

Listeria Selective Agar (Oxford Formulation)

관련제품

제품번호	제품명	구성
CM0856B	Listeria Selective Agar (Oxford Formulation)	500 gram

사용목적(Use)

선택적 첨가제를 넣어 *Listeria monocytogenes*의 검출을 위한 선택 및 진단 배지.

조성(Typical Formulation)

성분*	gm/litre
Columbia Blood Agar Base	39.0
Aesculin	1.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Lithium chloride	15.0
pH 7.0 ± 0.2 @ 25°C	
*성능표준을 위해 조절될 수 있음	

조제 (Directions)

Listeria Selective Supplement (Oxford Formulation)(SR0140)을 첨가할 경우:

Vial contents (each vial is sufficient for 500ml of medium)	per vial	per litre
Cycloheximide	200mg	400mg
Colistin sulphate	10.0mg	20.0mg
Acriflavine	2.5mg	5.0mg
Cefotetan	1.0mg	2.0mg
Fosfomycin	5.0mg	10.0mg

500ml의 정제수에 27.75g의 CM0856을 현탁하고, 끓여서 완전히 녹인다. 121°C, 15분간 오토클레이브로 멸균한다. 첨가제 SR0140을 해당 제품설명서에 따라 재구성하여 준비한다. 멸균된 배지를 50°C까지 식힌후, 준비된 첨가제를 무균적으로 첨가하고 잘 혼합한 후 멸균 페트리 접시에 붓는다.

Modified Listeria Selective Supplement (Oxford Formulation) (SR0206)을 첨가할 경우:

Vial contents (each vial is sufficient for 500ml of medium)	per vial	per litre
Amphotericin B	5.0mg	10.0mg
Colistin sulphate	10.0mg	20.0mg
Acriflavine	2.5mg	5.0mg

Cefotetan	1.0mg	2.0mg
Fosfomycin	5.0mg	10.0mg
* SR0206에는 SR0140에 포함된 인체에 유해한 Cycloheximide가 Amphotericin B로 대체 되었다.		

500ml의 정제수에 27.75g의 CM0856을 현탁하고, 끓여서 완전히 녹인다. 121°C, 15분간 오토클레이브로 멸균한다. 첨가제 SR0206을 해당 제품설명서에 따라 재구성하여 준비한다. 멸균된 배지를 50°C까지 식힌후, 준비된 첨가제를 무균적으로 첨가하고 잘 혼합한 후 멸균 페트리 접시에 붓는다.

설명(Description)

*Listeria monocytogenes*에 의한 식품유래 감염으로 인해 식품, 환경, 그리고 사람 및 동물 유래의 병원성 검체에서 이 미생물을 검출하기 위한 관심 증가가 가속화 되었다.

성인 감염의 대부분은 증상이 없고 장 및 생식기관에서의 보균을 초래한다. 임신 중 감염은 유산, 조산, 신생아 감염을 초래할 수도 있다. 리스테리아증의 가능성이 원인을 알 수 없는 반복적인 유산, 조기 진통, 태아 사망을 보이는 여성에서 고려되어야 한다. 이 미생물은 혈액 배양 및 생식관 스왑을 통해 검출해야 한다¹.

성인 및 신생아에서 가장 공통적인 임상적 양상은 수막염(meningitis)이다. 폭 넓게 퍼진 감염, 농양, 아 급성 세균성 심내막염(sub-acute bacterial endocarditis) 및 면역 억제 환자에서의 기회적 감염이 간혹 발생된다.

새, 물고기, 그리고 기타 동물들은 모두 *Listeria* 감염에 감수성이 있다. 가축에서 특히 중요하다. 독일연방에서 동물에서 리스테리아증 발생 보고는 의무적이며 육류 조사법은 육류 위생에서의 중요성으로 인해 *Listeria*에 대한 검사를 요구한다.

*Listeria monocytogenes*는 환경에 많이 퍼져 존재한다. 우유^{2,3}, 치즈⁴, 하수 및 하천수⁵, 목초⁶에서 분리되는 것으로 보고되었다. *Listeria*는 폭 넓게 퍼져있기 때문에 감염원이 많다. 조리되지 않은 채소가 관련되어 있다; 양배추 소비와 관련된 에피소드가 하수 비료(sewage fertilizer)를 사용하는 농장의 양배추와 관련되어 있다. 유제품으로 인한 발병에서 유선염에 걸린 소가 감염원일 수 있다. 수의 사에게 중요한 것은 목초 제조업에서 업무의 변화에 주로 기인하여 유산 또는 뇌염으로 나타나는 양(sheep)에서의 감염이 상당히 증가한다는 것이다⁸.

리스테리아는 경쟁 균집에 의해 쉽게 완전히 성장 도태를 당하기 때문에 과거에는 효과적인 선택배지가 없어서 이 미생물을 분리하는 것 어려웠다.

Listeria Selective Medium (Oxford Formulation)은 Curtis 등⁹이 기술한 조성에 기반하며 임상 및 식품 시료에서 *Listeria monocytogenes*의 검출에 권장된다.

이 배지의 다음을 활용한다:

(i) 선택적 억제 구성성분으로 lithium chloride, acriflavine, colistin sulphate, cefotetan, cycloheximide(또는 amphotericin B) 그리고 fosfomycin이 사용된다.

(ii) *Listeria monocytogenes*의 분리 또는 분별을 위해서 지시약 체계인 aesculin 및 ferrous iron이 사용된다.

*Listeria monocytogenes*는 aesculin 을 가수분해시켜, aglucon 에서 유래하는 검정색 철 페놀 화합물의 생성으로 인해 집락 주위에 검정색 영역을 만든다. 그람-음성 세균은 완전히 억제된다. 대부분의 원치않는 그람 양성 종들은 저해되지만 일부 *enterococci*의 균주들은, 일반적으로 40 시간 배양 후에, 약하게 성장하고 약한 aesculin 반응을 보여준다. 일부 *staphylococci* 는 aesculin 음성 집락으로 성장할 수 있다.

전형적인 *Listeria monocytogenes* 집락은 24 시간 배양 후에 거의 항상 육안으로 볼 수 있다. 하지만 느리게 성장하는 균주들을 검출하기 위해서는 24 시간 더 배양을 지속해야 한다.

분리 방법은 실험 저자와 사용된 물질에 따라 다양하다^{10,11}. 모든 시료에 대해서 선택적 증균 및 냉증균이 분리율을 상당히 증가시키는 것으로 나타났다^{12,13,14}. *Listeria Selective Medium*(Oxford Formulation)의 효율은 기존 문헌에 기술된 방법론을 따르고 선택적 증균 배지를 사용하여 다양한 식품들에 대해 확인되었다^{16,17,18,19}. Oxford agar 는 FDA/BAM 분리 방법²⁰에서 그리고 기타 국가 및 세계적인 기관의 표준화된 시험 방법²¹에서 특정된 평판용 배지이다. Oxford agar base 는 Al-Zoreki 및 Sandine 에 의해서 ASLM agar 를 위한 기본 배지로 사용되었다. ASLM agar 는 선택제로서 ceftazidime, moxalactam, cycloheximide 가 포함되어 있다²².

주의사항(Precautions)

Listeria monocytogenes 는 ACDP Group 2, 즉, "실험실 작업자에게 해로울 수 있다"이므로 적합한 환경에서만 다루어져야 한다.

임산부 실험자는 *Listeria* 배양이 시행되는 것으로 알려진 작업에서 배제해야 한다.

Acriflavine 을 함유한 *Listeria* 배지는 차광해야한다. 광산화로 인해 *Listeria* 를 억제하는 물질이 생성된다.

첨가제 SR0140 은 인체에 독성 농도인 cycloheximide 가 포함되어 있어 취급에 주의를 요한다. SR0206 에는 독성의 cycloheximide 가 Amphotericin B 로 대체되어 있다.

사용(Technique)

분변 및 생물학적 시료

검체를 0.1% Peptone Water (CM0009)에 1:9 의 비율로 균질화 한다.

직접 표면 평판법

1. 균질화한 시료 0.1ml 을 *Listeria Selective Medium* 평판에 접종한다.
2. 48 시간까지 35°C 에서 배양한다.
3. 배양 24 시간 후 및 47 시간 후에 *Listeria* 의 전형적인 집락을 시험한다.

선택적 증균법

1. 균질화한 시료를 선택적 증균 액체배지에 넣고 7 일까지 30°C 에서 배양한다.
2. 24 시간 후, 48 시간 후, 그리고 7 일 후에, 선택 증균 액체 배지 0.1ml 을 *Listeria Selective Medium* 평판에 접종한다.
3. 평판을 48 시간까지 35°C 에서 배양한다.

4. 24 시간, 48 시간 배양후에 *Listeria* 의 전형적인 집락을 시험한다.

식품 및 환경 검체

분리 방법은 저자, 재료, 권위자에 따라 다양하다. 작은 수로 존재하는 *Listeria monocytogenes*의 검출할 경우, 시험 검체를 증균배지에 접종해서 개체수를 증가시킨 후에 분리 및 동정을 수행해야 한다. *Listeria Selective Medium* 평판에 접종하기 전에, 시험될 검체의 종류에 따라서, 적절한 방법 및 선택적 증균 액체배지를 선택하는 것이 좋다.

1. 선택적 증균 액체 배지 0.1ml 을 *Listeria Selective Medium* 평판에 접종한다.
2. 48 시간까지 35°C 에서 배양한다.
3. 24 시간, 48 시간 배양후에 전형적인 집락을 시험한다.

Listeria monocytogenes 로 추정적으로 동정된 집락들을 생화학적 및 혈청학적 검사로 확정해야 한다.²³

참고: 배양온도를 30°C 또는 35~37°C 에 하는가에 따라서, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* 및 *Listeria ivanovii* 의 beta-lactam 항생제 및 fosfomycin 에 대한 감수성에 차이가 있는 것으로 관찰되었다²⁴.

저장 조건 및 유효기간(Storage conditions and Shelf life)

분말배지 : 10-30°C 에서 보관. 라벨에 표시된 유효기한 전 까지 사용

조제배지 : 2-8°C 에서 차광보관한다.

성상 (Appearance)

분말배지 : 짙색의 유동성 분말

조제배지 : 창백한 녹색의 젤

품질관리(Quality Control)

양성대조균	예상 결과
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 7644 *	좋은 성장; aesculin 가수분해가 있는 갈색의 집락
음성대조균	예상 결과
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212 *	성장 없음
* Culti-Loop®로 판매되고 있음	

참고문헌(Reference)

1. Lancet (1985 [2]) August 17. 364-365.
2. Hayes et al (1986) Appl. Env. Microbiol. 50. 438-440.
3. Fernandez Garayzabal J.F. et al (1986) Can. J. Microbiol. 32. 149-150.
4. James S.M., Ferrin S.L. and Agee B.A. (1985) MMWR 34. 357-359.
5. Watkins J. and Sleath K.P. (1981).
6. Gitter M. (1983) Vet. Rec. 112, 314.

7. Schlech W.F., Lavigne P.M. and Bortolussi R.A. (1983) N. Eng. J. Med. 308. 203-206.
8. Appleyard W. (1986) Communicable Diseases, Scotland. April 1986. CDS 86/13.
9. Curtis G.D.W., Mitchell R.G., King A. F. and Griffin E.J. (1989) Letters in Appl. Microbiol. 8. 95-98.
10. van Netten P, van de Ven A., Perales I. and Mossel D.A.A. (1988) Int. J. Food Microbiol. 6. 187-198.
11. Prentice G.A. and Neaves P. (1988) Bulletin of the International Dairy Federation No. 223.
12. Hayes P.S., Feeley J.C. Graves L.M., Ajello G.W. and Fleming D.W (1986) Appl. & Environ. Microbiol. 51. 438-440.
13. Garayzabal J.F.F. Rodriguez L.D., Boland J.A.V. Cancelo J.L.B. and Fernandez G.S. (1986) Can. J. Microbiol. 32. 149-150.
14. Doyle M.P., Meske L.M. and Marth E.H. (1985) J. of Food Protection, 48. 740-742.
15. Crowther J.S. (1988) Personal Communication, Unilever Research Laboratory, Colworth House, Sharnbrook, Bedford, U.K.
16. Neaves P. and Prentice G.A. (1988) Personal Communication, Technical Division, Milk Marketing Board, Thames Ditton, Surrey.
17. Lovett J., Francis D.W. and Hunt J.M. (1987) J. Food Prot. 50. 188-192.
18. Donnelly C.W. and Baigent G.J. (1986) Appl. and Environ. Microbiol. 52. 689-695.
19. Hammer P, Hahn G. and Heeschen W. (1988) Deutsch Mock-Zeit. 50. 1700-1706.
20. Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual 7th Edition 1992, AOAC Int. Publishers Arlington V.A.
21. Foodborne Pathogens. Monograph Number 2 -- Listeria, page 7. Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, U.K.
22. Al-Zoreki N. and Sandine W.E. (1990) Appl. Env. Microbiol. 56. 3154-3157.
23. Bille J. and Doyle M.P. (1991) "Listeria and Erysipelothrix", 287-295 in Balows A., Hauster W.J. Jr., Herrman K.L., Isenberg H.D. and Shadomy H. J. (Editors), Manual of Clinical Microbiology, 5th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
24. Curtis G.D.W., Nichols W.W. and Falla T.J. (1989) Letters in Appl. Microbiol. 8. 169-172.