BD BBL CHROMagar Listeria

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 060501

*Vt allolevat joonealust märkust.

8012633(01)
2012-04
Eesti

SIHTOTSTARVE

BBL CHROMagar Listeria on selektiivne sööde *Listeria monocytogenes*i ja *L. ivanovii* tüvede isoleerimiseks, eristamiseks ja tuvastamiseks toiduainetest ning ümbritsevast keskkonnast võetud proovides.

BBL CHROMagar Listeria tunnustati AOAC Research Institute'i programmi Performance Tested Methods abil analüüsideks toorest veisehakklihast, suitsulõhest, lehtsalatist ja Brie juustust, kasutades FDA BAM-i, USDA FSIS-i, AOAC ja ISO meetodeid.[1–4] *Listeria monocytogenes*i / *L. ivanovii* tuvastamiseks ei ole tarvis teha tõendavaid biokeemilisi uuringuid.

Soovitatav on analüüsideks tunnustamata toidumaatriksitest pärit isolaate ja keskkonnast võetud proove uuringute teel tõendada.

KOKKUVÕTE JA SELGITUS

Listerioos on toidust põhjustatud haigus, mida tekitab *L. monocytogenes*. See võib ohustada iseäranis nõrgenenud immuunsusega patsiente: vähihaigeid, HIV-d põdevaid inimesi, rasedaid, vastsündinuid ja eakaid. Haiguse tõsiduse tõttu (20 surma 100 haigestumisjuhu kohta) on listerioos oluline tervishoidu ning põllumajandus- ja toidutööstust puudutav probleem. *L. monocytogenes*i põhjustatud haigust seostatakse külmade lihalõikude, linnuliha, pehmete juustusortide, söömisvalmis mereandide, suitsukala, hot dogide, rohelise salati ning ebapiisavalt pastöriseeritud või pastöriseerimata piimaga.[5,6] *L. ivanovii*, mida leidub harva toidus, põhjustab loomade haigestumist ning selle organismiga on seostatud ka mõnd inimese listerioosijuhtu.[7]

BBL CHROMagar Listeria on mõeldud *L. monocytogenes*i ja *L. ivanovii* tüvede isoleerimiseks, eristamiseks ja tuvastamiseks läbipaistmatu valge haloga ümbritsetud sinakasroheliste kolooniate moodustumise alusel. Söötme kromogeenne substraat ja fosfolipiidsubstraat hõlbustavad *L. monocytogenes*i ja *L. ivanovii* määramist ning eristamist teistest *Listeria* liikidest ja organismidest.

BBL CHROMagar Listeria eelis soovitatavate traditsiooniliste söötmete, nagu Modified Oxford ja Oxford, ees on võime eristada *L. monocytogenes*i ja *L. ivanovii*d teistest *Listeria* liikidest. See lihtsustab *L. monocytogenes*i / *L. ivanovii* tuvastamist teiste *Listeria* liikide ja muu bakterifloora olemasolu korral proovis, vähendades seega *L. monocytogenes*i või *L. ivanovii* tuvastamata jäämise riski.

Uuringutes, kus **BBL CHROMagar** Listeriat kasutati mitmesuguste toiduainetest ja keskkonnast võetud proovide analüüsimiseks, täheldati 99–100% tundlikkust ning 100% spetsiifilisust tuvastamistasemel 1–18 PMÜ / 25 g. Vt jaotist Resultatiivsuse karakteristikud.

PROTSEDUURI PRINTSIIBID

CHROMagar Listeria esmane arendaja oli A. Rambach ettevõttest CHROMagar, mis asub Pariisis Prantsusmaal. BD on lepingu alusel optimeerinud seda koostist, kasutades intellektuaalset omandit, mida kasutati eelvalmistatud söötmeplaadi **BBL CHROMagar** Listeria tootmisel.

Toitaineid annavad spetsiaalselt valitud peptoonid **Difco**. Selektiivsete ainete lisamine inhibeerib gramnegatiivsete organismide, pärmseente ja seente kasvu. Kromogeen on kromogeenne substraat, mis tekitab *Listeria* liikidele spetsiifilise ensüümi toimel hüdrolüüsudes sinakasroheliseks värvunud ühendeid. *L. monocytogenes*is ja *L. ivanovii*s leiduv spetsiifiline ensüüm reageerib **BBL CHROMagar** Listerias sisalduvale fosfolipiidsubstraadile, moodustades läbipaistmatu valge haloga ümbritsetud sinakasrohelised kolooniad. Läbipaistmatu valge haloga ümbritsetud selgepiirilise sinakasrohelise koloonia moodustumine viitab *L. monocytogenes*i või *L. ivanovii* olemasolule **BBL CHROMagar** Listerias.

REAGENDID

BBL CHROMagar Listeria

Ligikaudne Retsept* Ühe Liitri Puhastatud vee Kohta:

Peptoonid ja Lihaekstraktid	23,0	g
Kromogeenisegu	17,5	g
Agar	15,0	g
Sool	5,0	g
Inhibeerivad Ained	0,04	g

*Vajaduse korral kohandatud ja/või täiendatud toimingu kriteeriumide järgi.

Hoiatused ja ettevaatusabinõud.

Ainult laboris kasutamiseks.

Kui sööde saab liigset niiskust, eemaldage kaas, keerake nõu kummuli ja laske kuivada õhu käes, et vältida põhja ja ülaosa vahele kirme tekkimist inkubatsiooni ajal.

Kuivamise ajal hoidke valguse eest kaitstult. Vt jaotist Säilitusjuhised.

Toiduproovides võivad olemas olla patogeensed mikroorganismid, sh *Listeria monocytogenes*. Järgige aseptilisi töötamisviise ja kindlaksmääratud ettevaatusabinõusid,[8,9] et vältida mikrobioloogilisi ohte kõikide protseduuride vältel. Enne äraviskamist tuleb kasutatud plaadid, ettevalmistatud plaadid, proovianumad ja muud saastunud materjalid steriliseerida autoklaavimise teel.

Säilitusjuhised. Pärast vastuvõtmist tuleb söötmeplaate säilitada kuni inokulatsioonini pimedas 2–8 °C juures oma originaalses ümbrispakendis ja kartongkarbis. Plaate tohib kasutada kuni aegumiskuupäevani. Minimeerige söötme **BBL CHROMagar** Listeria sattumist valguse kätte nii enne inkubatsiooni kui ka selle ajal, kuna valgus võib kromogeene lõhustada.

Toote riknemine. Ärge kasutage plaate, kui neil on näha mikrobiaalse saastumise, värvimuutuse, kuivamise, mõranemise ilminguid või teisi riknemise tunnuseid.

PROTSEDUUR

Komplekti kuuluvad materjalid: BBL CHROMagar Listeria

Nõutavad, kuid komplekti mittekuuluvad materjalid: Täiendavad kultuursöötmed, reagendid, kvaliteedikontrolli organismid ja muud laboriseadmed vajaduse alusel.

Proovi võtmine ja ettevalmistamine

Järgige USA Toidu- ja ravimiameti (FDA), USA põllumajandusministeeriumi (USDA) ning Health Canada tuvastamis- ja loendamismeetodite standardeid või ISO-standardeid, et saada üksikasjalikke juhiseid proovi tüübile ja geograafilisele asukohale vastavate proovide ettevalmistamise, rikastuspuljongis kultiveerimise ja käsitsemise protseduuri kohta.

Analüüsi protseduur.

Laske söötmel enne inokulatsiooni toatemperatuurini soojeneda. Järgige aseptikanõudeid. Agari pind peab olema sile ja niiske, kuid mitte liiga niiske.

Inokuleerige inkubeeritud rikastuspuljongi proovi **BBL CHROMagar** Listeria söötmeplaadile ning pühkige samastamiseks laiali. Inkubeerige plaate 24 h jooksul ümberpööratult (agariga pool üleval) aeroobselt 35 ± 2 °C juures. Ärge inkubeerige CO_2-s. Kui tulemus on negatiivne, reinkubeerige proovi veel 24 tundi, enne kui esitate lõplikud tulemused.

Kasutaja kvaliteedikontroll

Uurige riknemise tunnuseid, nagu on kirjeldatud juhiste jaotises „Toote riknemine". Funktsionaalsuse kontrollimiseks külvake plaatidele kontrolliks näidisvalim mikroobide puhastest kultuuridest, mis annavad teadaolevaid ja soovitud reaktsioone. Soovitatavad on järgmised analüüsimiseks kasutatavad tüved.

Katsetüvi	Oodatavad tulemused
Listeria monocytogenes ATCC 19114	Kasv: läbipaistmatu valge haloga sinakasroheline koloonia
Listeria innocua ATCC 33090	Kasv: halota sinakasroheline koloonia
Proteus mirabilis ATCC 12453	Kasv puudub

Kvaliteedikontrolli nõuded peavad olema täidetud kehtivate kohalike, riiklike ja/või föderaalsete õigusaktide või akrediteerimise nõuete ja teie labori kvaliteedikontrolli eeskirjade kohaselt.

TULEMUSED

Pärast nõuetekohast inkubeerimist uurige söötmeplaate valgel taustal heades valgustingimustes. Läbipaistmatu valge haloga ümbritsetud sinakasroheline koloonia **BBL CHROMagar** Listeria söötmel viitab *L. monocytogenes*ile/*L. ivanovii*le. Teiste *Listeria* liikide puhul moodustuvad halota sinakasrohelised kolooniad. Gramnegatiivseid organisme inhibeeritakse. Grampositiivseid organisme, mis pole *Listeria* liigid, inhibeeritakse või need moodustavad valgeid kolooniaid.

PROTSEDUURI PIIRANGUD

CHROMagar Listeria ei suuda *L. monocytogenes*i koloonia värvi või halo moodustumise põhjal *L. ivanovii*st eristada. *L. monocytogenes*i ja *L. ivanovii*eristamiseks tuleb teha täiendavaid analüüse, nagu hemolüüs, ksüloos, ramnoos ja CAMP, või kasutada müügil olevaid AOAC-RI heakskiiduga *Listeria* tuvastamiseks mõeldud biokeemilise analüüsi komplekte.

CO_2-s inkubeerimine võib *Listeria* liikide taastumist mõjutada.

RESULTATIIVSUSE KARAKTERISTIKUD

BBL CHROMagar Listeria (CL) tunnustati AOAC Research Institute'i programmi Performance Tested Methods abil.[10] Söödet hinnati *Listeria monocytogenes*i sedastamise suhtes toores veisehakklihas, suitsulõhes, lehtsalatis ja Brie juustus. *L. monocytogenes*i taastumist söötmel CL võrreldi FDA BAM-i, USDA FSIS-i, AOAC ja ISO referentssöötme plaatidega, kasutades soovitatavaid eel- ja selektiivseid rikastusaineid. Testitud 265 toiduproovist analüüsiti 140 meetodite BAM, USDA või AOAC abil ning 125 meetodi ISO abil. **BBL CHROMagar** Listeria demonstreeris kõikide toidumaatriksite referentsmeetoditega võrdlemisel 99,3% tundlikkust ja 100% spetsiifilisust. Toidumaatriksite analüüsimisel valenegatiivseid tulemusi ei saadud. Hii-ruudu analüüsi põhjal ei täheldatud **BBL CHROMagar** Listeria meetodi ja referentssöötme plaatide võrdlemisel taastumises statistilist erinevust. Hinnati teadaolevaid isolaate ning CL-i tundlikkus ja spetsiifilisus olid 100%. Nende uuringute tulemused näitavad söötme **BBL CHROMagar** Listeria efektiivsust *Listeria monocytogenes*i taastamisel ja sedastamisel toores veisehakklihas, suitsulõhes, lehtsalatis ja Brie juustus meetodite FDA BAM, USDA FSIS, AOAC ja ISO kasutamisel. Uuringutulemuste valideerimismeetodite võrdluse kokkuvõte on toodud tabelis 1.

*SELLE PROOVIKOMPLEKTI MUDELI TOOTJA KAASA ANTUD NÄIDISEID HINNATI SÕLTUMATULT AOAC RESEARCH INSTITUTE'IS (AOAC UURIMISINSTITUUT) NING LEITI, ET NEED VASTAVAD TOOTJA ESITATUD TEABELE, MIS ON KIRJAS KOMPLEKTI TEABELEHEL. TOOTJA KINNITAB, ET SEE KOMPLEKT VASTAB IGATI AOAC UURIMISINSTITUUDI HINNATUD NÄIDISELE PROGRAMMI *Performance Tested Methods* SERTIFIKAADI NR 060501 JÄRGI.

Tabel 1. BBL CHROMagar Listeria meetodite võrdleva katsetamise kokkuvõte võrreldes referentssöötmetega

Toidumaatriksid	Meetod	Tase	MPN/g	Proove kokku	Positiivseid kokku	Referents-positiivsed	CL-positiivne	P-väärtus	Sobivus meetodiga*
Toores hakkliha	USDA	Loomulik saastumine	0,094 0,43	40	18	15	18	Mitte märkimisväärne	92,5%**
Toores hakkliha	ISO	Madal	0,061	20	11	11	10	Mitte märkimisväärne	96,0%
		Kontroll	< 0,003	5	0	0	0		
Suitsulõhe	FDA	Madal	0,023–0,15	40	37	37	37	Mitte märkimisväärne	100%
		Kontroll	< 0,003	10	0	0	0		
Suitsulõhe	ISO	Madal	0,240–0,75	40	30	30	30	Mitte märkimisväärne	100%
		Kontroll	< 0,003	10	0	0	0		
Salat	FDA	Madal	0,093	20	17	17	17	Mitte märkimisväärne	100%
		Kontroll	< 0,003	5	0	0	0		
Salat	ISO	Madal	0,093	20	9	9	9	Mitte märkimisväärne	100%
		Kontroll	< 0,003	5	0	0	0		
Brie juust	AOAC	Madal	0,0036	20	9	9	9	Mitte märkimisväärne	100%
		Kontroll	< 0,003	5	0	0	0		
Brie juust	ISO	Madal	0,0043	20	19	19	19	Mitte märkimisväärne	100%
		Kontroll	< 0,003	5	0	0	0		

* Tähistab kinnitatud identifitseerimisi, mis olid ekvivalentse CL-i ning kinnitatud positiivsete ja negatiivsete kultuuride vahel.
** USDA meetodit kasutades tuvastati toore hakkliha katse (CL) meetodil veel kolm positiivset proovi.

Toore veisehakkliha ja suitsulõhe analüüsimisel ISO-meetodiga 11290 täheldati ALOA[11] ja **BBL CHROMagar** Listeria puhul taastumisaja erinevust. Pärast 24-tunnist inkubeerimist esmases (Half Fraser) ja teiseses (Fraser) puljongis taastus **BBL CHROMagar** Listerial kakskümmend seitse positiivset proovi. Pärast 48-tunnist inkubeerimist tuvastati veel kolm positiivset proovi. Seevastu ALOA-l tuvastati 24 h mõõdudes esmases ja teiseses puljongis kolm positiivset proovi ning 48-tunnise inkubeerimise järel veel 23 positiivset proovi.
Hii-ruudu analüüs ei kajasta seda erinevust, kuna uuringus võrreldi nii Oxfordi kui ka ALOA referentssöödet **BBL CHROMagar** Listeria söötmega, kasutades referentsprotseduuri, millega vaadeldi kõiki söötmeid 24 ja 48 h mõõdudes. Saadud andmed on toodud tabelis 2.

Tabel 2. BBL CHROMagar Listeria ja ALOA taastumisaeg

Sööde (rikastusaine/ plaat)	Toores veisehakkliha n=20		Suitsulõhe n=20	
	Positiivsed 24 h mõõdudes	Täiendavalt positiivsed 48 h mõõdudes	Positiivsed 24 h mõõdudes	Täiendavalt positiivsed 48 h mõõdudes
Half Fraser / ALOA	1	2	0	1
Half Fraser / **BBL CHROMagar** Listeria	3	0	2	3
Fraser / ALOA	1	8	1	12
Fraser / **BBL CHROMagar** Listeria	9	0	13	0

Ülikoolis tehtud uuringus töödeldi 200 toiduaineproovi (50 tüüpi) *L. monocytogenes*i isoleerimiseks ja tuvastamiseks, kasutades 50 naturaalset ja 150 täiendatud proovi (100 proovi täiendati *L. monocytogenes*i ja 50 teiste *Listeria* liikidega). Analüüsiti juurvilju, piima ja piimatooteid, liha, mereande, linnuliha, söömisvalmis lihalõike ja seeni. Analüüsimiseks kasutati puljongeid Listeria Enrichment ja Fraser AOAC ja Health Canada referentsmeetodite alusel.[3,12] Kõik positiivsed Fraseri puljongid pandi **BBL CHROMagar** Listeria, Oxfordi, Modified Oxfordi ja PALCAM-i söötmeplaadile ning võrdluseks mitteselektiivsele lambaverega agariplaadile. Võimalikke kolooniaid analüüsiti täiendavalt. **BBL CHROMagar** Listeria puhul täheldati naturaalsete proovide analüüsimisel kokkuvõttes 100% (2/2) tundlikkust ja 100% (48/48) spetsiifilisust. *L. monocytogenes*iga täiendatud proovides täheldati **BBL CHROMagar** Listeria (99/100) 99% tundlikkust. **BBL CHROMagar** Listeria suutis täiendatud proovides eristada nelja *Listeria* liiki viiest. Ainult *L. ivanovii* andis *L. monocytogenes*iga sarnaseid tulemusi.

Teises ülikooli laboris tehtud uuringus töödeldi 63 linnulihast ja keskkonnast võetud proovi USDA/FSIS-i *Listeria* isoleerimismeetodiga. Uuringus kasutati rikastuspuljongeid UVM ja Fraser. Proovid asetati Modified Oxfordi ja **BBL CHROMagar** Listeria söötmeplaatidele ning neid võrreldi omavahel. 11 proovi olid *L. monocytogenes*i suhtes positiivsed ning üks proov oli 4b-serotüübi suhtes positiivne. Kõigis 11 proovis ilmnesid **BBL CHROMagar** Listeria söötmel *L. monocytogenes*i suhtes positiivsed kolooniad. PCR-analüüs kinnitas nende kolooniate olemasolu. **BBL CHROMagar** Listeria demonstreeris *L. monocytogenes*i tuvastamisel ja eristamisel 100% (11/11) tundlikkust ja 100% (52/52) spetsiifilisust. Modified Oxfordi sööde demonstreeris *L. monocytogenes*i taastumisel 100% (11/11) tundlikkust, kuid ei suutnud *L. monocytogenes*i teistest *Listeria* liikidest eristada. Kaheksateistkümnes proovis 63-st ilmnesid Modified Oxfordi söötmel võimalikud positiivsed kolooniad, mille olemasolu tuli täiendava analüüsiga kinnitada.

Siseuuringus analüüsiti täiendatud hot dogi proove FDA/BAM-i meetodi alusel. Ettevalmistamisel ja analüüsimisel kasutati väikest inokulaadi kontsentratsiooni (1–5 PMÜ / 25 g) ja suurt inokulaadi kontsentratsiooni (10–50 PMÜ / 25 g). Analüüsiti 16 *L. monocytogenes*i ja 9 *Listeria* liiki. **BBL CHROMagar** Listeria söötme taastumist võrreldi Oxfordi, Modified Oxfordi ja PALCAM-i söötmetega. **BBL CHROMagar** Listerial taastus 100% (16/16) *L. monocytogenes*ist kõigis inokulaadi kontsentratsioonides.[10]

KÄTTESAADAVUS

Kat. nr	Kirjeldus
215085	**BBL CHROMagar** Listeria, 20 plaati sisaldav pakend
290720	**Difco** Buffered Listeria Enrichment Broth Base, 500 g
222330	**Difco** UVM Modified Listeria Enrichment Broth, 500 g
211767	**Difco** Fraser Broth Base, 500 g
211742	**Difco** Fraser Broth Supplement, 6 x 10 mL
218105	**Difco** Buffered Peptone Water, 500 g

VIITED

1. U.S. Food and Drug Administration. 2003. Bacteriological analytical manual (on-line), AOAC International, Gaithersburg, MD.
2. U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Services, Office of Public Health and Science. 2008. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. *In* Microbiology laboratory guidebook, Washington, D.C.
3. USDA, Official Methods of Analysis. 2002. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. 17th ed, AOAC International, Arlington, VA.
4. International Organization for Standards (ISO) Microbiology Methods. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes*, ISO 11290-1.
5. Doyle M. and L. Beuchat. 2007. Food microbiology fundamentals and frontiers, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Gombas D., Y. Chen, R. Clavero and V. Scott. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods, J. Food Prot. *66*: 559-569.
7. Reissbrodt, R. 2004. New chromogenic plating media for detection of pathogenic *Listeria* spp.-an overview, Int. J. Food Microbiol. *95*: 1-9.
8. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U. S. Government Printing Office, Washington, D.C.
9. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/1EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
10. Data on file, BD Diagnostics.
11. Ottaviani, F., M. Ottaviani, and M. Agosti. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings, P6 ADRIA Quimper, 16-18 June 1997.
12. Health Canada. 2002 and 2003. The Compendium of Analytical Methods, Health Products and Food Branch, Method MFHPB-30 and Supplement to the Method MFHPB-30.

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds

AOAC is a trademark and Performance Tested Methods is a service mark of AOAC International.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.
Difco is a trademark of Difco Laboratories, Inc., subsidiary of Becton, Dickinson and Company.
BBL, BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD.