi.

13 Tulokset

13.1 Tulosten laskeminen

Laske tulokset toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

13.2 Tulosten ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan *L. monocytogenes* -bakteerin määränä pmy/g tai ml näytettä toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

14 Menetelmän validointi

'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' on validoitu laboratoriodien välisellä tutkimuksella. Tutkimuksen tulokset on esitetty standardin liitteessä E.

14.1 Täsmällisyys

Evira 3477/5 on yhdenmukainen menetelmän NMKL 136 (4 painos, 2007) kanssa, joka on validoitu kollaboratiivisella tutkimuksella (Loncarevic, S. and Johansson, T. 2006). Menetelmän täsmällisyyttä kuvaavat tunnusluvut on esitetty validointiraportin liitteessä 1.

Listeria monocytogenes –bakteerin määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

EELAn Bakteriologian tutkimusyksikön elintarvikemikrobiologian ryhmä (ELMI) osallistui kollaboratiiviseen tutkimukseen. Tulokset eivät eronneet tilastollisesti merkittävästi ($p > 0,05$) muiden laboratorioiden tuloksista (t-testi) lukuun ottamatta kahta tulosta (juustonäyte/*L. monocytogenes*/suuri pitoisuus/LMBA; lämminsavulohi/*L. monocytogenes*/suuri pitoisuus/OCLA).

ALOA ja LMBA –alustoja verrattiin tilastollisesti (t-testi). Vertailuun käytettiin luonnollisesti kontaminoituneita ja siirrostettuja, sellaisenaan syötäviä elintarvikkeita. ALOA ja LMBA –alustojen antamat pesäkelukumäärät eivät eronneet tilastollisesti (t-testi) merkittävästi ($p > 0,05$) (Validointiraportti, liite 2).

14.2 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden määrittämiseksi on alettu kerätä aineistoa vuonna 2006 ja määrittämiseen on käytetty Niemelän menetelmää (Niemelä, S. 2003). Keväällä 2009 on otettu käyttöön lisäksi ISO/TS 19036:2006.

Niemelän mukaisen mittausepävarmuuden pesäkelaskennan epävarmuus perustuu toistaiseksi siirrostetuista näytteistä - porkkanaraaste, mozzarellaajuusto ja kylmäsavulohi – viljeltyihin maljoihin (n=10 / matriisi), sekä AFSSAn vertailututkimukseen lähettämistä kylmäsavulohinäytteistä (n=7) viljeltyihin maljoihin (n=50).

ISO-menetelmän mukainen mittausepävarmuus perustuu toistaiseksi pieneen aineistoon: yhteisön listeriavertailulaboratorion vertailututkimukseen lähettämät 7 kylmäsavukirjolohinäytettä (2010) ja 6 vauvanmaitojauhetta (2011). Vuoden 2010 tuloksista on laskettu mittausepävarmuus ALOA-alustalle ja vuoden 2011 tuloksista sekä ALOA- että LMBA-alustalle.

Mittausepävarmuus	ALOA	LMBA
Niemelä (%)	7,0	6,7
ISO 19036 (\log_{10} pmy/g)	0,2	0,2

Vertailulaboratorion (Cornu, M. and Lombard, B. 2009) antama ohjearvo homogeeniselle matriisille, analyysin perustuessa pesäkkeiden varmistukseen, on 0,7-0,5 \log_{10} pmy/g pesäkemäärien ollessa $\leq 5 - 15$ pmy/g ja 0,5 \log_{10} pmy/g pesäkemäärien ollessa $> 15-150$ pmy/g.

15 Menetelmän status

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

16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input checked="" type="checkbox"/>
Vertailukantojen/kontrollikantojen käyttö	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismäärittäykset	<input type="checkbox"/>
Valvontakortit	<input checked="" type="checkbox"/>

17 Viitteet

*)NMKL No. 136:2007, 4th ed. *Listeria monocytogenes*. Detection in foods and feeding stuffs and enumeration in foods.
Corrections to No. 136:2007, 4 ed. 2007. March 2008.

*)ISO/DIS 11290-2:2014. Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 2: Enumeration method.

*) Johansson, T. 2009. Menetelmän 'Evira 3477 *Listeria monocytogenes* –bakteerin määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka' validointiraportti. Evira, Sisäinen raportti.

Cornu, M. and Lombard, B. 2009. Guide on measurement uncertainty for the enumeration of *Listeria monocytogenes*. Version 1 – 26 March 2009. AFSSA, EU community reference laboratory for *Listeria monocytogenes*.

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.

Loncarevic, S., Økland, M., Sehic, E., Norli, H. S., Johansson, T. 2008. Validation of NMKL method No. 136 – *Listeria monocytogenes*, detection and enumeration in foods and feed. Int. J. Food Microbiol. 31;124 (2),154-63.

Niemelä S.I. 2003. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of micro-organisms. MIKES, Publication J4/2003.

*) Alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä

18 Muutokset edelliseen versioon

5.8.2015

- Vaihdettu naudanveriagar lampaanveriagariin, koska naudanveriagarin käyttö lopetetetaan.
- Tarkennettu puhdasviljelmien lukumäärää.
Tämän ohjeen laadinta: Tuula Johansson