

## 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, fårblodagar 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* och andra listeriabakterier i livsmedel, foder och miljöprover som gäller produktion och bearbetning av livsmedel. Det är fråga om en anrikningsmetod.

### 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.

*Listeria ivanovii* bildar bred dubbelhemolys på fårblodagar.

### 4 Princip

Provet homogeniseras och anrikas i två moment.

Till isoleringen används två *Listeria*-selektiva agarplattor, ALOA och LMBA. Plattorna odlas med preanrikning och anrikning. Isolerade stammar identifieras på basis av morfologiska och biokemiska egenskaper. Om *L. monocytogenes* (eller en annan *Listeria*) 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.

Mikrobiologi

## Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes*

---

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  $\beta$ -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 iakttas 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. *L. ivanovii* kan smitta till människa och orsaka sjukdom.

### 7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Stomacher homogenisator och sterila Stomacher-400 påsar eller skakapparat
- 3) Värmeskåp  $30 \pm 1$  °C
- 4) Värmeskåp  $37 \pm 1$  °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) Fårblodagar
- 6) Ramnos buljongrör
- 7) Xylos buljongrör
- 8) Katalas reagens, 3 % väteperoxid
- 9) Gramfärgningslösningar
- 10) API Listeria

Mikrobiologi

## Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes*

---

### 9 Kontrollstammar

- 1) *L. monocytogenes* L 3326 (Eviras stamsamling)
- 2) *L. innocua* EELA 133, vid behov (Eviras stamsamling)
- 3) *L. ivanovii* HEVI 902, ATCC 19119™, vid behov

Dessutom vid behov kontroller till CAMP-test

- 1) *Rhodococcus equi*
- 2) *Staphylococcus aureus*

### 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 prov

Provet sätts samman samtidigt för både den kvalitativa och den kvantitativa analysen.

Fasta prov bereds t.ex. genom att med hjälp av en sax och sked eller pincett finfördela 50-150 g prov i exempelvis en ren plastpåse. 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 (se Verksamhetsbeskrivning LAB 702/2). Av flytande prov uppvägs 50-150 g prov för analys.

Provet homogeniseras försiktigt och 25 g vägs upp skilt i en annan Stomacherpåse för den kvalitativa analysen.

Den sista delen av den vägda 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.

Mikrobiologi

## Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes*

---

### 11.2 Preanrikning

Preanrikning av proverna görs i ½-Fraser-buljong som värms upp till inkuberingstemperatur ( $30 \pm 1$  °C) före ympningen. Förhållandet mellan provmängden och preanrikningsbuljongens volym är 1:10, dvs. 1 del prov + 9 delar preanrikningsbuljong.

#### 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 den 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  $30 \pm 1$  °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  $37 \pm 1$  °C/ $24 \pm 2$  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  $37 \pm 1$  °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  $37 \pm 1$  °C/ ( $24 \pm 2$  h) -  $48 \pm 2$  h.

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

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

## Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes*

---

### 11.5 Avläsning av plattorna

Avläs plattorna efter  $24 \pm 2$  h och/eller först  $48 \pm 4$  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  $\beta$ -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. Av kontrollproverna görs alltid påvisande av hemolys och antingen ramnos- och xylosbuljonger eller API Listeria testserie. **Vid behov** utförs dessutom katalastest, gramfärgning och CAMP-test.

### 12.1 Renodlingar och detektion av $\beta$ -hemolys

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

Utför kontrollprover av minst en renodling som växer på blodagar som typiska  $\beta$ -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 Ramnos och xylos

Ympa några kolonier av renodlingen på botten av ramnos- och xylosbuljongrör. Som negativ kontroll används ett icke-odlat rör. Inkubera vid  $37 \pm 1$  °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.

Mikrobiologi

## Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes*

---

*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.

### 12.3 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.

### 12.4 Katalastest

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

### 12.5 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.

### 12.6 CAMP -testi

Utför **vid behov** CAMP-test enligt arbetsbeskrivning LAB 2058.

## 13. Resultat

Resultatet anges enligt följande:

- a) *Listeria monocytogenes* (eller en annan analyserad art av *Listeria*) har konstaterats / 25 g eller 25 ml prov eller den undersökta provmängden
- a) *Listeria monocytogenes* (eller en annan analyserad art av *Listeria*) har inte konstaterats / 25 g eller 25 ml prov eller den undersökta provmängden

## 14 Validering av metoden

ISO 11290-2:2017, Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 1: Detection method har validerats genom analyser mellan laboratorierna. Undersökningsresultaten presenteras i bilaga F till standarden.

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.

Mikrobiologi

**Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes***

---

**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, 5<sup>th</sup> 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

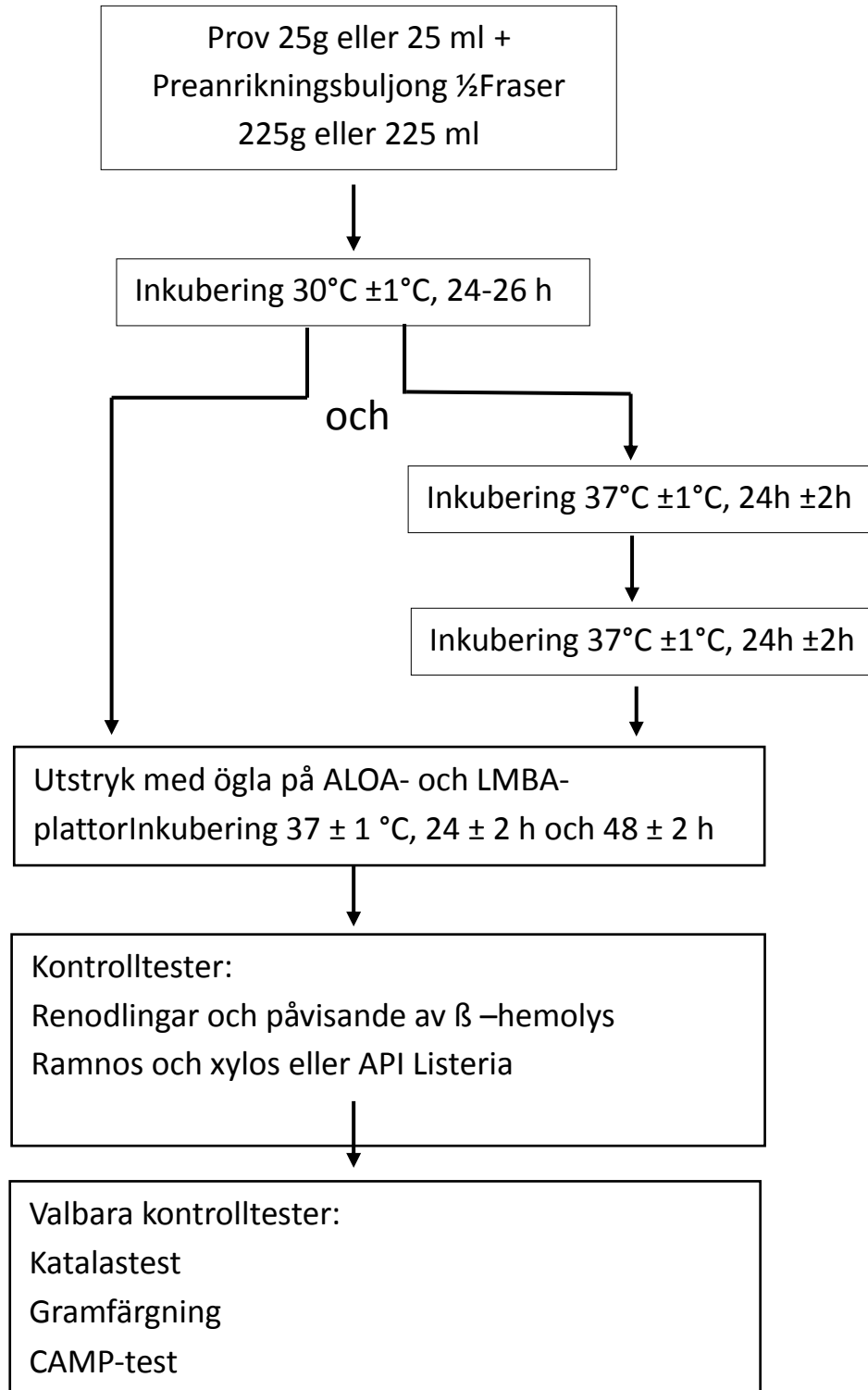
**18 Ändringar sedan senaste version**

5.7.2017 Små ändringar har gjorts i anvisningen på grund av ISO-standarden som trädde i kraft 2017, och en flödesplan om analysens förlopp har lagts till/Maria Rönnqvist

9.10.2017 anvisningen fick versionsnummer 1 då den infördes i det nya dokumentsystemet.



Mikrobiologi

**Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes*****BILAGA 1 Metodens förlopp**



Mikrobiologi

**Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes***
**BILAGA 2**

 NMKL Method No 136, 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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

Mikrobiologi

**Detektion och identifiering av bakterien *Listeria monocytogenes***

---

**BILAGA 3**Identifiering av arter av *Listeria* med hjälp av kontrolltester.

Art	β- hemolys	Bildar syra			Camp-test	
		Ramnos	Xylos	Mannitol	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	-	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	V	-	+	-	-
<i>L. fleischmanii</i>	-	+	+	+	-	-
<i>L. marthii</i>	-	-	-	+	-	-
<i>L. rocourtiae</i>	-	+	+	+	-	-
<i>L. weihenstephanensis</i>	-	+	+	-	-	-

V= varierande reaktion

(+)= svag reaktion