

INNKJØRINGSRAPPORT

**Analyse av *Listeria monocytogenes* i marin matriks med
metode: AM41x.01.45**

**Eurofins Food & Feed Testing Norway AS
Avdeling Moss, TEST001**



**Skrevet av: Hanne Stolba
Dato: 17.01.2019**

Innhold

1	FORMÅL	2
2	PRINSIPP FOR METODE.....	2
3	PRAKTISK INNKJØRING	3
4	RESULTATER.....	4
5	OPPSUMMERING	5
6	USIKKERHETSBIIDRAG	6

1 Formål

Formålet med denne innkjøringen er å teste om ulike marine matrikser fungerer på *Listeria monocytogenes* metode AM41x.01.45. Vi ønsker å finne ut om det er noe i de ulike matriksene som kan inhibere vekst under oppformering eller om det er komponenter i prøvematerialet som kan inhibere PCR reaksjon. Vi ønsker også å se om prøver med positivt utslag på PCR er mulig å dyrke på selektiv agar. Innkjøringen utføres etter ønske fra en fiskeforedlingskunde som vil finne ut hvordan de får *Listeria monocytogenes* inn i produksjonslokale.

Metoden går ut på at prøvematerialet først blir oppformert i Actero *Listeria* enrichment media (ALEM), etter oppformering skal prøvene kjøres på BioRads CFX PCR instrument med BACGene *Listeria monocytogenes* real-time PCR kit fra Eurofins GeneScan. Alle prøvene blir deretter strøket på Rapid *L.mono* skåler (RLM) for å kontrollere at PCR resultatene stemmer overens med dyrkningsresultatene. Metoden er godkjent av AFNOR med sertifikat nummer EGS 38/03-01/17. ALEM oppformeringsbuljong har AOAC sertifisering for deteksjon av *L. monocytogenes* og *Listeria* spp. (Actero™ *Listeria* Culture Method, AOAC-RI # 111201).

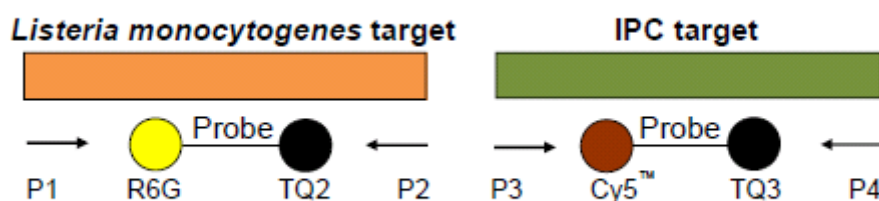
Innkjøringen vil vise om *Listeria monocytogenes* metode AM41x.01.45 fungerer tilfredsstillende på disse matriksene. Analyser som inngår i innkjøringen er podede prøver. Arbeidet er utført ved Eurofins avdeling Moss.

2 Prinsipp for metode

Prøvene oppformes i ALEM, som er ett selektivt medie for *Listeria* spp. Prøvene inkuberes ved 37±1°C i 18-24 timer før lysering.

BACGene *Listeria monocytogenes* PCRkit brukes til deteksjon av *L. monocytogenes* i alle typer næringsmidler og miljøprøver. Ved bruk av spesifikke primere (P1 og P2) for *L. monocytogenes* vil DNA bli amplifisert under PCR reaksjonen. Disse primerne binder seg ikke til nært beslektede arter fra *Bacillaceae* familien eller andre *Listeria* species. De amplifiserte fragmentene detekteres via en R6G fluorescensmerket hybridiseringsprobe som også er spesifikk for *L. monocytogenes*. Hybridiseringsproben gir fra seg et lyssignal kun dersom DNA amplifiseres da proben inneholder en Tide Quencher (TQ2) som undertrykker lyssignalet i proben frem til den binder seg til mål DNA, da vil proben brytes ned av polymerasen og lyssignal frigjøres. Hvis det ikke er mål DNA til stede vil ikke proben binde seg og det blir ikke sendt ut lyssignal. En intern positiv kontroll (IPC) detekteres samtidig via

en tilsvarende Cy5-merket probe. Amplifisering av den interne positive kontrollen indikerer en funksjonell PCR reaksjon og er spesielt viktig for å fastslå at *L. monocytogenes* ikke er tilstede i prøven dersom den ikke er amplifisert. Se illustrasjon figur 1.



Figur 1: Illustrasjon av real-time PCR reaksjon. P er spesifikke primere, TQ er en quencher som undertrykker lyssignalet R6G eller Cy5, IPC er intern positiv kontroll, probene er spesifikk for enten *L. monocytogenes* eller intern positiv kontroll.

3 Praktisk innkjøring

De marine matriksene som testes i denne innkjøringen er blåskjell, fiskefôr, groeprøver og sjøvann. Tre prøver av hver prøvetype ble podet med ca. 50 CFU/25 gram/500ml og 5 CFU/25 gram/500ml. Upodet prøver ble også analysert. Dette blir til sammen 4 ulike matriks, og til sammen 28 prøver + en negativkontroll.

Podingen av prøvene foregikk ved at *L. monocytogenes* stammen først ble oppformert over natt ved 37° i BHI (Brain Heart Infusion broth), deretter kvantifisert ved å så ut ulike fortyninger av bakterie suspensjonen på blodskåler. Stammen ble oppbevart over natt i en blanding av is og vann slik at temperaturen holdes så lav som mulig for å hindre at *L. monocytogenes* deler seg ytterligere. Det å senke temperaturen til ca. 0°C antas å stresse bakteriene noe, dette vil være positivt for gjennomføring av forsøket at bakteriene ikke har hatt det optimalt frem til kontaminering, siden det gjenspeiler mer hvordan bakterien har det under naturlige forhold. Blåskjell, fiskefôr og groeprøver ble veid inn, podet med teoretisk antall CFU og fortynt 1:10 i ALEM oppformeringsbuljong, forvarmet til 37 °C. Ved analyse av vannprøvene ble det tilsatt teoretisk antall CFU direkte i vannflasken deretter ble 500 ml filtrert gjennom ett filter med porestørrelse 45 µm. Baktericellene vil legge seg oppå filteret. Filteret ble overført til en steril prøvepose tilsatt 250 ml forvarmet oppformeringsbuljong.

Samtidig kvantifiseres blandingen påny for å få et så nøyaktig antall CFU som mulig, av den mengden *L. monocytogenes* prøvene er podet med. Resultatene for kvantifiseringen er

presentert i tabell 1. Prøvene ble deretter inkubert i ALEM i 18-24 timer ved 37 °C. Et alikvot av ALEM buljongen med oppformert *L. monocytogenes* ble lysert ved hjelp av enzymer for at bakteriene skal friggi DNAet. Lysatet ble så analysert med BACGene *Listeria monocytogenes* PCR. For å kontrollere resultatet etter PCR ble 0,1 ml av ALEM oppformeringsbuljongegne strøket på Rapid'L.mono, et selektiv agar for *L. monocytogenes*.

Tabell 1: Antall CFU etter poding av prøver

Teoretisk antall CFU	Avlest konsentrasjon fra BHI løsningen			Gjennomsnitt avlest konsentrasjon
5 CFU	6 CFU	6 CFU	3 CFU	5 CFU
50 CFU	53 CFU	66 CFU	74 CFU	64 CFU

4 Resultater

Analyse av podede prøver, 27. April 2018. Instrument ID F1058.

Alle prøver podet med *L. monocytogenes* ga positivt resultat på PCR. De upodede prøvene (blank) ble negative. Videre konfirmasjon av prøver på selektiv skål bekreftet resultatene fra PCR. Tabell 2 viser resultatene fra ulikeprøvematriks for PCR og utstryk på RLM-skål.

Tabell 2: Resultater PCR og konfirmasjon på RLM.

Prøve	Teoretisk antall CFU	Resultat <i>L. mono</i>	
		PCR	RLM
Sjøvann blank	0	-	-
Sjøvann	5	+	+
Sjøvann	5	+	+
Sjøvann	5	+	+
Sjøvann	50	+	+
Sjøvann	50	+	+
Sjøvann	50	+	+
Fiskefôr blank	0	-	-
Fiskefôr	5	+	+
Fiskefôr	5	+	+
Fiskefôr	5	+	+

Fiskefôr	50	+	+
Fiskefôr	50	+	+
Fiskefôr	50	+	+
Blåskjell blank	0	-	-
Blåskjell	5	+	+
Blåskjell	5	+	+
Blåskjell	5	+	+
Blåskjell	50	+	+
Blåskjell	50	+	+
Blåskjell	50	+	+
Groeprøver blank	0	-	-
Groeprøver	5	+	+
Groeprøver	5	+	+
Groeprøver	5	+	+
Groeprøver	50	+	+
Groeprøver	50	+	+
Groeprøver	50	+	+

5 Oppsummering

Alle de spikede prøvene gir gode resultater på PCR. Ingen prøver viste tegn til inhibering i PCR reaksjonen. Resultatene for PCR sammenfaller med dyrkning fra Actero Listeria Enrichment Media oppformeringsbuljong videre til Rapid' L.mono agar. Sjekk av nedre grenser for deteksjon i prøver som er podet med kun 5 CFU viser tilfredsstillende resultater. Alle blank prøvene gir negative resultater som indikerer at de marine matriksene som ble sendt ikke allerede inneholdt *L. monocytogenes* og at innkjøringen ble utført uten krysskontaminering.

Utfra disse resultatene ser det ikke ut som matriksene som er testet er noen utfordring for *Listeria monocytogenes* metode AM41x.01.45 forbeholdt at prøvemengde og analyse av prøvene utføres som i innkjøringsrapporten. Vi anser utfra denne rapporten at analyse av marine matriks med metode AM41x.01.45 *BACGene* for verifisert til bruk i vårt laboratorie.

6 Usikkerhetsbidrag

De viktigste usikkerhetsbidragene er presentert i tabellen under (Tabell 3). Teknisk begrunnelse er beskrevet etter tabellen.

Tabell 3: Usikkerhetsbidrag ved analyse av *L. monocytogenes* med metode AM41x.01.45

Analysetrinn	Kvalitativ metode – <i>Listeria monocytogenes</i> PCR
Lagring	+
Analytiker	++
Prøveuttak	++
DNA ekstraksjon	+
PCR kjøring	+
Carry-over	+
Volum/fortynning	+
Avlesing	+
Laboratoriemiljøet	+

Trinnene som er tatt med i vurdering av usikkerhetsbidrag er kun trinn på laboratoriet. Prøveuttak, lagring og transport før ankomst til laboratoriet er ikke vurdert her.

Lagring av prøver på laboratoriet – tid og temperatur. Prøver til *L. monocytogenes* skal (transporteres og) lagres kaldt før analyse. Eurofins har kontroll på lagringstemperatur og tid. Usikkerhetskomponentene bør ikke være en signifikant faktor.

Analytiker – Ulikheter i metodegjennomførelsen kan bidra til usikkerhet i det endelige resultatet. Selv om laboratoriet har god kontroll over de enkelte trinnene i metodene, vil det i praksis være variasjoner i den enkelte analytikers måte å utføre de ulike trinnene i analysen på. Måleusikkerheten knyttet til den enkelte analytiker kan være av signifikant betydning. God opplæring vil begrense denne usikkerheten, men de individuelle forskjellene vil man ikke kunne fjerne helt.

Prøveuttak – representativt prøveuttak. Man kan ikke regne med at *L. monocytogenes* er jevnt fordelt i prøven og det forventes derfor at man bare delvis kan sikre seg prøver som er representative. Eurofins har arbeidsbeskrivelser for hvordan prøveuttak skal utføres, men usikkerhetskomponentene kan ikke anslås og det kan være en signifikant faktor.

DNA opparbeiding – Prosedyren for DNA opparbeiding er en enkel prosedyre som ikke inneholder noen rensetrinn. Måleusikkerhetskomponentene anslås å være små.

PCR kjøring – feil temperatur og/eller tid. Rutinene er styrt av utstyr og programvarer fra produsenter som har validert metoden. Måleusikkerhets-komponentene anses til å være små. Positiv internkontroll i alle prøver bekrefter at reagenser fungerer tilfredsstillende og at analyseforholdene er korrekte.

Carry-over - En prøve med stort positivt signal kan smitte over på nabobrønnen under åpning og lukking av lokk på lysisrør eller PCR-rør. Dette må en være oppmerksom på dersom flere positive prøver skulle oppstå som naboer. Slike tilfeller skal imidlertid bli avdekket ved konfirmasjon av prøven på dyrkingsmetodikk eller ved retesting av oppformeringsbuljongen.

Volum/fortynning – Uttak av ulike volum med automatpipetter til DNA rensing, PCR og evt. fortynning anses ikke som en signifikant usikkerhetsfaktor da pipettene er underlagt regelmessig kontroll.

Avlesning – Tolkning av resultatene utføres av et validert makroaktivert Excel ark. Alle rådatakurver skal sjekkes opp mot resultatet som evalueringsarket gir. Kurver for internkontroll og kurve for *L. monocytogenes* skal gjennomgås. Dette anses ikke som en signifikant usikkerhetsfaktor for analysen.

Laboratoriemiljøet – luft kvalitet, utstyr. Laboratoriemiljøet er underlagt kvalitetskontroll. Måleusikkerhetskomponentene anslås å være små.