

Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes*

1 Metodreferenser och avvikelser

NMKL 136:2010
ISO/DIS11290-1:2014

(1/2 Fraser 30 °C / 24+2 h, ALOA och LMBA 37 °C / 24-48 h; Fraser 37 °C / 24 ± 2 h, ALOA och LMBA 37 °C / 24+48 h, nötblodagar 37 °C / 24 h, β-hemolys; ramnos- och xylosbuljong 37 °C / 1-5 dygn / API Listeria; valbart katalastest, gramfärgning, rörlighets- och CAMP-test.)

Inga avvikelser från referensmetoden.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metoden är lämpad för detektion av bakterien *Listeria monocytogenes* i livsmedel och foder (den kvalitativa, det vill säga anrikningsmetoden). Den används också vid analys av miljöprover.

3 Definition(er)

Listeria monocytogenes är en kort, tunn, grampositiv stavbakterie, som är katalaspositiv, oxidasnegativ, rörlig, hydrolyserar eskulin och bildar en smal β-hemolytisk zon på blodagar. *L. monocytogenes* bildar syra av ramnos men inte av xylos.

4 Princip

Provet homogeniseras och anrikas i två moment.

Till isoleringen används två *L. monocytogenes*-selektiva agarplattor, ALOA och LMBA som är baserade på olika funktionsprinciper, och odlas med preanrikning och anrikning. Isolerade stammar identifieras på basis av morfologiska och biokemiska egenskaper. Om *L. monocytogenes* påvisas i ½-Fraser-buljong behöver analysen i Fraser-buljong inte fortsätta. Serotypning utförs i enlighet med metodbeskrivning Evira 3498.

5 Möjliga felkällor

Mögelostar och andra mjuka ostar som har framställts av opastöriserad mjölk är svåra matriser. Bland annat bakterier av släktet *Bacillus* kan störa detektionen.

Vissa stammar av *L. Monocytogenes* (som t.ex. är stressade av syra) bildar kolonier på LMBA substrat, där hemolysen begränsas till under kolonin. Man har också påvisat stammar av *L. Monocytogenes* som inte är β -hemolytiska, men de är sannolikt mycket sällsynta.

På en ALOA platta kan arten *L. monocytogenes* inte särskiljas från arten *L. ivanovii*, eftersom kolonimorfologin är likadan.

Vissa stressade (i synnerhet stressade av syra) stammar av *L. monocytogenes* kan bilda kolonier på ALOA substrat med mycket knappa zoner eller kolonier som helt saknar zon.

För några få stammar av *L. monocytogenes* har beskrivits en långsam fosfatidylinositol fosfatas C (PIPLC) aktivitet. Sådana stammar kan detekteras om ALOA plattor inkuberas längre än i t.ex. 4 dygn. Vissa av de här stammarna skulle kunna vara patogena. Inga PIPLC-negativa *L. monocytogenes*-stammar har beskrivits.

6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iaktas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

L. monocytogenes är en patogen bakterie och kan orsaka allvarlig sjukdom. Bland annat gravida och personer med sänkt immunförsvar är speciellt mottagliga.

7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Stomacher homogenisator och sterila Stomacher-400 påsar eller skakapparat
- 3) Värmeåp 30 \pm 1 °C
- 4) Värmeåp 37 \pm 1 °C

8 Substrat och reagenser

- 1) ½ Fraser-buljong, à 225 ml
- 2) Fraser-buljong, à 10 ml
- 3) ALOA plattor
- 4) LMBA plattor (*Listeria monocytogenes* blodagar med magnesiumsulfat- och nalidixinsyratillskott)
- 5) Nötblodagar
- 6) Ramnos buljongrör
- 7) Xylos buljongrör
- 8) Katalas reagens, 3 % väteperoxid
- 9) Gramfärgningslösningar
- 10) API *Listeria*

9 Kontrollstammar

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

10 Förbehandling av provet

Utför en eventuell förbehandling i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 728.

11 Utförande

Provet kan först analyseras enligt den kvalitativa metoden, dvs. påvisningsmetoden och om den ger ett preliminärt positivt resultat (typisk tillväxt på selektiv agar), påbörjas den kvantitativa analysen för bestämning av antalet *L. monocytogenes*, men provet kan undersökas samtidigt också med båda metoderna.

11.1 Sammansättning av provet

Provet sätts samman samtidigt för både den kvalitativa och den kvantitativa analysen, t.ex. genom att med hjälp av en sax och sked eller pincett finfördela 50-150 g prov i en Stomacherpåse. För provet kan endast yta medtas (t.ex. ost) eller både yta och inre del (t.ex. skivat kallskuret) så att olika delar av provet finns med. Provet homogeniseras försiktigt och 25 g vägs upp skilt i en annan Stomacherpåse för den kvalitativa analysen. Den sista delen av den finfördelade provmassan förvaras tätt förpackad i kylskåp, vars temperatur är högst 4°C, men helst 1-2°C. Den kvantitativa analysen påbörjas så snart som man har fått ett preliminärt positivt svar med den kvalitativa metoden. Den kvantitativa analysen kan vid behov/enligt överenskommelse också påbörjas samtidigt med den kvalitativa analysen. Det måste göras i exempelvis sådana fall då en kvantitativ analys inte annars skulle kunna påbörjas förrän produktens sista användningsdatum eller bäst-före-datum.

11.2 Preanrikning

Preanrikning av proverna görs i ½-Fraser-buljong som värms upp till inkuberingstemperatur (30 ± 1 °C) före ympningen. Förhållandet mellan provmängden och preanrikningsbuljongens volym är 1:10, dvs. 1 del prov + 9 delar preanrikningsbuljong. Inkubera preanrikningsbuljongen vid 30 ± 1°C/24 ± 2 h. Buljongen kan svartna under inkuberingen. Minst 24 h inkuberingstid rekommenderas, i synnerhet då det gäller stressade celler eller man misstänker smärre kontaminering.

Preanrikning ympas i anrikningsbuljongen enligt punkt 11.3 och odlas på plattor enligt punkt 11.4.

Efter inkuberingen kan preanrikningen sättas i kylskåp (2-8 °C) för högst 72 timmar, om det inte är möjligt att fortsätta med anrikningen omedelbart. Då sätts preanrikningen i 30 ± 1 °C temperatur cirka en timme före ympningen i anrikningsbuljong.

11.2.1 Livsmedels- och foderprover

Väg/mät aseptiskt 25g/ml prov i en Stomacherpåse. Tillsätt 225 ml ½-Fraser-buljong. Homogenisera i Stomacher i 30 sekunder (Verksamhetsbeskrivning LAB 728). För fodermatrisen väljs behandlingssättet enligt provtyp.

11.2.2 Miljöprover

Preanrika prover som tagits på superlonbitar i 225 ml ½-Fraser-buljong och prover som tagits på vaddpinnar 1-5 pinnar i 10-20 ml ½-Fraser-buljong. Håll buljong på superlonbiten eller sätt superlonbiten aseptiskt i buljongpåsen. Sätt vaddpinnen/vaddpinnarna aseptiskt i anrikningsbuljongen. Kontrollera att buljongen täcker bomullen på vaddpinnarna. Tryck/skaka om lätt så att provmaterialet lösgör sig i buljongen.

Om provet har tagits med vaddpinnar som är i 25 ml vätska, ska både vätskan och pinnarna hållas i en Stomacherpåse. Skölj provskålen med en del av ½-Fraser-buljongen (225 ml) och håll det i provpåsen, och likaså den återstående ½-Fraser-buljongen.

11.3 Anrikning

Om preanrikningen har satts i kylskåp på grund av lediga dagar, ska den förvaras i cirka en timme i 30 ± 1 °C temperatur innan den ympas i ½-Fraser-buljong.

Ympa 0,1 ml väl blandad ½-Fraser preanrikning i 10 ml Fraser-buljong. Inkubera vid 37 ± 1 °C/24 ± 2 h. Om man önskar isolera även andra listeriaarter än *L. monocytogenes* kan det vara möjligt att påvisa dem efter ytterligare inkubering om 24 h.

Efter inkuberingen kan Fraser-anrikningen förvaras i kylskåp (2-8 °C) i högst 72 timmar, om odlingen inte kan utföras omedelbart efter att inkuberingstiden är över.

11.4 Odling på plattor

Om ½-Fraser-preanrikningen har satts i kylskåp på grund av lediga dagar, ska den förvaras i 37 ± 1 °C temperatur i cirka en timme innan den ympas på plattor.

Odlav en väl blandad **preanrikning (1/2-Fraser)** med 10 µl ögla som utspridd odling (verksamhetsbeskrivning LAB 728) på selektiva ALOA och LMBA plattor. Inkubera vid 37 ± 1 °C/ (24 ± 2 h) - 48 ± 2 h.

Odlav en väl blandad **anrikning (Fraser)** med 10 µl ögla som utspridd odling på selektiva ALOA och LMBA plattor. Inkubera vid 37 ± 1 °C/ (24 ± 2 h) - 48 ± 2 h.

Inkuberade plattor kan förvaras i kylskåp i högst 48 h innan de avläses.

11.5 Avläsning av plattorna

Avläs plattorna efter 24 ± 2 h och/eller först 48 ± 4 h efter inkuberingen.

11.5.1 ALOA

På ALOA växer arterna *Listeria monocytogenes* och *L. ivanovii* efter 48 h inkubering i form av rätt stora, blågröna kolonier, som omges av en ljus grumlig zon, som efter 24 h inkubering i allmänhet är svag eller saknas. Kolonierna är cirka 3 mm i diameter. Andra listeriaarter har ingen grumlig zon.

11.5.2 LMBA

L. monocytogenes växer på LMBA i form av små ljusa kolonier som omges av en smal, klar β -hemolyszon, som kan vara begränsad så att den är under kolonin. Kolonierna kan vara identifierbara redan efter 24 h inkubering, men kolonins storlek och hemolyszonen växer under inkuberingen i ytterligare 24 h. *L. ivanovii*-kolonierna omges av en bred hemolyszon.

12 Kontrollprov

Använd stammen *L. monocytogenes* L 3326 som positiv kontroll för kontrollproverna. Ramnos- och xylosbuljonger är alternativ till API Listeria identifieringstestserie.

12.1 Renodlingar och detektion av β -hemolys

Gör av selektiva agar en renodling på nötblodagar av totalt fem (om möjligt) kolonier som misstänks vara *L. monocytogenes*-bakterier för att påvisa β -hemolys. Inkubera vid 37 ± 1 °C/24-28 h.

Utför kontrollprover av minst en renodling som växer på blodagar som typiska β -hemolytiska kolonier eller av en renodling av misstänkt *L. monocytogenes* i enlighet med punkterna 12.2–12.5. Om du gjorde ytterligare kontroller på endast en renodling och den inte visar sig vara bakterien *L. monocytogenes*, kontrollera också de fyra sista renodlingarna (en i taget), tills du påvisar *L. monocytogenes*.

12.2 Katalastest

Utför **vid behov** katalastest enligt arbetsbeskrivning LAB 2054. *L. monocytogenes* är katalaspositiv.

12.3 Gramfärgning

Utför gramfärgning **vid behov** enligt arbetsbeskrivning LAB 2053. *L. monocytogenes* är en grampositiv, tunn, kort stav. Vissa celler kan vara böjda. Cellerna bildar enskilda korta kedjor eller är i U- eller V-format eller i grupper.

12.4 Ramnos och xylos

Ympa några kolonier av renodlingen på botten av ramnos- och xylosbuljongrör. Som negativ kontroll används ett icke-odlat rör. Inkubera vid 37 ± 1 °C / 1–5 dygn.

Syrabildning, dvs. en positiv reaktion observeras som en gul färg ofta redan 24-48 h efter inkuberingen. Fortsätt ändå inkuberingen vid behov till det 5 dygnet.

L. monocytogenes är i allmänhet (>90%) ramnospositiv och xylosnegativ. *L. monocytogenes* EELA63 är ramnospositiv och xylosnegativ. Färgen på de negativa kontrollerna borde vara oförändrad, det vill säga grön.

12.5 API Listeria

I stället för ramnos- och xylosbuljonger kan API Listeria identifieringstestserie användas som **alternativt** kontrollprov eller vid behov som en ytterligare kontroll. Utför API Listeria enligt tillverkarens anvisningar. Om tolkningen av DIM-reaktionen är oklar, använd utöver stammen *L. monocytogenes* L3326 också stammen *L. innocua* EELA 133 som kontrollstam. Om färgen på fickan mellan två positiva fickor (gul färg) är orange, avläses reaktionen som negativ.

13. Resultat

Resultatet anges enligt följande:

- a) *Listeria monocytogenes* har konstaterats / 25 g eller 25 ml prov eller den undersökta provmängden
- a) *Listeria monocytogenes* har inte konstaterats / 25 g eller 25 ml prov eller den undersökta provmängden

14 Validering av metoden

Evira 3463/3 är i överensstämmelse med metod NMKL 136 (fjärde upplagan, 2007), som har validerats genom kollaborativ analys (Loncarevic, S. and Johansson, T. 2006). Resultaten av valideringarna presenteras i bilaga 1 till metodbeskrivningen.

EELA:s Bakteriologiska forskningsenhet, gruppen för livsmedelsmikrobiologi (ELMI) deltog i analysen. 16 positiva livsmedels- och foderprover analyserades. Av dessa identifierade ELMI 15 prover som positiva efter anrikning i ½-Fraser på alla använda *L. Monocytogenes*-specifika substrat (ALOA som färdiga plattor och framställda av torrt substrat, OCLA och LMBA). Alla substrat som fanns med i jämförelsen gav ett felnegativt resultat för samma prov (skinka, låg halt). Efter anrikning i Fraser identifierade ELMI alla 16 prover som positiva på alla substrat. De negativa proverna (N=8) identifierades som negativa.

15 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input checked="" type="checkbox"/>
Officiell metod	<input checked="" type="checkbox"/>
Referensmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

16 Metoder för kvalitetssäkring

Laboratoriernas inbördes jämförande undersökningar	<input checked="" type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar i konfirmeringstester i provrör	<input checked="" type="checkbox"/>
Ympade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>

17 Referenser

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

*)ISO 11290-1:2014. Microbiology of the 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.

*) Bilaga till den ursprungliga metodbeskrivningen

18 Ändringar sedan senaste version

11.6.2015. Metoden för foder har ändrats så att den överensstämmer med livsmedelsmatrisen, dvs. Palcam-agar har ersatts med ALOA-agar. Metodjämförelserna har tagits bort från kvalitetssäkringarna, andra mindre ändringar.

Denna anvisning sammanställdes av: Tuula Johansson och Satu Hakola

BILAGA 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