

Bestämning av bakterien *Listeria monocytogenes* Koloniräkningsteknik.

1 Metodreferenser och avvikelser

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

(ALOA och/eller LMBA 37±1°C / 24 - 48 h, fårblodagar 37±1°C / 24 h, β-hemolys, ramnos- och xylosbuljong 37±1°C / 1 - 5 dygn eller API Listeria; valbart katalastest och gramfärgning)

Avvikelser från ISO/DIS-metoden:

Istället för ALOA substrat kan LMBA substrat användas enligt överenskommelse, om användning av ALOA substrat inte krävs.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metoden är lämpad för bestämning av antalet *Listeria monocytogenes*-bakterier i livsmedel (kvantitativ metod, så kallad direktodling).

3 Definition(er)

L. 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

För bestämning av antal används främst *L. monocytogenes*-specifikt ALOA substrat. LMBA substrat kan användas enligt överenskommelse, om användning av ALOA substrat inte krävs. På substratet odlas startsuspension och spädningar. Om man inte odlar på varandra följande spädningar, odlas parallellplattor. Typiska kolonier verifieras på basis av morfologiska och biokemiska egenskaper. Serotypning utförs i enlighet med metodbeskrivning Evira 3498.

5 Möjliga felkällor

Bestämning av antal i mögelost och i andra mjuka ostar som har tillverkats av opastöriserad mjölk kan vara svårt på grund av den rikliga, störande bakteriefloran. Bland annat bakterier av släktet *Bacillus* kan störa bestämningen.

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

L. monocytogenes som stressats av syra i synnerhet växer på ALOA-substrat som turkosfärgade kolonier, som omges av en mycket svag (grumlig zon) eller så fattas den grumliga zonen helt.

På vissa stammar av *L. monocytogenes* har beskrivits en långsam fosfatidylinositol fosfatas C (PLPC) aktivitet. Sådana stammar kan detekteras om ALOA plattor inkuberas längre än t.ex. 4 dygn. Vissa av de här stammarna kan vara patogena. . Inte en enda PIPLC-negativ *L. monocytogenes*-stam har beskrivits.

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

6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

L. monocytogenes är en patogen bakterie och kan orsaka allvarlig sjukdom. Gravida och sådana som har ett sänkt immunförsvar är speciellt mottagliga.

7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Stomacher-homogenisator och sterila Stomacher-400 påsar
- 3) Värmeskåp 37 ± 1 °C

8 Substrat och reagenser

- 1) Peptonsaltlösning (PEPSU: pepton 0,1 %, salt 0,85 %) à 90 ml.
- 2) ALOA-plattor
- 3) LMBA-plattor (*Listeria monocytogenes* –blodagar med magnesiumsulfat och nalidixinsyra tillsatt) alternativt vid överenskommelse
- 4) Fårblodagar
- 5) Ramnosbuljongrör
- 6) Xylosbuljongrör
- 7) Katalasreagens, 3 % väteperoxid
- 8) Gramfärgningar
- 9) 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

I allmänhet undersöks provet först enligt den kvalitativa (anrikning) metoden, dvs. påvisningsmetoden och om den ger ett preliminärt positivt resultat (typisk tillväxt på selektiv agar), påbörjas den kvantitativa analysen omedelbart. Provet kan också undersökas samtidigt med både den kvalitativa och den kvantitativa metoden.

11.1 Sammansättning av provet

Provet sammansätts samtidigt för både den kvalitativa och den kvantitativa undersökningen, t.ex. genom att med hjälp av en sax och sked eller pincett finfördela 50-150 g prov och sätta i en Stomacher-påse. I provet kan medtas endast yta (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 Stomacher-påse för kvalitativ analys. Den sista delen av den finfördelade provmassan förvaras tätt förpackad i kylskåp, vars temperatur är högst 4°C, 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 innan produktens sista användningsdatum eller bäst-före datum.

11.2 Framställning av startsuspension och spädning

Fast prov

Framställ startsuspension genom att väga upp 10 g prov i 90 ml PEPSU (= spädning 10^{-1}). Homogenisera startsuspensionen i en Stomacher $\frac{1}{2}$ -1 min (Verksamhetsbeskrivning LAB 728).

Startsuspensionen kan också framställas i $\frac{1}{2}$ -Fraser-buljongens basbuljong eller så kan man använda färdig $\frac{1}{2}$ -Fraser buljong eller $\frac{1}{2}$ -Fraser buljong, som endast innehåller en del av de selektiva tillsatserna. Det lönar sig att gå tillväga på det sättet, då både påvisande och bestämning görs samtidigt.

Flytande prov

Analysera provet utspätt och gör dessutom en 10-faldig utspädning genom att pipettera 10 ml prov i 90 ml PEPSU. Om halten antas vara mycket låg behöver ingen 10-faldig utspädning göras, förutsatt att man odlar parallella plattor.

Om halten av *L. monocytogenes* misstänks vara hög i provet, görs ytterligare spädningar. I allmänhet behöver man ändå inte späda mer.

11.3 Odling på agarplattor

Fast prov

Odlas av homogeniserad startsuspension som ytodling totalt 1 ml på tre normalstora ALOA plattor (LMBA enligt överenskommelse) så, att cirka 0,3 ml suspension pipetteras på varje. Detta ska göras eftersom en platta av normal storlek inte absorberar 1 ml suspension. Då blir bestämningsgränsen <10 cfu/g. Odlas dessutom 0,1 ml startsuspension på en ALOA platta, då kan man ännu bestämma halten cirka 10 000 cfu/g (på en platta växer ca 100 cfu). Parallellplattor odlas inte.

Flytande prov

Odlas av ett väl blandat prov som ytodling totalt 1 ml på tre normalstora ALOA plattor (LMBA enligt överenskommelse) så, att cirka 0,3 ml suspension pipetteras på varje. Detta ska göras eftersom en platta av normal storlek inte absorberar 1 ml suspension. Då blir bestämningsgränsen <1 cfu/g. Odlas dessutom 0,1 ml prov och spädning av det på 10⁻¹ ALOA plattor, då kan man ännu bestämma halten ca 10 000 cfu/g (på en platta växer ca 100 cfu). Parallellplattor odlas inte.

Inkubera vid 37 °C±1°C.

11.4 Avläsning av plattorna

Avläs plattorna preliminärt efter 24 ± 3h eller först efter 48± 4h inkubering, då man får det slutliga resultatet.

Om tre plattor användes då startsuspensionen odlades, räknas kolonierna på dem ihop och på varje platta kontrolleras typiska/misstänkta kolonier.

11.4.1 ALOA

ALOA ska i allmänhet inkuberas i minst 36 h, helst 48 ± 4 h. På ALOA växer arterna *L. 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 fattas. Kolonierna är cirka 3 mm i diameter. Andra listeriaarter har ingen grumlig zon.

Räkna antalet typiska kolonier på plattor med totalt <100 typiska eller atypiska kolonier.

11.4.2 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 identifieras redan efter 24 h inkubering, men kolonins storlek och hemolyszonen växer under inkuberingen i ytterligare 24 h. *L. ivanovii*-kolonier omges av en bred hemolyszon. Räkna antalet typiska kolonier på plattor med totalt <150 typiska eller atypiska kolonier.

12 Kontrollprover

Använd stammen *L. monocytogenes* EELA63 som positiv kontroll för kontrollproverna. Ramnos och xylosbuljonger är alternativ till API Listeria identifieringstestserie.

12.1 Renodlingar och påvisande av β -hemolys

Gör renodlingar för att påvisa β -hemolys på fårblodagar av fem (om möjligt) kolonier/räkningsbar platta/spädning som misstänks vara *L. monocytogenes*-bakterier. Inkubera vid $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/18\text{-}24$ h eller tills växten är tillräcklig.

Utför kontrollprover av fem renodlingar som växer som β -hemolytiska kolonier (smal hemolyszon eller kan begränsas till under kolonin) i enlighet med punkterna 12.2-12.5. Gramfärgning och katalastest utförs i de fall där identifieringsresultatet inte är entydigt.

Några få stammar av *L. monocytogenes* bildar ingen β -hemolyszon eller ger ingen positiv CAMP-reaktion. Då rekommenderas ytterligare tester (gramfärgning, katalas, PCR...) för att kunna säkerställa att det är fråga om non-hemolytisk *L. monocytogenes*.

12.2 Katalastest

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

Katalastest som gjorts med kolonier som plockats av blodagar kan ibland ge felaktigt positiva resultat.

12.3 Gramfärgning

Utför vid behov gramfärgning 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 xylosbuljongrören. Odlar parallellt en positiv kontroll *L. monocytogenes* L 3326 bakteriostam. Som negativ kontroll används ett icke-odlat rör. Inkubera vid $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ i 15 dygn.

Syrabildning, dvs. en positiv reaktion observeras som en gul färg ofta redan 24 – 28 h efter inkuberingen. Fortsätt ändå inkuberingen vid behov till det 5 dygnet.

L. monocytogenes är i allmänhet ($\geq 90\%$) ramnospositiv och xylosnegativ. *L. monocytogenes* L 3326 är ramnospositiv och xylosnegativ. Färgen på de negativa kontrollerna borde vara oförändrad, det vill säga grön.

12.5 API Listeria

API Listeria identifieringstestserie kan användas som alternativt kontrollprov i stället för ramnos- och xylosbuljong. Utför ett API Listeria-prov enligt tillverkarens anvisningar. Använd bakteriestam *L. monocytogenes* EELA 63 som positiv kontroll. Om tolkningen av DIM-reaktionen är oklar, använd utöver *L. monocytogenes* också stammen *L. innocua* EELA 133. Om färgen på fickan mellan två positiva fickor (gul färg) är orange, avläses reaktionen som negativ.

13 Resultat

13.1 Uträkning av resultaten

Räkna ut resultaten enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703.

13.2 Rapportering av resultaten

Resultatet anges som antalet *L. monocytogenes*-bakterier per cfu/g eller ml prov enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703.

14 Validering av metoden

'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' har validerats genom analyser laboratorierna emellan. Resultaten presenteras i bilaga E till standarden.

14.1 Precision

Evira 3477/1 är förenhetlig med metod NMKL 136 (fjärde upplagan, 2007), som har validerats genom kollaborativ analys (Loncarevic, S. and Johansson, T. 2006). Nyckeltalen som beskriver metodens precision presenteras i bilaga 1 till valideringsrapporten.

EELA:s Bakteriologiska forskningsenhet, gruppen för livsmedelsmikrobiologi (ELMI) deltog i den kollaborativa undersökningen. Resultaten skiljde sig inte märkbart statistiskt sett ($p > 0,05$) från andra laboratoriers resultat (t-test) med undantag av två resultat (ostprov/*L. monocytogenes*/hög halt/LMBA; varmrökt lax/*L. monocytogenes*/hög halt/OCLA).

ALOA- och LMBA-substrat jämfördes statistiskt (t-test). Till jämförelsen användes naturligt kontaminerade och ympade livsmedel som äts som sådana. Antalet kolonier på ALOA- och LMBA-substrat skiljde sig inte statistiskt (t-test) nämnvärt ($p > 0,05$) (Valideringsrapport, bilaga 2).

14.2 Mätosäkerhet

Material har samlats sedan 2006 för bestämning av mätosäkerheten. För bestämningen har Niemeläs metod (Niemelä, S. 2003) använts. Våren 2009 togs dessutom ISO/TS 19036:2006 i bruk.

Mätosäkerheten enligt Niemelä avseende osäkerheten i räkningen av kolonier baserar sig på prover som har ympats hittills - riven morot, mozzarellaost och kallrökt lax - på odlade plattor (n=10 / matris), samt på prover av kallrökt lax som AFSSA har sänt för jämförande undersökning (n=7) på odlade plattor (n=50).

Mätosäkerheten i enlighet med ISO-metoden är tillsvidare baserad på en liten mängd material: 7 prover av kallrökt regnbågslax (2010) och 6 st. babymjölkpulver (2011) som har sänts till gemenskapens referenslaboratorium för listeria för referensanalys. Av resultaten från år 2010 har räknats mätosäkerhet på ALOA substrat och av resultaten från år 2011 på både ALOA och LMBA substrat.

Mätosäkerhet	ALOA	LMBA
Niemelä (%)	7,0	6,7
SO 19036 (log ₁₀ cfu/g)	0,2	0,2

Referenslaboratoriets (Cornu, M. and Lombard, B. 2009) riktvärde för en homogen matris, då analysen är baserad på kontroll av kolonier, är 0,7-0,5 log₁₀ cfu/g då koloniantalet är ≤5 – 15 cfu/g och 0,5 log₁₀ cfu/g då koloniantalet är >15-150 cfu/g.

15 Metodens status

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

16 Metoder för kvalitetssäkring

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

17 Referenser

*)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. Pesäkelaskentateknikka' 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.

*) Bilaga till den ursprungliga metodbeskrivningen

18 Ändringar sedan senaste version

5.8.2015

- Nötblodagar har bytts ut mot fårblodagar eftersom användning av nötblodagar har upphört.
- Antalet renodlingar har specificerats.

Denna anvisning sammanställdes av: Tuula Johansson