

Oxford-Selektivnährboden

Zur Isolierung von *Listeria monocytogenes* aus klinischem Untersuchungsmaterial und Lebensmitteln. Der Nährboden entspricht der DIN EN ISO 11290-1¹ und dem § 35 LMBG².

Listeria-Agar-Basis (Oxford)

Art.-Nr. CM 856

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Columbia-Agar-Basis	39,0
Äsculin	1,0
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,5
Lithiumchlorid	15,0
pH 7,0 ± 0,2	

Listeria-Selektiv-Supplement (Oxford)

Art.-Nr. SR 140

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml)	
Cycloheximid	200,0 mg
Colistin	10,0 mg
Acriflavin	2,5 mg
Cefotetan	1,0 mg
Fosfomycin	5,0 mg

Zubereitung

27,75 g Listeria-Agar-Basis (Oxford) in 500 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Den Inhalt eines Röhrchens Listeria-Selektiv-Supplement (Oxford) aseptisch in 5 ml Ethanol/sterilem Aqua dest. (1:1) lösen. Den gelösten Inhalt zu 500 ml, auf 50°C abgekühlter Listeria-Agar-Basis (Oxford) geben, gut mischen und Platten gießen.

Listeria-Selektiv-Supplement (Oxford, mod.)

Art.-Nr. SR 206

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Amphotericin B	5,0 mg
Colistin	10,0 mg
Acriflavin	2,5 mg
Cefotetan	1,0 mg
Fosfomycin	5,0 mg

Zubereitung

Den Inhalt eines Röhrchens Listeria-Selektiv-Supplement (Oxford, mod.), aseptisch in 5 ml 70% Ethanol lösen. Den gelösten Inhalt zu 500 ml auf 50°C abgekühlter Listeria-Agar-Basis (Oxford) geben. Gut mischen und Platten gießen.

Beschreibung

Der Oxford-Selektivnährboden basiert auf der Beschreibung von Curtis et al.⁴ und wird zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus klinischen Untersuchungsmaterial und Lebensmitteln empfohlen.

Der Nährboden nutzt als selektive Substanzen Lithiumchlorid, Acriflavin, Colistin, Cefotetan, Cycloheximid und Fosfomycin sowie das Indikatorsystem Äsculin und Eisen(III)-Ionen zur Isolierung und Differenzierung von *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes hydrolysiert das im Nährboden enthaltene Äsculin; es entstehen schwarze Höfe um die Kolonien, die durch die Bildung schwarzer Eisen-Phenol-Komplexe aus Aglucon entstehen. Gramnegative Bakterien werden vollständig im Wachstum gehemmt, wie auch die meisten unerwünschten grampositiven Bakterien unterdrückt werden. Einige Enterokokken können schwach wachsen und zeigen, meist nach 40 Stunden Bebrütung, eine schwache Äsculin-Reaktion. Manche Staphylokokken können als Äsculin-negative Kolonien wachsen.

Typische Kolonien von *L. monocytogenes* sind so gut wie immer nach 24 Stunden Bebrütung sichtbar. Die Bebrütung sollte für weitere 24 Stunden fortgesetzt werden, um langsam wachsende Stämme nachzuweisen.

Die Verfahren zur Isolierung variieren von Autor zu Autor und Untersuchungsmaterial^{1,2,5,6}. Für jedes Untersuchungsmaterial wurde gezeigt, daß die selektive Anreicherung oder die kalte Anreicherung die Isolierungsrate beträchtlich erhöht⁷⁻⁹. Die Leistungsfähigkeit des Oxford-Selektivnährbodens wurde für verschiedene Lebensmittel durch andere Arbeiten bestätigt^{10,11}. Hierbei wurden die in der Literatur beschriebenen Verfahren und selektiven Anreicherungs-nährböden verwendet¹¹⁻¹⁴.

Kulturverfahren

Fäkales und biologisches Untersuchungsmaterial

Untersuchungsmaterial in 0,1%igem Peptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 9) homogenisieren, wobei ein Teil Untersuchungsmaterial auf neun Teile Peptonwasser kommen.

Direkte Oberflächenbeimpfung

1. 0,1 ml homogenisierte Probe auf Oxford-Selektivnährboden ausstreichen.
2. Platten bis zu 48 Stunden bei 36°C bebrüten.
3. Platten nach 24 und 48 Stunden auf typische Listeria-Kolonien begutachten.

Selektive Anreicherung

1. Die homogenisierte Probe in eine selektive Listeria Anreicherungslösung geben und bis zu sieben Tage bei 30°C bebrüten.
2. Je 0,1 ml der selektiven Anreicherungslösung nach 24 Stunden, 48 Stunden und sieben Tagen auf Listeria-Selektivnährboden (Oxford) ausstreichen.
3. Platten bis zu 48 Stunden bei 36°C bebrüten.
4. Platten nach 24 und 48 Stunden auf typische Listeria-Kolonien begutachten.

Lebensmittel und Umweltmaterial

Die Isolierungsmethoden unterscheiden sich je nach Material, Veröffentlichung und Behörde. Wenn *L. monocytogenes* nur in geringen Koloniezahlen vorkommt, sollte vor der Isolierung und Identifizierung eine Anreicherung erfolgen. Die Auswahl der Methode und der Anreicherung vor dem Ausstreichen auf dem Listeria-Selektivnährboden ist von dem jeweiligen Untersuchungsmaterial abhängig.

1. 0,1 ml der selektiven Anreicherung auf Oxford-Selektivnährboden ausstreichen.
2. Platten bis zu 48 Stunden bei 36°C bebrüten.
3. Platten nach 24 und 48 Stunden auf typische Listeria-Kolonien begutachten.
Verdächtige Kolonien müssen durch biochemische und serologische Tests als *Listeria monocytogenes* bestätigt werden¹⁴.

Koloniemorphologie

Wachstum nach Inkubation bei 30°C nach 48 Stunden

Listeria monocytogenes ATCC 15315

Listeria monocytogenes ATCC 7644

Listeria monocytogenes ATCC 19117

Listeria monocytogenes ATCC 19111

Listeria monocytogenes NCTC 11994

gutes Wachstum, braune Kolonien Ø 0,25 – 1,0 mm mit braun- schwarzem Hof

Staphylococcus aureus ATCC 25923

reduziertes Wachstum, gelbe Kolonien Ø bis 0,5 mm

Escherichia coli ATCC 25922

Acinetobacter baumannii ATCC 19606

Enterococcus faecalis ATCC 29212

kein Wachstum

Unbeimpfte Platten sollen nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C keine Kontaminationen aufweisen.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Supplement: 2-8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Listeria monocytogenes ATCC 19117

Negativkontrolle

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Zusätzliche Hinweise

Gebrauchsfertigen Nährboden dunkel lagern. Acriflavin bildet bei Lichteinwirkung Inhibitoren und kann dann das Wachstum von Listerien hemmen.

Das Listeria-Selektiv-Supplement (Oxford) (OXOID, Art.-Nr. SR 140) enthält eine toxische Konzentration an Cycloheximid; siehe auch 'Allgemeine Richtlinien zur Verwendung von OXOID Trockennährböden'.

Literatur

1. DIN EN ISO 11290-1: „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* - Teil 1: Nachweisverfahren 2. BGA „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG“ L 00.00-3
2. „Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes*. Teil 1: Nachweisverfahren“
3. ISO 10560 "Milk and milk products. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*."
4. Curtis, G.D.W. et al. (1989) Letters in Appl. Microbiol. 8, 95-98.
5. van Netten, P. et al. (1988) Int. J. Food Microbiology, 6, 187-198.
6. Prentice, G.A. und Neaves, P. (1988) Bulletin of the International Dairy Federation Nr. 223.
7. Hayes, P.S. et al. (1986) Appl. Environ. Microbiol. 51, 438-440.
8. Garayzabal, J.F.F. et al. (1986) Can. J. of Microbiol. 32, 149-150.
9. Doyle, M.P., Meske, L.M. und Marth, E.H. (1985) J. Food Prot. 48, 740-742.
10. Crowther, J.S. (1988) Pers. Mitteilung. Unilever Research Laboratory, Colworth House, Sharnbrook, Bedford, England.
11. Neaves, P. und Prentice, G. A. (1988) Pers. Mitteilung. Technical Division, Milk Marketing Board, Thames Ditton, Surrey, Großbritannien.
12. Lovett, J., Francis, D.W. und Hunt, J.M. (1987) J. Food Protect. 50, 188-192.
13. Donnelly, C.W. und Baigent, G.J. (1986) Appl. Environ. Microbiol. 52, 689-695.
14. Hammer, P., Hahn, G. und Heeschen, W., (1988) Deut. Mock-Zeit. 50, 1700-1706.
15. Bortolussi, R., Schleck, W.F. und Albritton, W. L. (1986) "*Listeria monocytogenes*. In: Lenette, E.H. et al. (Hrsg.) "Manual of clinical microbiology". 4th Edn., ASM, Washington, D.C. S. 205-208.