

Project 404.6200

Onderzoek naar het voorkomen van *Listeria monocytogenes* in melk en kaas

Projectleider: ir. H. Stegeman

Rapport 91.48

Oktober 1991

Evaluatie van een aantal methoden voor het isoleren van *Listeria monocytogenes* uit kaas.

Ir. A.E.M. Vermunt, R. Bakker, W. Hakemulder, ir. H. Stegeman

Afdeling: Microbiologie

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

hoofden onderzoekafdelingen

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

circulaire

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Veehouderij en Zuivel

Centraal Orgaan Zuivelcontrole, ir. J. Jans en R. Hovestad

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 METHODE EN MATERIAAL	6
2.1 Monstermateriaal	6
2.2 Isolatiemethoden voor <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.2.1 Gemodificeerde IDF-methode	6
2.2.2 Koude ophopingstechniek	6
2.2.3 RIKILT 1 methode	8
2.2.4 RIKILT 2 methode	8
2.2.5 Bevestiging van verdachte kolonies van <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.2.6 Samenstelling en bebroeding van isolatiemedia	9
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	9
3.1 Vergelijking tussen de gemodificeerde IDF-methode en de koude ophopingstechniek	9
3.2 Resultaten koude ophopingstechniek	11
3.3 Resultaten gemodificeerde IDF-methode	13
3.4 Resultaten van de isolatiemedia van de koude ophopingstechniek en de gemodificeerde IDF-methode	14
3.5 Resultaten RIKILT 1 methode	14
3.6 Resultaten RIKILT 2 methode	14
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	15
LITERATUUR	16
FIGUREN	
BIJLAGEN	
1 RIKILT voorschrift voor de gemodificeerde IDF-methode	

()

()

SAMENVATTING

In de periode december 1987 tot juni 1989 zijn door het RIKILT ca. 700 monsters kaas onderzocht op de aanwezigheid van *Listeria monocytogenes*. Bij dit onderzoek zijn diverse methoden toegepast voor de isolatie van *L. monocytogenes*. In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de gebruikte methoden met de toegepaste proefvariabelen en van de hiermee verkregen resultaten.

Het aantal monsters wat positief is bevonden met de gemodificeerde IDF-methode (28 monsters) is niet significant hoger (Tekentoets; $P > 0,05$) dan het aantal monsters wat met de koude ophopingstechniek positief is bevonden (20 monsters). Er lijkt bij de Barsella kazen wel een significant hoger aantal positieve monsters te worden gevonden met de gemodificeerde IDF-methode, in vergelijking met de koude ophopingstechniek (Tekentoets; $P = 0,07$). Uit de resultaten is gebleken dat afstrijken bij de koude ophopingsmethode meer positieve resultaten oplevert wanneer eerst een secundaire selectieve ophoping plaats vindt alvorens wordt afgestreken. Bij de gemodificeerde IDF-methode wordt ten opzichte van de overige varianten een statistisch hoger aantal isolaties gevonden bij de variant waarbij na 24 uur primaire selectieve ophoping vervolgens 3 maanden koude ophoping plaats vindt.

Bij de methodes RIKILT 1 en RIKILT 2 zijn dermate weinig positieve monsters gevonden dat geen uitspraak kan worden gedaan over de verschillen in resultaten tussen de geteste varianten.

()

()

1 INLEIDING

L. monocytogenes is een bacterie die de ziekte listeriose kan veroorzaken bij mens en/of dier. Door de stijging van het aantal gevallen van listeriose bij de mens sinds 1975 en door de mogelijke rol die levensmiddelen spelen bij de overdracht van deze ziekteverwekker is er grote belangstelling ontstaan voor deze kiem.

L. monocytogenes komt ubiquitair voor: uit water, afvalwater, faeces, produkten van plantaardige en/of dierlijke oorsprong wordt dit micro-organisme vaak geïsoleerd (Beumer et al., 1990).

Recente gevallen van listeriose zijn veroorzaakt door melk, zachte kaas, kool, salade en vlees (Brackett, 1988).

Besmetting van melk met *L. monocytogenes* vindt plaats op de boerderij door melkmachines of door faeces. Een enkele keer wordt melding gemaakt van een door *L. monocytogenes* veroorzaakte mastitis, waardoor grote aantallen listeria's met de melk uitgescheiden worden. In rauwe melk worden besmettingspercentages gemeld voor *L. monocytogenes* van 4,4% in Nederland (Beckers et al., 1987).

Niet alleen tijdens de melkwinning maar ook tijdens de verdere melkverwerking kan besmetting met *L. monocytogenes* plaats vinden. Door de lange rijpings- en/of bewaartijden voor bepaalde typen kaas kunnen listerias uitgroeien tot aantallen van ca. 10^7 /gram. Hoge aantallen worden gevonden bij zachte kazen (Brie, Vacherin Mont d'Or) en kazen met een korstflora (Leiderkranz). Tijdens de korstrijping zal de pH in de korst en direct onder de korst worden verhoogd, waardoor groeimogelijkheden voor *Listeria* ontstaan. In harde kazen (Gouda) kan *L. monocytogenes* wel overleven; vermeerdering blijkt echter niet mogelijk (Northolt, 1988).

In de periode december 1987 tot juni 1989 zijn op het RIKILT ca. 700 monsters kaas onderzocht op de aanwezigheid van *L. monocytogenes*. Het merendeel van deze monsters was afkomstig van het Centraal Orgaan voor de Zuivelcontrole (COZ) te Leusden.

Bij de isolatie van *L. monocytogenes* moet rekening gehouden worden met de ontwikkeling van verwante soorten en genera als begeleidingsflora (stooflora). Bij het ontwikkelen van procedures en media is het streven de stooflora zoveel mogelijk te remmen zonder de ontwikkeling van *L. monocytogenes* al te zeer te beïnvloeden.

Bij het begin van dit onderzoek was nog geen genormaliseerde methode voorhanden; later zouden FDA-, ISO- en IDF-voorschriften tot stand komen. Derhalve zijn bij het onderzoek van de kaasmonsters diverse methoden toegepast. In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de gebruikte methoden met de toegepaste proefvariabelen en van de hiermee verkregen resultaten. Een eerste methode die is toegepast is de zgn. koude ophopingstechniek, waarbij gebruik wordt gemaakt van het feit dat *Listeria* bacteriën wel in staat zijn te groeien bij 4°C, terwijl de meeste bacteriën van de stooflora dit niet kunnen. Het nadeel van deze methode is dat het erg lang kan duren voordat isolatie van de aanwezige *L. monocytogenes* kan plaats vinden.

Bovendien zijn een aantal methoden gebruikt waarbij antibiotica zijn toegepast om de bacteriën uit de stoorflora te onderdrukken. Uitgangspunt bij deze methoden was steeds de meest recente methode van de International Dairy Federation (IDF). Hierbij is na een selectieve primaire ophoping soms ook nog een selectieve secundaire ophoping toegepast. Als isolatiemedia zijn, afhankelijk van de ophopingsmethode, gebruikt TSAG (Trypticase Soy Agar met Gistextract), MMA (Modified McBride Agar), LPM (Lithiumchloride Phenylethanol Moxalactam Agar), TNSA (Tripaflavine Nalidixinezuur Serum Agar), PALCAM (Polymyxine Acriflavine Lithiumchloride Ceftazidime Aesculine Mannitol Agar) en OXFORD Agar.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Monstermateriaal

De monsters waren afkomstig van het Centraal Orgaan voor de Zuivelcontrole (COZ) te Leusden. Er zijn diverse soorten kaas onderzocht. Van de zachte kaassoorten waren dit Barsella, Brie en Kernhemmer en van de harde kaassoorten waren dit Edammer, Goudse, Maasdammer, Boerenkaas en Rauwmelkse kaas. Indien de monsters niet direct na de monsternamen zijn onderzocht, zijn ze bewaard bij 4°C.

Van de monsters harde kaas die vanaf februari 1988 zijn onderzocht is zowel korst als kern bemonsterd. Ten gevolge van een nabesmetting zal alleen de korst van de kaas besmet zijn. Door zowel korst als kern te onderzoeken kan een idee verkregen worden omtrent de manier van de besmetting.

2.2 Isolatiemethoden voor *L. monocytogenes*

2.2.1 Gemodificeerde IDF-methode

Hierbij zijn 5 variaties toegepast, die schematisch zijn weergegeven in figuur 1.

Methode A: Na 24 uur ophoping in een primair selectief medium met een acriflavine-concentratie van 10 mg/l (zie 4.1 bijlage 1) bij 30°C vindt een afstrijk plaats op Trypaflavine Nalidixinezuur Serum Agar, TNSA (zie 4.4 bijlage 1) en Modified McBride Agar, MMA (zie 4.3 bijlage 1). De platen worden onder Henry belichting met behulp van een donkerveld stereomicroscoop onderzocht op de mogelijke aanwezigheid van blauwe tot grijsblauwe *Listeria* kolonies.

Methode B: Na 24 uur ophoping in een primair selectief medium (acriflavine-concentratie 10 mg/l; zie 4.1 bijlage 1) bij 30°C vindt een tweede ophoping plaats in een selectief secundair medium (acriflavine-concentratie 15 mg/l; zie 4.2 bijlage 1) gedurende 24 uur bij 30°C, gevolgd door een afstrijk op MMA en TNSA. Zie hiervoor ook RIKILT-voorschrift gemodificeerde IDF-methode (2^o oplage 1988-11-25), bijlage 1.

Methode C: Na 48 uur ophoping in een primair selectief medium (acriflavine-concentratie 10 mg/l; zie 4.1 bijlage 1) bij 30°C vindt een afstrijk plaats op TNSA en MMA.

Methode D: Na 7 dagen ophoping in een primair selectief medium (acriflavine-concentratie 10 mg/l; zie 4.1 bijlage 1) bij 30°C vindt een afstrijk plaats op MMA en TNSA.

Methode E: Na 24 uur incubatie in een primair selectief medium (acriflavine-concentratie 10 mg/l; zie 4.1 bijlage 1) bij 30°C, vindt een koude ophoping plaats gedurende 3 maanden bij 4°C. Hierbij vindt periodiek een afstrijk plaats op MMA en TNSA.

2.2.2 Koude ophopings-techniek

De gevolgde methode is schematisch weergegeven in figuur 2.

Er is 25 gram monstermateriaal overgebracht in een steriele stomacherzak en hieraan is 225 ml van het ophopingsmedium, wat tevoren is opgewarmd tot 45°C, toegevoegd (Samenstelling ophopingsmedium per liter: 30 g trypticase soya broth, 6 g gistextract; pH 7.3). Er wordt gedurende 2 minuten met de stomacher gemengd en vervolgens bij 4°C geïncubeerd gedurende een periode van 6 maanden. Periodiek is de pH van het ophopingsmedium gecontroleerd en indien nodig bijgesteld tot pH-waarde 6,8.

Maandelijks wordt afgestreken op de isolatiemedia Trypton Soya Agar Gistextract, TSAG (4.5 bijlage 1) en Modified McBride Agar, MMA (4.3, bijlage 1).

Bij deze methode zijn 2 varianten toegepast.

Methode A: Vanuit het ophopingsmedium wordt direct afgestreken op TSAG en MMA.

Methode B: Vanuit het ophopingsmedium wordt eerst 0,1 ml overgebracht in 10 ml van een secundair selectief ophopingsmedium (acriflavine-concentratie 15 mg/l; 4.2 bijlage 1). Dit wordt 24 uur bebroed bij 30°C, alvorens wordt afgestreken op TSAG en MMA.

2.2.3 RIKILT 1 methode

Deze methode is schematisch weergegeven in figuur 3.

Hierbij zijn 3 varianten getest.

Methode A: Na 24 uur ophoping bij 30°C van een 1:10 verdunning van 25 g monstermateriaal in een primair selectief medium met een acriflavine concentratie van 10 mg/l (4.1 bijlage 1) vindt gedurende 24 uur bij 30°C een tweede ophoping plaats in een secundair selectief medium met een acriflavine concentratie van 15 mg/l (4.2 bijlage 1).

Hierna vindt een afstrijk plaats op TNSA en Lithiumchloride Phenylethanol Moxalactam Agar, LPM en PALCAM (zie 2.2.6).

Methode B: Na 7 dagen ophoping bij 30°C van een 1:10 verdunning van 25 g monstermateriaal in een primair selectief medium met een acriflavine-concentratie van 10 mg/l (4.1 bijlage 1) vindt gedurende 24 uur bij 30°C een tweede ophoping plaats in een secundair selectief medium met acriflavine-concentratie 15 mg/l (4.2 bijlage 1). Hierna vindt een afstrijk plaats op TNSA, LPM en PALCAM.

Methode C: Na 24 uur ophoping bij 30°C van een 1:100 verdunning van 25 g monstermateriaal in een primair selectief medium met een acriflavine-concentratie van 10 mg/l (4.1 bijlage 1) vindt gedurende 24 uur bij 30°C een tweede ophoping plaats in een secundair selectief medium met een acriflavine-concentratie van 15 mg/l (4.2 bijlage 1). Hierna vindt een afstrijk plaats op TNSA, LPM en PALCAM.

2.2.4 RIKILT 2 methode

Deze methode is schematisch weergegeven in figuur 4.

Hierbij zijn 3 varianten onderzocht.

Methode A: Zie methode A van RIKILT 1-methode (2.2.3). Er vindt een afstrijk plaats op TNSA, LPM en OXFORD (zie 2.2.6).

Methode B: Zie methode B van RIKILT 1-methode (2.2.3). Er vindt een afstrijk plaats op TNSA, LPM en OXFORD.

Methode C: Na 48 uur ophoping bij 30°C van een 1:10 verdunning van 25 g monstermateriaal in een primair selectief medium met een acriflavine-concentratie van 10 mg/l (4.1 bijlage 1) wordt afgestreken op TNSA, LPM en OXFORD.

2.2.5 Bevestiging van verdachte kolonies *L. monocytogenes*

De identificatie van verdachte kolonies is uitgevoerd conform punt 6.5 van het voorschrift van bijlage 1. De serotypering is uitgevoerd door het RIVM.

2.2.6 Samenstelling en bebroeding van isolatiemedia.

Voor de samenstelling van TNSA, MMA en TSAG zie bijlage 1. Deze media zijn 48 uur bebroed in micro-aerofiel milieu bij 37°C.

De samenstelling van LPM agar per liter is: 35.5 g phenylethanol, 10.0 g glycine anhydride, 5.0 g lithiumchloride, 20 mg moxalactam (Mc Clain en Lee, 1987). Dit medium is micro-aerofiel gedurende 48 uur bij 30°C bebroed.

De OXFORD agar was afkomstig van OXOID (agar:CM856 en supplement: SR140). Dit medium is micro-aerofiel gedurende 48 uur bij 30°C bebroed.

PALCAM agar heeft de volgende samenstelling per liter: 39 g Columbia Agar, 15 g NaCl, 0.5 g glucose, 10 mg polymixine B, 5 mg acriflavine-HCl, 15 g LiCl, 20 mg ceftazidime, 0.75 g aesculine, 0.5 ijzerammoniumcitraat, 10 g D-Mannitol, 80 mg fenolrood (pH=7.2) (Van Netten et al., 1989). Dit medium is micro-aerofiel gedurende 48 uur bij 37°C bebroed.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Vergelijking tussen de gemodificeerde IDF-methode en de koude ophopingstechniek.

Van 363 monsters zijn zowel de gemodificeerde IDF-methode (2.2.1) als de koude ophopingsmethode (2.2.2) ingezet. In totaal zijn 40 monsters positief bevonden met tenminste één van beide methoden. De resultaten van deze 40 monsters zijn weergegeven in tabel 1. Van de monsters is tevens het serotype vermeld.

Een resultaat is positief beoordeeld indien op tenminste één van de twee gebruikte isolatiemedia *L. monocytogenes* is geïsoleerd.

Tabel 1 Vergelijking tussen de resultaten verkregen met de gemodificeerde IDF-methode en de koude ophopings-techniek *.

Monster nr	Soort kaas	Gemodificeerde IDF methode	Koude ophopings-techniek
9	Rauwmelkse	L. mono 1/2 a	neg
10	Goudse	neg	L. mono 1/2 a
11	Geiten (gekruide)	neg	L. mono 1/2 a
12	Goudse (fabriek)	L. mono 1/2 a	neg
13	Goudse (fabriek)	L. mono 1/2 c	neg
14	Goudse	neg	L. mono 1/2 a
15	Brood 40+	neg	L. mono 1/2 a
16	Edam	neg	L. mono 4b
17	Boeren	neg	L. mono 1/2a
18	Boeren	L. mono 1/2 a	neg
19	Boeren	neg	L. mono 4b
20	Barsella	L. mono 1/2 b	L. mono 1/2 b
21	Rauwmelkse	L. mono 1/2 a	neg
22	Rauwmelkse	neg	L. mono 1/2 a
23	Rauwmelkse	neg	L. mono 1/2 a
24	Barsella	L. mono 1/2 b	neg
25	Rauwmelkse	L. mono 1/2 a	neg
26	Rauwmelkse	neg	L. mono 1/2 a
27	Baby Goudse	L. mono 1/2 a	neg
28	Boerendieet	L. mono 1/2 a	L. mono 1/2 a
29	Boerendieet	L. mono 1/2 a	L. mono 1/2 a
30.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 b	neg
31.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 a en 1/2	L. mono 1/2 a
32	Boeren	L. mono 1/2 a	L. mono 4b
33.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 a en 1/2	L. mono 1/2 b
34.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 a en 1/2	L. mono 7
35.1	Barsella-korst	neg	L. mono 1/2 a
36.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 a en 3 b	L. mono 1/2 a
37.2	Barsella-kern	L. mono 3b	neg
38.1	Barsella-korst	L. mono 1/2a en 3 b	neg
39.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 a	neg
40.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 a en 1/2	neg
41.1	Barsella-korst	L. mono 1/2 b	neg
42.2	Maasdammer-kern	L. mono 1/2 a	neg
43.2	Maasdammer-kern	L. mono 1/2 a	neg
44.2	Maasdammer-kern	L. mono 1/2 a	neg
45.1	Maasdammer-korst	L. mono 1/2 a	neg
46.1	Maasdammer-korst	L. mono 1/2 a	neg
47	Boerenkaas	L. mono 1/2 b	neg
48	Gouda 48+	neg	L. mono 4 b

* Alleen de resultaten zijn weergegeven van die monsters waarbij tenminste één van beide methoden een positief resultaat gaf voor *L. monocytogenes* (= L. mono)

Slechts 8 van de 40 monsters werden met beide methoden positief bevonden. Met de koude ophoping zijn 12 monsters positief bevonden die gemist zijn met de gemodificeerde IDF-methode, terwijl met de gemodificeerde IDF methode 20 monsters positief bevonden zijn, die gemist zijn met de koude ophopingstechniek.

Het aantal monsters wat positief wordt bevonden met de gemodificeerde IDF-methode (28) is niet significant hoger (Tekentoets; $P > 0,05$) dan het aantal monsters wat met de koude ophopingsmethode positief wordt bevonden (20). Van de monsters Barsella kaas werden er 12 positief bevonden met de gemodificeerde IDF methode en slechts 6 met de koude ophopingstechniek (Tekentoets; $P = 0,07$).

Opvallend is dat bij de koude ophopingstechniek 4 maal *L. monocytogenes* serotype 4b is aangetroffen, terwijl dit serotype nooit bij de gemodificeerde IDF-methode is geïsoleerd. Dit is te verklaren door het feit dat dit serotype erg gevoelig is voor het antibioticum acriflavine wat in het selectieve ophopingsmedium van de gemodificeerde IDF-methode aanwezig is (Beumer, 1988).

3.2 Resultaten Koude ophopings-techniek

In tabel 2 zijn de resultaten weergegeven van de monsters waarvan m.b.v. de koude ophopings-techniek *L. monocytogenes* kon worden geïsoleerd.

Tabel 2 Resultaten koude ophopings-techniek

Monster nr	Kaassoort	Directe isolatie		Isolatie na secundaire ophoping	
		TSAG	MMA	TSAG	MMA
1	Rauwmelkse	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
2	Barsella	L.mono 1/2b	L.mono 1/2b	neg	L.mono1/2b
3	Boeren	L.mono 1/2a	neg	neg	neg
4	Boeren	L.mono 1/2a	pos	neg	neg
5	Boerenkruiden	neg	neg	neg	L.mono1/2a
6	Boeren	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
7	Rauwmelkse	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
8	Boeren	pos	L.mono1/2a	pos	pos
10	Goudse	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
14	Goudse	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
15	Brood40+	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
16	Edam	L.mono 4b	pos	neg	L.mono 4b
17	Boeren	neg	neg	L.mono 1/2a	pos
19	Boeren	neg	neg	L.mono 4b	pos
20	Barsella	neg	neg	neg	L.mono1/2b
22	Rauwmelkse	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
23	Rauwmelkse	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
28	Boerendieet	neg	neg	L.mono 1/2a	neg
29	Boerendieet	neg	neg	L.mono 1/2a	pos
31.1	Barsella-korst	neg	pos	L.mono 1/2a	pos
32	Boeren	pos	neg	L.mono 4b	pos
33.1	Barsella-korst	neg	neg	pos	L.mono1/2b
34.1	Barsella-korst	neg	neg	pos	L.mono 7
35.1	Barsella-korst	neg	L.mono 1/2a	neg	pos
36.1	Barsella-korst	L.mono 1/2a	neg	pos	pos

Van de in totaal 25 positief bevonden monsters werden er 9 na direct uitplaten positief bevonden en 23 met een secundaire selectieve ophoping als tussenstap; slechts 7 monsters werden met beide methoden positief bevonden. Van de 18 monsters waarbij slechts één van de beide methoden een positief resultaat opleverde waren er 2 positief met methode A (zonder secundaire selectieve ophoping) en 16 met methode B (mét secundaire selectieve ophoping). Dit is statistisch significant (Tekentoets; $P < 0,05$), dus is de conclusie gerechtvaardigd dat afstrijken bij de koude ophopingsmethode meer positieve resultaten oplevert wanneer eerst een secundaire selectieve ophoping plaats vindt alvorens wordt afgestreken.

3.3 Resultaten van de gemodificeerde IDF-methode

Bij deze methoden zijn 5 varianten toegepast (zie 2.2.1), nl A t/m E.

De resultaten hiervan zijn weergegeven in tabel 3. Hierin zijn alleen die monsters weergegeven waarvan tenminste 1 van de varianten een positief *L. monocytogenes* resultaat opleverde.

Tabel 3 Resultaten van de gemodificeerde IDF methode ¹.

Monster nr	Kaas soort	Variant gemodificeerde IDF methode				
		A	B	C	D	E
		TNSA MMA	TNSA MMA	TNSA MMA	TNSA MMA	TNSA MMA
9	rauwmelks	- -	- -	1/2a 1/2a	- -	- ² -
12	Goudse	- -	- -	- -	- -	1/2a -
13	Goudse	- -	- -	- -	- -	1/2c -
18	Boeren	- -	- -	- -	1/2a +	+ +
20	Barsella	1/2b +	+ -	- +	- -	+ +
21	Rauwmeelks	- -	- -	- -	- -	+ 1/2a
24	Barsella	+ 1/2b	+ +	+ -	- -	+ +
25	Rauwmeelks	- -	- -	- -	- -	1/2a -
26	Baby Goudse	- -	- -	- -	- -	- 1/2a
28	Boerendieet	- -	- -	- -	- -	- 1/2a
29	Boerendieet	- -	- -	- -	- -	1/2a +
30.1	Bars.korst	1/2b -	- -	- -	- -	+ -
31.1	Bars.korst	+ -	- -	1/2b -	- -	+ -
32	Boeren	1/2a -	+ -	- -	- -	+ +
33.1	Bars.korst	1/2b -	+ -	- -	+ +	1/2a +
34.1	Bars.korst	- +	+ -	- +	1/2b +	1/2a +
36.1	Bars.korst	+ +	3b +	+ -	+ +	+ 1/2a
37.2	Bars.kern	- -	- -	- -	3b +	- -
38.1	Bars.korst	+ +	- 3b	+ -	+ +	+ 1/2a
39.1	Bars.korst	+ +	+ +	+ +	1/2a +	- 1/2a
40.1	Bars.korst	- -	- +	1/2b -	- -	+ 1/2a
41.1	Bars.korst	- -	- -	- -	- -	1/2b -
42.2	Maasd.kern	+ 1/2a	+ +	+ +	+ +	+ 1/2a
43.2	Maasd.kern	- +	- -	+ -	+ +	1/2a -
44.2	Maasd.kern	- -	+ -	+ +	+ 1/2a	+ 1/2a
45.1	Maasd.korst	- -	+ -	1/2a +	+ -	- 1/2a
46.1	Maasd.korst	- -	- -	- -	1/2a -	- -

¹ De vermelde serotypes zijn van *L. monocytogenes*

² Dit monster is slechts 2 maanden afgestreken.

- : negatief

+: positief

Er blijken slechts 5 monsters bij alle variaties positief te zijn.

Onafhankelijk van het isolatiemedium worden er 12 monsters bij methode E (24 uur primaire selectieve ophoping gevolgd door 3 maanden koude ophoping) extra positief bevonden t.o.v. de methoden A, C en D; dit is statistisch significant (tekentoets; $P < 0,05$). Ook levert methode E t.o.v. methode B meer positieve *L. monocytogenes* resultaten op.

3.4 Resultaten van de isolatiemediën van de koude ophopingstechniek en de gemodificeerde IDF-methode.

Bij de gemodificeerde IDF-methode is afgestreken op TNSA en MMA, terwijl bij de koude ophopingstechniek is afgestreken op TSAG en MMA.

Zie tabel 2 en 3. Bij de gemodificeerde IDF-methode blijkt geen significant verschil op te treden in de resultaten verkregen met TNSA en MMA en bij de koude ophopingstechniek blijkt geen significant verschil op te treden in de resultaten verkregen met MMA en TSAG (Tekentoets; $P > 0,05$).

3.5 Resultaten RIKILT 1 methode

In tabel 4 zijn de resultaten weergegeven van RIKILT 1-methode.

Tabel 4 Aantal positieve monsters gevonden met RIKILT 1 methode

Methode A			Methode B			Methode C		
LPM	TNSA	PALCAM	LPM	TNSA	PALCAM	LPM	TNSA	PALCAM
2	2	1	1	3	1	3	3	1
	3			3			4	

Van het totale aantal monsters van 103 zijn slechts 5 monsters met minimaal 1 variant van RIKILT 1 methode positief; er kon geen statistisch significant verschil tussen de media en methoden worden aangetoond (tekentoets- $P > 0,05$).

Het aantal positieve monsters is te klein om een definitieve uitspraak te doen over de diverse variabelen.

3.6 Resultaten RIKILT 2 methode

In tabel 5 zijn de resultaten weergegeven van RIKILT 2-methode

Tabel 5 Aantal positieve monsters gevonden met RIKILT 2 methode

Methode A			Methode B			Methode C		
LPM	TNSA	OXFORD	LPM	TNSA	OXFORD	LPM	TNSA	OXFORD
0	0	1	0	1	3	0	0	1
	1			3			1	

Van het totaal aantal onderzochte monsters van 76 blijken slechts 4 monsters positief te zijn. Het aantal positieve monsters is ook hier te klein om een definitieve uitspraak te doen over de onderzochte variabelen.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Uit het onderzoek is duidelijk gebleken dat de diverse ophopingstechnieken en isolatiemedia verschillende resultaten kunnen opleveren.

Uit statistische toetsing van de resultaten kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Het aantal monsters wat positief is bevonden met de gemodificeerde IDF-methode (28 monsters) is niet significant hoger dan het aantal monsters wat met de koude ophopingstechniek positief wordt bevonden (20 monsters). Bij de Barsella kazen lijkt het aantal gevonden positieve monsters met de gemodificeerde IDF methode hoger te zijn dan met de koude ophopingstechniek (Tekentoets; $P=0.07$).
- Het afstrijken bij de koude ophopingsmethode levert duidelijk meer positieve isolaties op indien eerst een secundaire selectieve ophoping wordt toegepast alvorens wordt afgestreken.
- Bij de gemodificeerde IDF-methode wordt, ten opzichte van de overige varianten een statistisch significant hoger aantal isolaties gevonden bij de variant waarbij na 24 uur primaire ophoping 3 maanden koude ophoping plaats vindt.

Uit het aantal monsters wat onderzocht is met RIKILT 1 en RIKILT 2 methode bleek dat het aantal positieve monsters te klein was om een uitspraak te doen over de verschillen in resultaten tussen de 3 varianten die in elke methode zijn toegepast. Indien dit wenselijk is, zal verder onderzoek nodig zijn op dit punt.

LITERATUUR

- Beckers, H.J., Soentoro, P.S.S. and Delfgauw-Van Asch, E.H.M. 1987. The occurrence of *L. monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. International Journal of Food Microbiology, 4, pag. 249-256.
- Beumer, R.R. 1988. *L. monocytogenes*, een nieuwe voedselvergiftiger, Effi symposium, pag. 30.
- Beumer, R.R., Schenk, A.B.M. en F.M. Rombouts. 1990. Het voorkomen van *L. monocytogenes* in het milieu en in levensmiddelen. De Ware(n)-Chemicus, 20, pag. 83-90.
- Bracket, R.E. 1988. Presence and persistence of *L. monocytogenes* in food and water. Food Technology, 42, pag. 162-164.
- ISO/CD 10560. Milk and Milk products - Detection and enumeration of *L. monocytogenes*. International organization for standardization, Genève.
- Mc Clain & W.H. Lee. 1987. Isolation and identification of *L. monocytogenes* from meat. USDA/FSIS/Microbiology Division.
- Northolt, M. 1988. *L. monocytogenes* in melk en zuivelprodukten. Voedingsmiddelentechnologie, 5, pag. 19-21.
- Van Netten, P., Perales, J., Van de Moosdijk, A., Curtis, G.D.W. & Mossel, D.A.A. 1989. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 8, pag. 299-316.

25 g monstermateriaal in 225 ml primair selectief ophopingsmedium

24 uur 30°C

Methode A, B, C, D en E

* Methode A: afstrijken op MMA en TNSA

* Methode B: 0.1 ml in 10 ml secundair selectief ophopingsmedium

24 uur 30°C

afstrijken op MMA en TNSA

Methode C: incubatie 24 uur 30°C

afstrijken op MMA en TNSA

* Methode D: incubatie 6 dagen 30°C

afstrijken op MMA en TNSA

Methode E: incubatie 3 maanden 4°C

1 x per maand afstrijken op MMA en TNSA

Figuur 1 Gemodificeerde IDF methode

25 g monstermateriaal in 225 ml niet selectief ophopingsmedium



Incubatie 6 maanden bij 4°C, waarbij 1x per maand: Methode A en B

* Methode A: direct afstrijken op MMA en TSAG

* Methode B: 0.1 ml in 10 ml secundair selectief ophopingsmedium



incubatie 24 uur 30°C



afstrijken op MMA en TSAG

Figuur 2 Koude ophopingstechniek

25 g monstermateriaal in 225 ml primair selectief ophopingsmedium
(acriflavineconc. 10 mg/l)

|
Methode A, B en C

* Methode A: incubatie 24 uur bij 30°C

|
0.1 ml in 10 ml secundair selectief ophopingsmedium
(acriflavineconc. 15 mg/l)

|
incubatie 24 uur bij 30°C

|
afstrijken op TNSA, LPM en PALCAM

* Methode B: incubatie 7 dagen bij 30°C

|
0.1 ml in 10 ml secundair selectief ophopingsmedium
(acriflavineconc. 15 mg/l)

|
incubatie 24 uur bij 30°C

|
afstrijken op TNSA, LPM en PALCAM

* Methode C: 10 ml in 90 ml primair selectief ophopingsmedium
(Acriflavineconc. 10 mg/l)

|
incubatie 24 uur bij 30°C

|
0.1 ml in 10 ml secundair selectief ophopingsmedium
(acriflavineconc. 15 mg/l)

|
incubatie 24 uur bij 30 °C.

|
afstrijken op TNSA, LPM en PALCAM

Figuur 3 RIKILT 1 methode

25 g monstermateriaal in 225 ml primair selectief ophopingsmedium
(acriflavineconc. 10 mg/l)

|
Methode A, B en C

* Methode A: incubatie 24 uur bij 30°C

|
0.1 ml in 10 ml secundair selectief ophopingsmedium
(acriflavineconc. 15 mg/l)

|
incubatie 24 uur bij 30°C

|
afstrijken op LPM, TNSA en OXFORD

* Methode B: incubatie 7 dagen bij 30°C

|
0.1 ml in 10 ml secundair selectief ophopingsmedium
(acriflavineconc. 15 mg/l)

|
incubatie 24 uur bij 30°C

|
afstrijken op LPM, TNSA en OXFORD

* Methode C: incubatie 48 uur bij 30°C

|
afstrijken op LPM, TNSA en OXFORD

Figuur 4 RIKILT 2 methode

Concept werkvoorschrift

2e oplage (1988-11-25)

Kaas - Isolatie van *Listeria monocytogenes* volgens RIKILT-methode
Modificatie van IDF voorschrift

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling MICROB (5x)

Afdeling microbiologie

CONCEPT WERKVOORSCHRIFT

2e oplage (1988-11-25)

Modificatie van IDF-voorschrift.

Kaas - Isolatie van *Listeria monocytogenes*

1 Grensreactie

2 Definitie

Onder *Listeria monocytogenes* worden verstaan die micro-organismen die zich na bebroeding in de aangegeven media ontwikkelen tot kolonies op het aangegeven isolatiemedium en die het onder 7 vermelde reaktiepatroon vertonen.

3 Beginsel

Na bebroeding van een afgewogen hoeveelheid monster in een ophopingsmedium wordt op vastgezette tijdstippen afgestreken en bebroed op een selectief isolatiemedium. Specifieke kolonies worden bevestigd door middel van biochemische reacties.

4 Media en reagentia

4.1 Ophopingsmedium-10 (acriflavine-concentratie = 10 mg/l)

4.1.1 Basismedium

Trypticase soya broth (BBL 11768) 30 g

gistextract (Difco 0127-01) 6 g

gedemineraliseerd water 1000 ml

Los de ingredienten onder verwarming tot 100°C in het water op. Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $7,3 \pm 0,1$ bedraagt. Vul af in flessen van 500 ml in hoeveelheden van 225 ml. Steriliseer gedurende 15 min bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1.2 Supplement 1

Acriflavine-HCl (Sigma A-8251)	50 mg
gedemineraliseerd water	50 ml

Los acriflavine-HCl op in water en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.1.3 Supplement 2

Naladixinezuur (Sigma no. N-8878)	40 mg
0,05 N NaOH	10 ml

Los de naladixinezuur op in NaOH en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.1.4 Supplement 3

Cycloheximide (SigmaC-6255)	50 mg
ethanol	4 ml
gedemineraliseerd water	6 ml

Los de cycloheximide op in een mengsel van ethanol en water.

Bereiding de oplossing minimaal 1 dag voor gebruik.

Sterilisatie is niet nodig.

4.1.5 Uiteindelijke bereiding

Het basismedium (4.1.1) en de supplementen (4.1.2, 4.1.3 en 4.1.4) dienen bewaard te worden in het donker bij 0-4°C. De supplementen dienen niet langer bewaard te worden dan 1 week.

Voeg vlak voor gebruik aan 225 ml basismedium (4.1.1.) toe:

antibioticum supplement 1 (4.1.2)	2,5 ml
antibioticum supplement 2 (4.1.3)	2,5 ml
antibioticum supplement 3 (4.1.4)	2,5 ml

4.2 Ophopingsmedium-15 (acriflavine-concentratie = 15 mg/l)

4.2.1 Basismedium

Trypticase soya broth (BBL 11768)	30 g
gistextract (Difco 0127-01)	6 g
gedemineraliseerd water	1000 ml

Los de ingredienten onder verwarming tot 100°C in het water op. Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $7,3 \pm 0,1$ bedraagt. Vul af in flessen van 500 ml in hoeveelheden van 225 ml. Steriliseer gedurende 15 min bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.2 Supplement 1

Acriflavine-HCl (Sigma A-8251)	15 mg
gedemineraliseerd water	10 ml

Los acriflavine-HCl op in water en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.2.3 Supplement 2

Naladixinezuur (Sigma no. N-8878)	40 mg
0,05 N NaOH	10 ml

Los de naladixinezuur op in NaOH en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.2.4 Supplement 3

Cycloheximide (SigmaC-6255)	50 mg
ethanol	4 ml
gedemineraliseerd water	6 ml

Los de cycloheximide op in een mengsel van ethanol en water.

Bereid de oplossing minimaal 1 dag voor gebruik.

Sterilisatie is niet nodig.

4.2.5 Uiteindelijke bereiding

Het basismedium (4.2.1) en de supplementen (4.2.2, 4.2.3 en 4.2.4) dienen bewaard te worden in het donker bij 0-4°C. De supplementen dienen niet langer bewaard te worden dan 1 week.

Voeg vlak voor gebruik aan 225 ml basismedium (4.2.1.) toe:

- antibioticum supplement 1 (4.1.2) 2,5 ml
- antibioticum supplement 2 (4.1.3) 2,5 ml
- antibioticum supplement 3 (4.1.4) 2,5 ml

4.3 Selectief isolatiemedium (gemodificeerde Mc Bride Agar MMA)

4.3.1 Basismedium

Phenylethanolagar (Difco 0504-02-9)	35,5 g
glycine anhydride (Sigma G-7251)	10,0 gr
lithiumchloride (Sigma L-0505)	0,5 g
gedemineraliseerd water	1000 ml

Los de ingredienten onder verwarming tot 100°C op in het water. Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $7.3 \pm 0,2$ bedraagt. Steriliseer gedurende 15 minuten bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

N.B. Het basismedium nooit opsmelten, maar na oplossing van de ingredienten, autoclaveren en het toevoegen van supplementen direct gieten.

4.3.2 Antibioticum supplement

Cycloheximide (Sigma C-6255)	200 mg
ethanol	4 ml
water	6 ml

Los cycloheximide op in een mengsel van ethanol en water.

Bereid de oplossing minimaal 1 dag voor gebruik.

Sterilisatie is niet nodig.

4.3.3 Uiteindelijke bereiding

Voeg 1 ml antibioticum supplement (4.3.2) toe aan 100 ml basismedium en meng.

Giet ca. 10 ml. medium (niet meer!) in petrischalen (5.2) en laat stollen. De platen kunnen maximaal 1 week worden bewaard bij 0-4°C.

4.4 Selectief isolatiemedium (TNSA-agar)

4.4.1 Basismedium

Brain Heart Infusion Broth (Difco 0037-01-6)	37 g
Na_2HPO_4 (anhydrous)	1 g
Bacto-agar	20 g
gedemineraliseerd water	1000 ml

Los de ingredienten onder verwarming tot 100°C in het water op. Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $7,2 \pm 0,1$ bedraagt. Steriliseer gedurende 20 min bij $115 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.4.2 Supplement 1

Acriflavine-HCl (Sigma A-8251)	50 mg
gedemineraliseerd water	50 ml

Los acriflavine-HCl op in water en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.4.3 Supplement 2

Naladixinezuur (Sigma N-8878)	100 mg
1 N NaOH	0,5 ml
gedemineraliseerd water	50 ml

Los de naladixinezuur op en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.4.4 Uiteindelijke bereiding

Het basismedium (4.4.1) en de supplementen (4.4.2 en 4.4.3) dienen bewaard te worden in het donker bij 0-4°C. De supplementen dienen niet langer bewaard te worden dan 1 week.

Voeg vlak voor gebruik aan 250 ml basismedium (4.4.1) toe:

antibioticum supplement 1 (4.4.2)	2 ml
antibioticum supplement 2 (4.4.3)	5 ml
paardenserum (Biotrading BTPS)	12,5 ml

Indien de voedingsbodem ver voor het gebruik wordt gegoten, kan het gegoten en gestolde medium max 1 week worden bewaard bij 0-4°C.

4.5 Isolatiemedium (Trypticase soya agar* + 0.6% gistextract)

Trypticase soya broth (BBL 11768)	30 g
gistextract (Difco 0127-01)	6 g
agar	12-18 g
gedemineraliseerd water	1000 ml

Los de ingrediënten onder verwarming tot 100°C op in het water. Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $7,3 \pm 0,1$ bedraagt. Steriliseer gedurende 15 min bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Giet ca. 10 ml medium (niet meer!) in petrischalen (5.2) en laat stollen.

De platen kunnen maximaal 1 maand in het donker worden bewaard bij 0-4°C.

* Ook kant en klaar in de handel als Trypticase soya agar (BBL 11043)

4.6 2%-schapenerythrocytensuspensie

4.6.1 PBS-buffer (pH=7,4)

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44 g
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
gedemineraliseerd water	1000 ml

Los de ingredienten op onder verwarming tot 100°C in het water. Steriliseer gedurende 15 min bij 121 ± 1°C.

4.6.2 Uiteindelijke bereiding

Steriel gedefibrineerd schapenbloed (Biotrading BT-S100) wordt afgecentrifugeerd gedurende 10 minuten (3000 omwentelingen/ minuut); het bovenstaande serum wordt afgepippeteerd en het resterende volume erythrocyten wordt aangevuld met PBS-buffer (4.6.1) tot het oorspronkelijke volume en gemengd. De gehele procedure wordt nog 2 maal herhaald. Na de derde centrifugatie-stap wordt de totale hoeveelheid erythrocyten gesuspendeerd in een zodanige hoeveelheid PBS-buffer (4.6.1) dat een 2%-oplossing van schapenerythrocyten wordt verkregen. Deze erythrocytensuspensie kan maximaal 1 week worden bewaard bij 0-4°C. Vul deze oplossing af in durhambuisjes (5.15) in hoeveelheden van 0.5 ml.

4.6.3 Brain Heart Infusion Broth (Difco 0037-01-6)

Bereid volgens instructies van de fabrikant en vul af in hoeveelheden van 5 ml in cultuurbuizen (5.1).

4.7 Koolhydraat fermentatie bouillon

4.7.1 Basismedium

Proteose pepton (Oxoid L85)	10 g
vleesextract (Merck 3979)	1 g
natriumchloride	5 g
broomkresolpurper (Merck 3025)	0,02 g
gedemineraliseerd water	1000 ml

Los de ingrediënten op in het water onder verwarming tot 100°C. Vul af in hoeveelheden van 9 ml in cultuurbuizen (5.1) met Durhambuisjes. Steriliseer gedurende 15 min bij 121 $\pm$ 1°C.

4.7.2 Rhamnose-oplossing

Los op 5 g L(+)-rhamnose (Merck 4736) in 100 ml gedemineraliseerd water en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.7.3 Xylose-oplossing

Los op 5 g D(+)-xylose (Merck 8692) in 100 ml gedemineraliseerd water en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.7.4 Salicyne-oplossing

Los op 5 g D-salicyne (Serva 34600) in 100 ml gedemineraliseerd water en steriliseer de oplossing door middel van filtratie.

4.7.5 Uiteindelijke bereiding

Voeg op aseptische wijze aan 9 ml basismedium (4.7.1) toe 1 ml rhamnose-oplossing (4.7.2), resp. 1 ml xylose-oplossing (4.7.3) resp. 1 ml salicyne-oplossing (4.7.4).

4.8 Beweeglijkheidsmedium*

Caseïnepepton	20.0 g
vleespepton	6.1 g
agar	3.5 g
gedemineraliseerd water	1000 ml

Los de ingredienten op in het water onder verwarming tot 100°C.

Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie 7,3 $\pm$ 0,1 bedraagt.

Vul af in cultuurbuizen (5.1) in hoeveelheden van ca. 6 ml en steriliseer gedurende 15 min bij 121 $\pm$ 1°C.

*Dit medium is kant en klaar in de handel als SIM medium (Merck 5470), waarbij ammonium ijzercitraat en natriumthiosulfaat is toegevoegd. Dit kant en klare medium kan ook worden gebruikt.

4.9 Katalase reagens

Bereid, onmiddellijk voor gebruik, een oplossing van de volgende samenstelling:

Waterstofperoxyde (H_2O_2) 30% 10 ml

gedemineraliseerd water 90 ml

4.10 Kaliumhydroxyde oplossing

Kaliumhydroxyde (KOH) 3 g

gedemineraliseerd water 100 ml

Los de kaliumhydroxyde op in het water.

4.11 Anaerocult C (Merck 16275)

5 Apparatuur en glaswerk

5.1 Cultuurbuizen 18x150 mm

5.2 Petrischalen met diameter 9 cm (gammagesteriliseerd)

5.3 Kolfjes voor voedingsmedia e.d.

5.4 Broedstoven voor het kweken van de cultures bij $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $30 \pm 1^\circ\text{C}$, $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.5 Anaerobe jar (zonder katalysator)

5.6 Stereozoom microscoop met donkerveldinrichting

5.7 Toestellen voor het steriliseren van glaswerk en voedingsbodems op de voorgeschreven wijze.

5.8 Filtratie-apparatuur

5.9 Stomacher

5.10 Platina entnaalden

5.11 pH meter

5.12 Koelkast (temperatuur 0 - 5°C), voor het bewaren van media ed.

5.13 Balansen (bovenweger en analytische balans)

5.14 Pipetten

5.15 Durhambuisjes

5.16 Fasecontrastmicroscop

6 Werkwijze

6.1 Monstername

Indien de bemonsterde zachte kaas toch korst bevat (Kernhem, Barselle) verwijder dan eerst de geplastificeerde buitenlaag. Flambeer vervolgens de buitenkant af rondom de plaats van monstername en boor met een kaasboor vanaf de buitenkant van de kaas naar binnen in de richting van de kaasdiameter. Breng het monster over in steriel monstermateriaal en neem zoveel korst en kaas dat het totale monster 20% korst en 80% kaas bevat.

Indien de bemonsterde zachte kaas geen korst bevat (Brie), neem dan op verschillende plaatsen een aantal sectoren uit de kaas tot het totale gewicht 25 gram is.

6.2 Ophoping

Breng 25 g monstermateriaal over in een steriele stomacherzak en voeg hieraan toe 225 ml van het ophopingsmedium-10 (4.1), wat tevoren is opgewarmd tot 45°C. Meng gedurende 2 minuten met de stomacher.

Incubeer in een broedstoof bij 30°C. Controleer periodiek de pH van het ophopingsmedium en stel deze, indien nodig, bij tot pH-waarde 6,8.

6.3 Tussenophoping

Breng na 24 uur incubatie 0,1 ml vanuit het ophopingsmedium over in 10 ml ophopingsmedium-15 (4.2) en incubeer opnieuw gedurende 18-24 uur bij 30°C.

6.4 Isolatie

Strijk na 24 uur incubatie van het tussenophopingsmedium (6.3) een ontoegankelijk deel van het medium af op MMA (4.2) en TNSA (4.3). Incubeer de platen met de bodem naar boven gedurende 48 uur bij 37°C in microaerofiel milieu (zie 4.11 en 5.5). Beoordeel de geïncubeerde platen met MMA-isolatiemedium na 48 uur en de geïncubeerde platen met TNSA-isolatiemedium na 24 uur en na 48 uur. Verdachte kolonies hebben een blauw oppervlak, indien een speciale belichtingstechniek wordt toegepast (zie 5.6). Strijk tenminste 5 verdachte kolonies vanaf de platen met selectief isolatiemedium af op isolatiemedium 4.5, op een zodanige wijze dat losliggende kolonies worden verkregen. Incubeer de platen gedurende 24 uur bij 37°C.

Beoordeel na de incubatie de platen op het voorkomen van kolonies met een blauw oppervlak. Indien deze aanwezig zijn, worden ze verder bevestigd volgens 6.6, indien deze niet aanwezig zijn, worden opnieuw kolonies vanaf de platen met selectief isolatiemedium afgestreken op isolatiemedium 4.5.

6.5 Identificatie

Iedere identificatiereactie die wordt uitgevoerd moet ook worden uitgevoerd m.b.v. positieve (*Listeria monocytogenes*) controlestammen en negatieve controlestammen.

6.5.1 Katalase

Neem bacteriemateriaal van een verdachte kolonie en suspendeer dit in een druppel met 3% H₂O₂-oplossing op een voorwerpglasje. *Listeria monocytogenes* is katalase positief (vorming van gasbelletjes).

6.5.2 Morfologie en gram-eigenschappen.

Neem bacteriemateriaal van een verdachte kolonie en maak hiervan een waterpreparaat en bekijk dit met een fasecontrastmicroscoop (5.16). *Listeria monocytogenes* is een kort beweeglijk staafje. Neem bovendien bacteriemateriaal van een verdachte kolonie en suspendeer dit in een druppel 3% KOH-oplossing (4.10) op een vetvrij objectglas. Een stam is positief met de KOH test (en dus gramnegatief) als er slijmvorming optreedt en als het mogelijk is om met een ontoegankelijk deel draden te trekken vanaf het objectglas. Bacterien die moeilijk suspenderen worden eerst in een druppel fysiologische zoutoplossing gebracht, waarna de druppel KOH erdoorheen wordt gemengd. *Listeria monocytogenes* is gram-positief.

6.5.3 b-Haemolyse

Ent bacteriemateriaal van een verdachte kolonie in 5 ml Brain Heart Infusion Broth (4.6.3) en incubeer gedurende 24-48 uur bij 37°C. Wanneer de cultuur volgroeid is, wordt deze gehomogeniseerd op een vortex-mixer. Voeg 0.5 ml van de volgroeide cultuur toe aan 0.5 ml 2%-schapenerythrocytenoplossing (4.6).

Incubeer gedurende 1-2 uur bij kamertemperatuur. Een homogeen rode vloeistof wijst op de aanwezigheid van haemolysine (geteste stam is b-haemolytisch); een doorzichtige vloeistof met onderin een kluitje erythrocyten wijst op afwezigheid van haemolysine (geteste stam is niet b-haemolytisch).

Indien de haemolysereactie niet exact overeenkomt met één van deze beide mogelijkheden, is meestal een mengsel van stammen aanwezig. Strijk dan opnieuw de geente cultuur van BHI rein op selectief isolatiemedium en herhaal de haemolysetest met één kolonie. *Listeria monocytogenes* is b-haemolytisch.

6.5.4 Rhamnose-splitsing

Ent bacteriemateriaal van een verdachte kolonie in rhamnose-medium (4.7.2) Incubeer gedurende 7 dagen bij 37°C.

Een positieve reactie (gas en/of zuurvorming (geelkleuring)) treedt meestal al op na 24-48 uur. *Listeria monocytogenes* is rhamnose positief

6.5.5 Xylose-splitsing

Ent bacteriemateriaal van een verdachte kolonie in xylose-medium(4.7.3) en incubeer gedurende 7 dagen bij 37°C. Een positieve reactie (gas en/of zuurvorming (geelkleuring)) treedt meestal al op na 24-48 uur.

Listeria monocytogenes is xylose negatief.

6.5.6 Salicyne-splitsing

Ent bacteriemateriaal van een verdachte kolonie in salicyne-medium (4.7.4) en incubeer gedurende 7 dagen bij 37°C. Een positieve reactie (gas en/of zuurvorming (geelkleuring)) treedt meestal al op na 24-48 uur.

Listeria monocytogenes is salicyne positief.

6.5.7 Beweeglijkheidstest

Ent bacteriemateriaal van een verdachte kolonie d.m.v. een steekenting in beweeglijkheidsmedium (4.8) en incubeer gedurende maximaal 7 dagen bij 25°C. Beoordeel dagelijks. *Listeria monocytogenes* is beweeglijk en geeft een typisch parapluvormig groeipatroon.

7 Interpretatie

Listeria monocytogenes wordt aantoonbaar geacht indien bacterien kunnen worden geïsoleerd die voldoen aan het volgende reactiepatroon:

katalase	+
gram	+
b-hemolyse	+
rhamnose	+
xylose	—
salicyne	+
beweeglijkheid	+

Stammen die op het RIKILT geïdentificeerd worden als *Listeria monocytogenes* worden opgestuurd naar het *Listeria* referentiecentrum (RIVM) voor definitieve typering (serotypering).

Verantwoordelijk: Ir. H. Stegeman

Samensteller: ing. A.E.M. Vermunt

