

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

LISTERIA MONOCYTOGENES BAKTERIJŲ
APTIKIMAS MAISTO ŽALIAVOSE IR PRODUKTUOSE
BEI RIZIKOS ŽMONĖMS ĮVERTINIMAS

Magistrantė EGLĖ KAŠĖTAITĖ
(parašas)

Darbo vadovė
dr. Silvija Kiverytė
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos
ir laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab. dr., prof. Z. Kučinskienė
leidžiama ginti (parašas)

Darbo įteikimo data

Registracijos Nr.

TURINYS

	Psl.
SANTRAUKA.....	3
SUMMARY.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> sistematika, morfologija ir fiziologija.....	6
1.2. Listeriozės epidemiologija ir patologija.....	9
1.3. Klinika	13
1.4. Diagnostika	14
1.5. <i>Listeria monocytogenes</i> maisto produktuose	15
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	18
2.1. Tyrimo objektas ir eiga.....	18
2.2. Tyrimui naudotos mitybinės terpės ir reagentai	19
2.3. Tyrimui naudota įranga ir indai	20
2.4. Mėginių paruošimas tyrimui ir tyrimo eiga.....	21
2.5. Tyrimų rezultatų identifikavimas ir vertinimas	22
2.6. Duomenų analizė	25
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	27
3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> dinamika maisto žaliavose ir produktuose.....	27
3.2. 2003-2008 metų sergamumo listerioze Lietuvoje analizė.....	31
3.3. Tyrimų rezultatų aptarimas.....	34
IŠVADOS	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	36
PRIEDAI.....	41

SANTRAUKA

Eglė Kašėtaitė

***LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERIJŲ APTIKIMAS MAISTO ŽALIAVOSE IR PRODUKTUOSE BEI RIZIKOS ŽMONĖMS ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro darbas

Darbo vadovė: dr. Silvija Kiverytė

Vilniaus Universitetas

Medicinos fakultetas

Fiziologijos, biochemijos ir laboratorinės medicinos katedra

Darbo apimtis 57 lapai, 4 lentelės ir 24 paveikslai

Listeria monocytogenes bakterijos yra vienos iš pavojingiausių maiste aptinkamų patogenų. Patekusios į maisto žaliavas ir produktus jos gali sukelti rimtus žmonių apsinuodijimus ir pridaryti didelius ekonominius nuostolius.

Šiuo metu pasaulyje, taip pat ir Lietuvoje daug dėmesio skiriama per maistą plintančių patogeninių mikroorganizmų sukeltų užkrečiamųjų ligų protrūkiams tirti.

Vienas iš *Listeria monocytogenes* nustatymo maiste būdų yra mikrobiologinis kokybinis aptikimo metodas. Kuris plačiai taikomas pasaulyje, nes yra nebrangus, efektyvus ir nedaro poveikio aplinkai.

Listerioze – gyvūnų ir žmonių užkrečiama liga, kurią sukelia gramteigiamos *Listeria monocytogenes* lazdelės. Užsikrėtimui šia liga įtakos turi žmonių amžius, nusilpusi imuninė sistema, nėščiujų imlumas bakterijoms, netinkamas maisto paruošimas bei vartojimas ir kita.

Šio baigiamojo darbo tikslas yra įvertinti listerijų (*Listeria monocytogenes*) paplitimą maisto žaliavose ir produktuose 2001-2008 metais. Maisto žaliavų ir produktų mėginiai buvo imami bei tyrimai atliekami Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL) Klaipėdos skyriuje. Uždaviniai: taikant akredituotą monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimo metodą [LST EN ISO 11290-1:2003, LST EN ISO 11290-1:2003/A1:2005] išskirti ir identifikuoti *Listeria monocytogenes* maisto žaliavose ir produktuose, taip pat nustatyti *Listeria monocytogenes* paplitimo dinamiką maisto žaliavose ir produktuose. Tyrimo analizei dėl 2003–2008 m. sergamumo listerioze Lietuvoje duomenys surinkti iš Užkrečiamųjų ligų ir profilaktikos kontrolės centro (ULPKC).

Gauti tyrimų rezultatai rodo, kad Lietuvoje, kaip ir pasaulyje, *L. monocytogenes* daugiausiai aptinkama žuvyje, mėsoje ir jų produktuose. Lietuvoje sergamumas listerioze vis dažniau diagnozuojamas, pagal amžių daugiausiai serga vidutinio amžiaus asmenų (t.y. nuo 45 iki 64 m.). Taip pat nustatyta, kad listeriozei būdingas sezoniškumas – daugiausiai susirgimų registruojama gruodžio ir rugsėjo mėnesiais.

SUMMARY

Eglė Kašėtaitė

***LISTERIA MONOCYTOGENES* BACTERIA DETECTION IN FOOD RAW MATERIALS AND PRODUCTS AND RISK FOR HUMANS ASSESSMENT**

Graduation Dissertation for Master's Degree

The Supervisor of the Work: dr. Silvija Kiverytė

Vilnius University

Faculty of Medicine

Department of Physiology, Biochemistry and Laboratory Medicine

Scope of the Work: 57 pages, 4 tables and 24 figures

Listeria monocytogenes bacteria are one of the most dangerous pathogens found in the food. Introduced into the raw food materials and products they can cause serious people poisoning and make some substantial economic losses.

Currently the world, as well and Lithuania are focused on investigation outbreaks of food-borne pathogen causes on infectious diseases.

One of *Listeria monocytogenes* detection methods in the microbiological food is qualitative detection method. It is widely used in the world, because it is inexpensive, effective and does not affect the environment.

Listeriosis - animal and human infectious disease caused by *L. monocytogenes* Gram-rods. Infected with this disease have an impact of people's age, weakened immune systems, pregnant susceptibility to bacteria, improper food preparation and consumption, or others.

The Graduation Dissertation for Master's Degree is to assess the listeria (*Listeria monocytogenes*) the prevalence of food materials and products in the year of 2001-2008. The raw food materials and product samples were taken and tested on the National Public Health Laboratory (NPHL) of Klaipėda Department. Objectives: the application of the accredited *L. monocytogenes* detection method [LST EN ISO 11290-1:2003, LST EN ISO 11290-1:2003/A1:2005] to distinguish and identify *L. monocytogenes* in the food materials and products, as well to find out the dynamics of the prevalence *L. monocytogenes* in the food materials and products. The study on the analysis for 2003-2008 incidence of listeriosis Lithuania Material collected from the Infectious Disease Prevention and Control Center (IDPCC).

The obtained results are showing that in Lithuania, the same and the world *Listeria monocytogenes* are found mainly in the fish, meat and their products. In Lithuania the incidence of listeriosis is increasingly being diagnosed under the age of the most illness of the middle-aged persons (from 45 to 64). We also found that listeriosis is characterized by seasonal - mostly recorded in the December and September.

ĮVADAS

Maisto užterštumas patogenais yra infekcijos rizikos arba apsinuodijimo maistu prielaida, kurią sąlygoja suvartotas maistas. Pasaulinė sveikatos organizacija (PSO) (angl. *WHO*) apskaičiavo, kad pasaulyje kiekvienais metais 1/3 dalis gyventojų gali būti paveikti maisto sukeltų apsinuodijimų, kurie sukelia įvairias ligas ir siekia milijardinius ekonominius nuostolius [10].

Listeria monocytogenes tarp 7 dažniausiai maiste aptinkamų patogenų *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoksiškos *Esherichia coli*, *Cryptosporidium*, *Echinococcus granulosus* ir *Trichinella spiralis*, pripažinta svarbia visuomenės sveikatos problema daugelyje pasaulio šalių [1].

Listeriozė – gyvūnų ir žmonių užkrečiama liga, kurią sukelia *Listeria monocytogenes* bakterijos. Liga gali pasireikšti karščiavimu, raumenų skausmais, angina, akių junginės uždegimo požymiais, limfmazgių uždegimu, kartais vėmimu ar viduriavimu, pakenkti daugeliui organų, nervų sistemai, kas sukelia stiprius galvos skausmus, sprando sustingimą, pusiausvyros sutrikimą, traukulius ir kt., negydant gali baigtis mirtimi.

Užsikrėtimui listerijomis įtakos turi žmonių amžius, nusilpusi imuninė sistema, mityba, listerijų paplitimas tarp naminių ir laukinių gyvūnų, ir atitinkamas kontaktas su jais, nėščiujų imlumas bakterijoms ir kita.

Darbe apžvelgtos aptinkamų patogeninių bakterijų *Listeria monocytogenes* savybės, paplitimas, diagnostika, šio mikroorganizmo sukeliamas pavojus žmonių sveikatai ir kita.

Lietuvoje *Listeria monocytogenes* ir jos sukeliama liga nustatoma retai. Gal todėl, kad netiriami (nežinomi) kai kurie galimų užsikrėtimų atvejai? Žinant šio mikroorganizmo sukeltos užkrečiamosios ligos maistinę kilmę, būtų galima taikyti atitinkamas priemones, padedančias išvengti užsikrėtimo *Listeria monocytogenes* bakterijomis rizikos ir sukeltos žalos.

Šio **darbo tikslas** įvertinti listerijų (*Listeria monocytogenes*) paplitimą maisto žaliavose ir produktuose 2001-2008 metais.

Darbo uždaviniai:

1. Taikant akredituotą monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimo metodą [LST EN ISO 11290-1:2003, LST EN ISO 11290-1:2003/ A1:2005] išskirti ir identifikuoti *Listeria monocytogenes* maisto žaliavose ir produktuose, tyrimus atliekant Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL).
2. Nustatyti *Listeria monocytogenes* paplitimo dinamiką maisto žaliavose ir produktuose.
3. Išanalizuoti sergamumą listerioze Lietuvoje 2003-2008 metais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Listeria monocytogenes* sistematika, morfologija ir fiziologija

Listeria monocytogenes sisteminė padėtis [12, 55, 56]:

Domenas *Eubacteria* (Eubakterijos)

Karalystė *Bacteria* (Bakterijos)

Tipas *Firmicutes*

Klasė *Bacilli* (Bacilos)

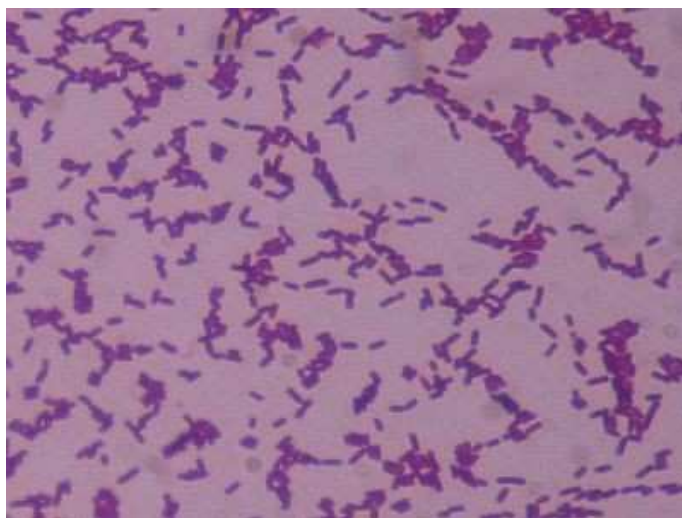
Eilė *Bacillales*

Šeima *Corynebacteriaceae* (*Listeriaceae*)

Gentis *Listeria* (J. H. Harvey Pirie 1940)

- *Listeria monocytogenes* (E.G.D. Murray et al. 1926),
- *Listeria denitrificans* (Prévot 1961),
- *Listeria grayi subsp. grayi* (Errebo Larsen and Seeliger 1966),
- *Listeria grayi subsp. murrayi* (Welshimer and Meredith 1971),
- *Listeria innocua* ((*ex* Seeliger and Schoofs 1979), Seeliger 1983),
- *Listeria seeligeri* (Rocourt and Grimont 1983),
- *Listeria welshimeri* (Rocourt and Grimont 1983),
- *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* (Seeliger et al. 1984),
- *Listeria ivanovii subsp. londoniensis* (Boerlin et al. 1992),

Listeria monocytogenes - tai gramteigiamos, smulkios (0,5 – 2,0 μm ilgio, 0,4 – 0,5 μm pločio) patogeninės bakterijos (1 pav). Sporų ir kapsulių nesudaro, bet yra pakankamai atsparios išoriniams aplinkos veiksniams (sausrai, šalčiui, aukštai temperatūrai).



1 Pav. Gramteigiamos lazdelės formos *L. monocytogenes* bakterijos [60].

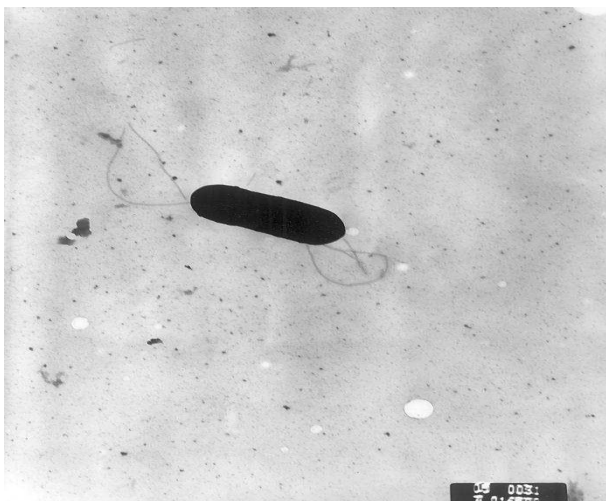
Gali augti nuo - 4° iki 45° C temperatūroje [9]. Optimali augimo temperatūra nuo 30° iki 37° C [43]. Didesnėje nei 70° C temperatūroje greitai inaktyvuojama [2].

100° C temperatūroje žūva per 3 min.. 62° C temperatūroje – per 35 min. [18, 51]. Jos gali tarpti ir daugintis 4 – 6° C temperatūroje dirvožemyje (išsilaiko 3 - 6 mėn.), ant augalų, maiste. Aptinkama upių, kitų gėlo vandens telkinių, jūrų vandenyje [3, 15]. Minimalus vandens aktyvumas $a_w = 0,92$ [36].

Priklausomai nuo rūgšties tipo, gali augti terpėje, kurios pH yra nuo 4,0 iki 9,5 [36]. Išgyvena terpėje, kurios NaCl koncentracija 6 – 20 % [51].

Veikiamos tiesioginių saulės spindulių žūva per 2 – 15 parų. Jas inaktyvuoja chloro turinčios dezinfekcinės medžiagos [51]. Lazdeles greitai sunaikina 0,5 % formalinas, 5 % fenolis ir lizuoja specifiniai fagai. Tarpinėje aplinkoje listerijos labai greitai kinta [56, 18].

Listerijos – judrios lazdelės (2 pav.) Turi 1 ilgą subterminalinį žiuželį ir 4 trumpus šoninius žiuželius. Preparate išsidėsto pavieniui, po dvi, raide V arba Y, ar grandinėle [56, 18].



2 pav. Judanti *Listeria monocytogenes* bakterija. Vaizdas matomas elektroninio mikrografo pagalba. Padidinta 41,250X [56].

Tiesioginės medžiagos tepinėlyje gramteigiami mikroorganizmai gali būti kokai, todėl dažnai painiojami su *Streptococcus spp.*. Ilgesnės ląstelės – su Korynebakterijomis [25]. *L. monocytogenes* žiuželiai atsiranda ne kūno (37° C), o kambario temperatūroje (20° - 25° C). [48].

Listerijų identifikavime svarbus hemolizės nustatymas. Panašiai kaip *L. monocytogenes* kraujo agarą hemolizuoja *L. ivanovii* ir *L. seeligeri*. Norint nustatyti *L. monocytogenes* hemolizę reikia užsėti lėkštelę su avies kraujo agaru. Testas teigiamas, kai yra siaura, šviesi, skaidri zona - β-hemolizė (tai aiškiai matoma nuslopinus bet kurią aplink tiriamą pasėlį esančią kultūrą). *L. innocua* pasėlio vietoje skaidrios zonos nėra, *L. seeligeri* hemolizė silpna. *L. ivanovii* β-hemolizės zona plati ir aiški [20, 30, 31].

Mikrobiologinio kultivavimo metu *L. monocytogenes* yra fakultatyvinis anaerobas, geriausiai augantis mikroaerofilinėmis sąlygomis, bet gerai auga ir aerobinėmis, ir anaerobinėmis sąlygomis [36].

Pasėlis ant Palkamo agaro gali būti inkubuojamas mikroaerobinėmis sąlygomis stikliniame inde, užpildžius jį specialios sudėties dujų mišiniu (nuo 5 % iki 12 % CO₂, nuo 5 % iki 15 % O₂ ir 75 % N₂). Taip inkubuotos lėkštelės turi būti paliekamos 1 h ore, kad atgautų rožinę-purpurinę spalvą [30].

Selektyvioje PALKAM'o agaro terpėje listerijų kolonijos yra mažos (nuo 1,5 mm iki 2 mm skersmens), apvalios, mėlynai žalios, pilkos kolonijos kartais su juodais centrais, su įdubimu ar be jo, visada apjuostos juoda zona (3 pav.) [56, 30].



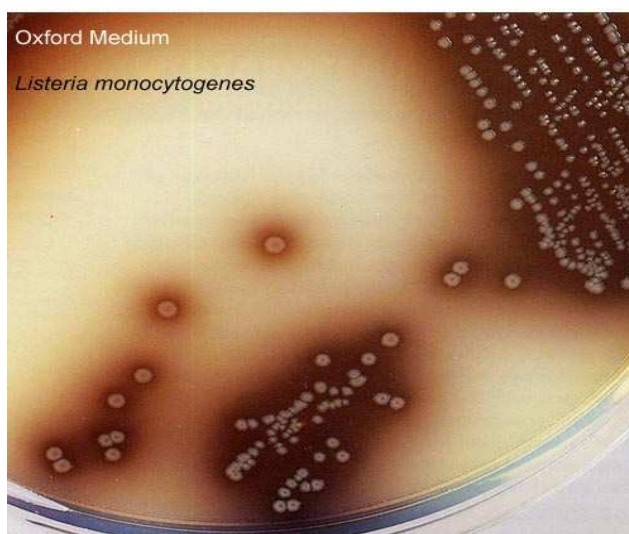
3 pav. *Listeria spp.* ant PALCAM agaro terpės [57].

Listeria agare pagal Ottaviani ir Agosti (ALOA) - *L. monocytogenes* kolonijos yra žaliai mėlynos spalvos, apsuptos nepermatoma zona (būdingos kolonijos) [30, 31] (4 pav.).



4 pav. *L. monocytogenes* kolonijos ant ALOA agaro [58].

Ant Oksfordo agaro išaugusių listerijų kolonijos yra mažos (1 mm), pilkšvos spalvos, apsuptos tamsia zona. Po 48 val. kolonijos patamsėja, gali žalsvai švytėti, skersmuo 2 mm, aureolės juodos, centrai įdubę [30, 31] (5 pav.).



5 pav. *Listeria monocytogenes* augimas ant Oksfordo agaro terpės [59].

Ant triptono sojos mielių ekstrakto agaro (TSMEA) identifikuojamos pavienės kolonijos. Būdingos nuo 1 mm iki 2 mm skersmens, išgaubtos, bespalvės, nepermatomais kraštais kolonijos [30, 31].

Listerijos iki rūgščių, nesudarydamos dujų, skaido gliukozę, maltozę, laktozę, sacharozę, krakmolą. Neskaido manito, šlapalo, neskystina želatinos, nesudaro indolo, sieros vandenilio. Neredukuoja nitratų į nitritus. Katalazės testas – teigiamas, oksidazės – neigiamas [56, 18].

Epidemiologijos tikslais listerijos serotipuojamos. Yra du pagrindiniai paviršinių antigenų tipai, kurių vienas buvo išskirtas iš graužikų, o kitas – iš galvijų. Šie tipai turi somatinių O (teichoinės rūgšties) ir žiuželinių H antigenų (baltymų). O antigenas susideda iš 5 antigenų (I, II, III, IV, V), H antigenas – iš 4 formalinui jautrių antigenų (A, B, C, D) [18, 20].

Yra žinoma 13 *L. monocytogenes* serotipų: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ir 7. Serotipai 1/2a, 1/2b ir 4b sudaro iki 92% iš žmonių ir gyvūnų išskirtų *L. monocytogenes* bakterijų. 4b yra Europoje, Kanadoje, bei JAV dominuojantis serotipas, sukeliantis didžiąją dalį listeriozės susirgimų [13, 21].

1.2. Listeriozės epidemiologija ir patologija

1920 - aisiais metais epidemija prasidėjo tarp jūrų kiaulyčių ir triušių. Tai suglumino veterinarus. 1926 metais mokslininkų komanda, kuriems vadovavo daktaras Everitt G.D. Murray, atrado bakteriją, kurią pavadino *Bacterium monocytogenes*. Vėliau J.H. Harvey Pirie

(1940 m.) suteikė *Listeria* genties pavadinimą [40], kuris buvo suteiktas daktaro Joseph Lister garbei ir bakterija pervadinta į *Listeria monocytogenes*. Liga, kurią sukelia *Listeria* pavadinta listerioze. J. Lister - gydytojas, kuris suprato chirurginių instrumentų sterilizavimo reikšmę prieš operacijas infekcijų sustabdymui [44, 54].

Atradus listeriją, mokslininkai manė, kad ji sukelia ligą tik gyvūnams, nes jokie žmogaus susirgimo atvejai tuo metu nebuvo žinomi. Situacija pasikeitė, kai 1929 metais buvo nustatytas pirmas žmogaus listeriozės atvejis. Per 1930-uosius, pasireiškė labai didelis žmogaus listeriozės atvejų padidėjimas. Tuo pačiu metu pagausėjo ir gyvūnų listeriozės atvejų, kas privertė mokslininkus manyti, kad gyvūnai perduoda ligą žmonėms [44].

Listeriozės infekcija tarp laukinių ir naminių gyvūnų bei graužikų yra paplitusi visame pasaulyje (17 paukščių, 42 žinduolių rūšyse, žuvyse, net išskirta iš erkių ir musių [48]. Jie yra infekcijos rezervuaras ir šaltinis [8].

Su gyvūnų ekskrementais patekusios listerijos gali būti randamos dirvožemyje, vandenyje, nuotekose, ant žolės, mėšle, silose ir kt. [48]. Dirvožemis būdamas kietas ir drėgnas yra puiki terpė augti ir daugintis listerijoms, jame taip pat auga daug augalų, kurie teikia maistines medžiagas [14].

Ilgai nebuvo nustatyta, kad tai svarbus patogeninis mikroorganizmas, kuriuo galima užsikrėsti per maisto produktus. Nuo 1980 m. įvykusių kelių didelių listeriozės protrūkių Šiaurės Amerikoje bei Europoje paaiškėjo maisto produktų, kaip *L. monocytogenes* infekcijos šaltinio, svarba [4].

Pastaraisiais metais infekcija, kurią sukelia *Listeria monocytogenes* bakterija, pripažinta svarbia visuomenės sveikatos problema daugelyje pasaulio šalių.

JAV *L. monocytogenes* infekcijos dažnumas sumažėjo nuo 0,5 iki 0,3:100 000 žmonių per 1996-2001 m. 11 % mirtingumas yra tarp 40 ir daugiau metų turinčių žmonių, 63 % - daugiau kaip 60 metų turinčiųjų [28].

Pagal Dharmarha listeriozė JAV nuo 1996 iki 2006 metų sumažėjo 36 % [8].

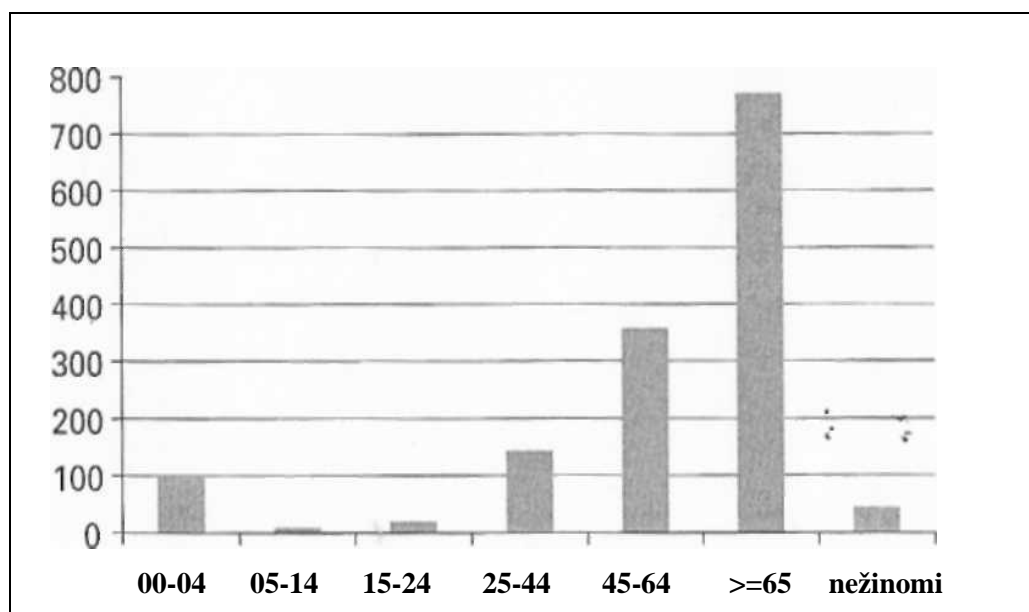
Bet 2002 metais Amerikoje listeriozės protrūkis apėmė keletą valstijų. Protrūkio metu mirė 7 žmonės, užregistruoti priešlaikiniai gimdymai [17].

2007 metais Masačusetso valstijoje (JAV) užregistruoti 5 susirgimo atvejai dėl užteršto pasterizuoto pieno. Mirė 3 žmonės [5].

42 susirgimo listerioze atvejai (iš jų 15 mirtini) žinomi nuo 2008 m. rugsėjo mėn. Kanadoje (Toronte), dėl paruoštos vartojimui mėsos užkrato patogeninėmis bakterijomis [34].

Europoje 2005 metais pranešti 1439 žinomi listeriozės atvejai. Europos Sąjungoje infekcijų dažnumas buvo 0,3:100 000 žmonių populiacijoje, kuris buvo panašus nuo 2004 ir 2003. Vokietija pranešė maždaug 72 % padidėjimą, palyginti su 2004 m.. Daugiausiai listeriozės

atvejų žinoma Danijos, Belgijos, Suomijos, Vokietijos ir Nyderlandų valstybėse. Listeriozė daugiausia sirgo vyresnio amžiaus ir pagyvenusių žmonių (53 % atvejų asmenų buvo virš 65 amžiaus) (6 pav.) [53].



6 pav. Listeriozės atvejai EU pagal žmonių amžiaus grupes, 2005 metais [53].

2002 metais Turkijoje užfiksuotas protrūkis, kuris pasižymėjo dideliu užterštumu *Listeria monocytogenes* paruoštoje vartoti mėsoje. Šio protrūkio metu užregistruoti 54 susirgimo listerioze atvejai, iš kurių 14 baigėsi mirtimi (iš jų 3 vaisiaus) [6].

Lietuvoje 2002–2006 metais oficialiai užregistruota 14 listeriozės atvejų, bendras sergamumas 0,1:100 000 gyventojų per metus. 2001–2007 m. gegužės mėn. 4 d. Lietuvoje medicininių gimimų duomenų bazėje užregistruota 10 naujagimių listeriozės atvejų. Nėščių moterų – 12:100 000 gyventojų per metus. Naujagimių - 4,36:100 000 gimusiųjų [33].

Pagrindinis infekcijos šaltinis yra gyvūninis maistas, vartojamas netinkamai paruošus. Taip pat infekcija gali plisti per užterštą įrangą, grindis, stovintį kanalizacijos vandenį, darbuotojų užterštas rankas, rūbus [51, 36, 8]. Epidemiologiniu požiūriu svarbi listerijos savybė yra ta, kad *L. monocytogenes* ant nerūdijančio plieno įrengimų paviršiaus gali sudaryti taip vadinamą „bioplėvelę“, dėl ko mikroorganizmas tampa daug atsparesnis plovimo bei dezinfekavimo medžiagoms [8].

Aprašyti užsikrėtimo atvejai oro lašiniu būdu apdorojant gyvūnines žaliavas – vilną, šerius, plunksnas. Galimas užsikrėtimas ir per pažeistą rankų odą [51].

Imlesni nei bendra populiacija šiai infekcijai yra:

- Nėščios moterys. JAV Ligų kontrolės centro duomenimis, jos yra 20 kartų imlesnės infekcijai, nei kiti sveiki suaugę asmenys [39, 47].

- Naujagimiai. Jiems infekcijos požymiai pasireiškia greičiau, nei pačioms nėščiosioms.

- Asmenys su silpnesne imunine sistema [47].

- Asmenys, sergantys vėžiu, cukriniu diabetu, kepenų ciroze, inkstų ligomis [35].

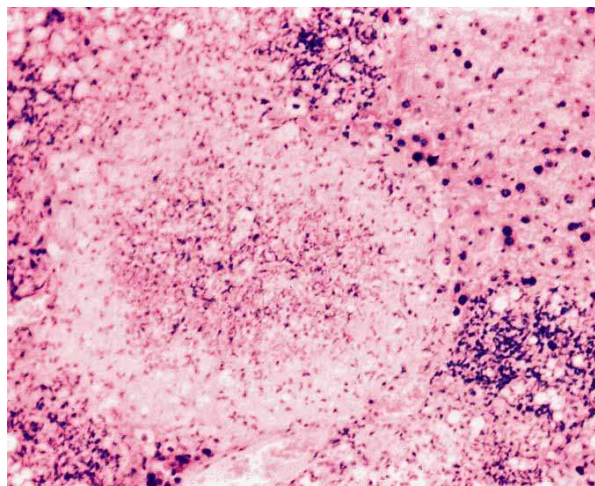
- Sergantys AIDS asmenys. Jie beveik 300 kartų imlesni infekcijai, nei asmenys su normalia imunine sistema

[7, 8, 20, 47, 49, 51, 55].

Nėra tiksliai nustatyta, kokia *L. monocytogenes* koncentracija yra pavojinga žmogui ir sukelia susirgimą [42]. Manoma, kad minimali žmogui pavojinga *L. monocytogenes* koncentracija yra nuo 100 iki 1000 KSV/ 1 g ar 1 ml produkto [13, 27, 37].

Listerijos gali prasiskverbti pro virškinamojo trakto sistemos epitelines ląsteles. Imunitetas prieš listerijas daugiausia priklauso nuo T-ląstelių limfokinių aktyvinimo makrofaguose. Apsaugoje nuo bakterijų dalyvauja interleukinas (IL) –18.

Bakterijos patenka į žmogaus monocitus, makrofagus arba granulocitus ir ten auga. Epiteloidinės ląstelės bei limfocitai sudaro granulomas (listeriomas). Sukėlėjui dauginantis prasideda antrinė nekrozė (7 pav.). Bakterijos, būdamos fagocitų viduje, patenka į smegenis ir į nėščių moterų vaisių [17, 22].



7 pav. Antrinė kepenų listeriomos nekrozė [22].

Yra žinoma, kad net nedidelis lazdelių kiekis, patekęs į nėščios moters organizmą, prasiskverbia pro placentą į vaisių ir sukelia sepsį; vaisius žūva dėl centrinės nervų sistemos pažeidimo arba gimsta jau sergantis kūdikis [18].

Listerijų bakterijos į organizmą patenka dėka ląstelinio mechanizmo ir bakterijų baltymų (internalino) ir e-kadherino (CDH1). Mikroorganizmas plinta iš ląstelės į ląstelę dalyvaujant baltymui aktinui, jo polimerizacijos metu. Aktino palaikymui šeimininko ląstelių citoplazmoje

būtinai - profilinas, kuris priima aktino monomero surišantįjį baltymą ir bakterijų paviršiaus baltymas (vadinamas ActA) [16].

1.3. Klinika

Patekusios į žmogaus organizmą bakterijos gali pakenkti daugelį organų, todėl ligos simptomai gali būti labai įvairūs. Liga gali pasireikšti karščiavimu (iki 39°C), raumenų ir sąnarių skausmais, angina, akių junginės uždegimo požymiais, limfmazgių uždegimu, kartais vėmimu ar viduriavimu. Jei pakenkiama nervų sistema, liga pasireiškia stipriais galvos skausmais, sprando sustingimu, pusiausvyros sutrikimu, net traukuliais. Gali kankinti nemiga, veido srityje kartais atsiranda „drugelio“ formos išbėrimas. Liga gali pažeisti kepenis, blužnį, inkstus, nervų ir širdies – kraujagyslių sistemas [32, 36, 51].

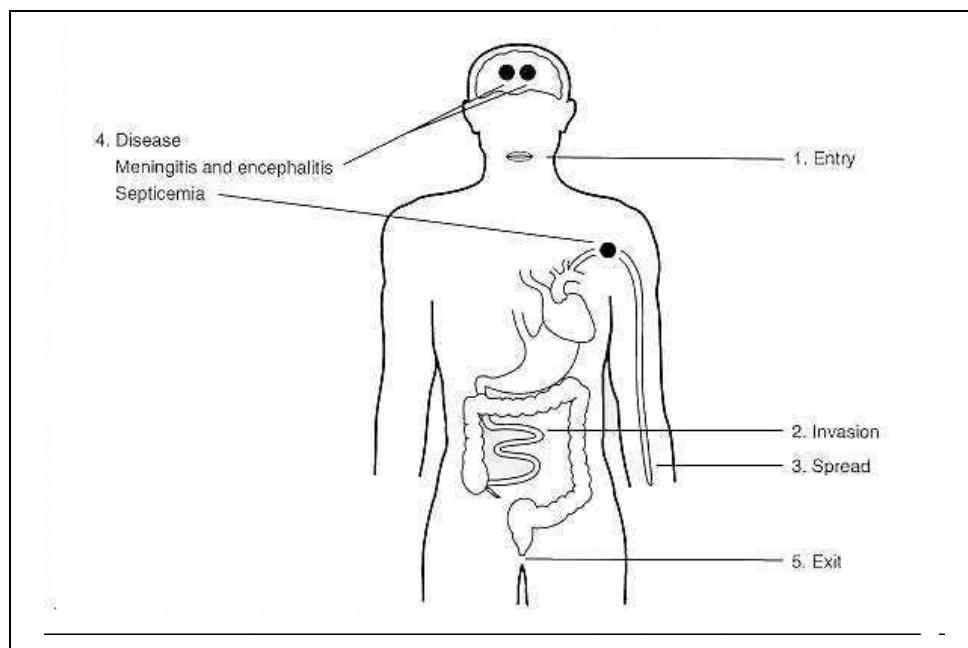
Inkubacinis ligos periodas gali tęstis nuo 3 iki 70 dienų, dažniausiai apie 3 savaites. Nėščioms listeriozė paprastai pasireiškia per 3 nėštumo trimestrą [8, 25] ūmių viršutinių kvėpavimo takų infekcijos ar gripo požymiais, tačiau dažniausiai gali būti persileidimo, naujagimio listeriozės ar vaisiaus mirties priežastimi [25, 26].

Užsikrėtusiems naujagimiams listeriozės požymiai pasireiškia po 3-5 dienų [51]. Naujagimių listeriozės infekcija vadinama *Granuloma infantisepticum*. Jai būdingi granulomos ir/ar abscesai kepenyse, blužnyje, plaučiuose, smegenyse bei odoje; listerijos pereina per placentą ir pažeidžia vaisių; placenta – pagrindinis pirminis infekcijos židiny motinos ir vaisiaus vidaus organams; Miršta apie 50 % naujagimių, susirgusių šia listeriozės forma [33].

Naujagimių užsikrėtimo kelias - vertikalus (transplacentinis, slenkant gimdymo takais), kontaktinis (nuo užterštų rankų, nuo medicinos įrangos), transmisinis [33, 51].

Skiriamos ankstyvoji ir vėlyvoji naujagimių listeriozės formos. Ankstyvoji naujagimių listeriozė turi 20–30 % mirtingumo koeficientą, jai būdingi šie požymiai: vaisius infekuotas gimdoje, neišnešiotas, hipotrofiškas, sepsis, pneumonija, išplitę mikroabscesai, eritematozinis bėrimas. Vėlyvosios formos (0–30 % mirtingumo koeficientas) požymiai – užsikrėtimas gimimo metu, pūlingas meningitas, karščiavimas, hipotrofija, prastas apetitas, dirglumas, viduriavimas, vėmimas, gelta, išnešiotas, gimimo metu sveikas. Vyresnių vaikų mirtingumo koeficientas yra mažiau kaip 10 % [24, 33, 46].

Dažniausiai ligos komplikacijos būna labai sunkios: pasireiškia bendra kraujo infekcija (septicemija) ar galvos smegenų uždegimais (meningitas, encefalitas) (8 pav.) [20]. Kartais liga gali baigtis net mirtimi. [25, 36].



8 pav. *L. monocytogenes* infekcijos plitimo keliai [20].

Listeriozė gydoma antibiotikų grupės preparatais: penicilinu G, ampicilinu, gentamicinu, chloramfenikoliu. Ampicilinas vartojamas kartu su gentamicinu arba atskirai. Tiems, kurie alergiški anksčiau minėtiems antibiotikams ir kurie serga tam tikromis ligomis, gali būti vartojama trimetoprimas/sulfametoksazolis, eritromicinas, vankomicinas ir fluorchinolonai. Cefalosporinai neefektyvūs prieš *L. monocytogenes*. Skiepų nuo listeriozės nėra [45].

1.4. Diagnostika

Esant tipškai klinikai pacientui atliekami šie laboratoriniai ir instrumentiniai tyrimai: bendras kraujo tyrimas, citologinis smegenų skysčio tyrimas, bakteriologinis kraujo (arba rečiau - iš sąnarių, pleuros ar perikardo skysčių) [49], nosiaryklės, odos abscesų, išmatų tyrimas. Ankstyvai infekcijos diagnostikai gali būti taikomas granulocitų-makrofagų (GM-CSF) arba granulocitų (G-CSF) (iš žmogaus limfocitų) koncentracijos tyrimas, kuriam reikalingas kolonijas stimuliuojantis faktorius KSF – 1 [33].

Listerinio meningito metu kraujo kultūros teigiamos 60–75 % atvejų, o smegenų skysčio tyrimų pasėliai teigiami beveik 100 % atvejų. Išmatų kultūros – nepakankamai jautrus ir specifinis tyrimas [33].

Visame pasaulyje dažniausiai naudojamas mikrobiologinis listerijų nustatymo metodas maiste yra ISO 11290 standartas [23]. Tačiau tyrimas pagal šį metodą trunka beveik savaitę, nes apima gausinimo procesus, išsėjimą į terpes ir auginimą, bei biocheminius identifikavimo testus. Todėl pasaulyje naudojami ir kiti žymiai greitesni metodai, bet dėl savo brangumo nelabai

populiarūs Lietuvoje. Šie tyrimai turi gan aukštas aptikimo ribas, tačiau yra nelabai jautrūs tiriant tiesiogiai, todėl maisto produktų mėginiai prieš tai taip pat turi būti pagausinami [23].

Greiti tyrimų metodai:

- Imunofermentiniai metodai, tokie kaip kolorimetrinis (angl. *Colorimetric Monoclonal Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (Listeria Tek) ir imunofluorescencinis (angl. *Enzyme Linked Immunofluorescent Assay* (VIDAS LIS) ;
- Nukleorūgščių nustatymu paremti metodai (angl. *Nucleic Acid-based Methods*) – labai specifiniai, tokie kaip DNR hibridizacijos – naudojami zondai konkreitiems genams (GeneTrak^R ir GeneQuence^R testai) ir polimerazės grandininė reakcija (PGR) – jautrūs, nukleorūgščių ir imunofermentine analize paremti metodai (BAX^R, LightCycler^R, GeneVision^R ir TaqMan^R sistemos).
- Tipavimo metodai (serotipavimas, multilokus fermento elektroforezė, chromosomų DNR endonukleazės, nukleorūgščių sekų tipavimas) – tokie metodai naudingi protrūkio metu [8].

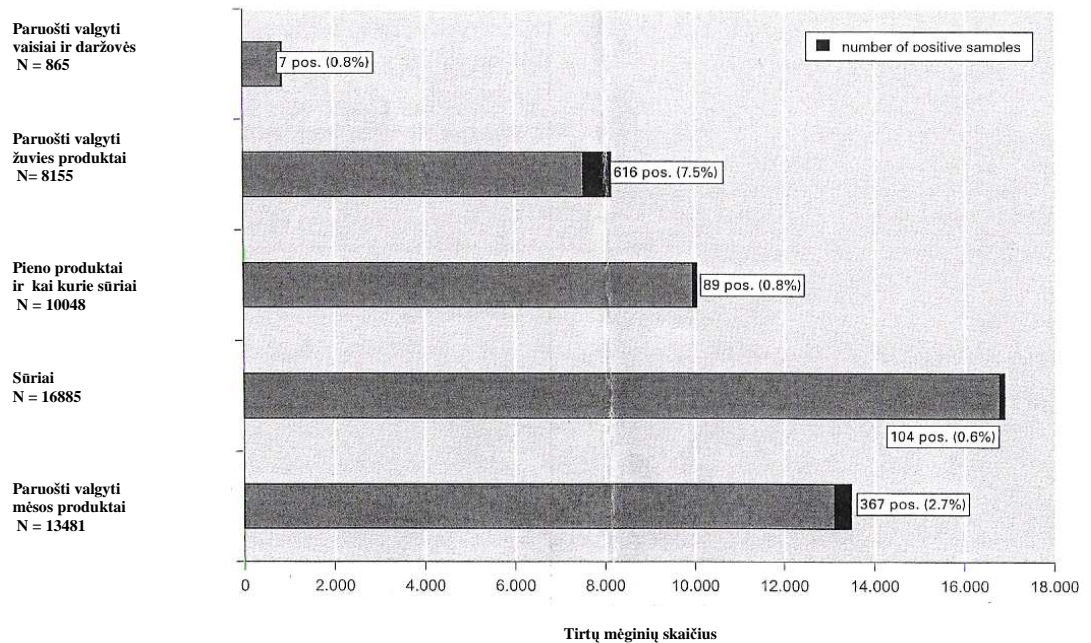
1.5. *Listeria monocytogenes* maisto produktuose

Užsikrėtimas *Listeria monocytogenes* bakterijomis glaudžiai susijęs su maistu bei jo paruošimu vartojimui. Susirgimai listerioze priklauso nuo šių mikroorganizmų skaičiaus esančio paruoštame valgyti maiste. Nustatyta, kad maiste esančių *L. monocytogenes* bakterijų skaičius kinta įtakojant keletui faktorių. Dažniausiai listerijomis užsikrečiama suvalgius jau paruoštus vartoti maisto produktus, kurie:

- palaiko *L. monocytogenes* augimą;
- rekomenduojami laikyti atšaldyti ilgą laiką;
- vartojami papildomai listericidiškai neapdoroti (pvz. nevirti) [36].

Iš jų galima paminėti sūrius, ypač minkštus ir pelėsinius, dešrainius, paštetus, mėsos vyniotinius, saliami, mišraines, nepasterizuotą ir pasterizuotą pieną, ledus, sviestą, rūkytus žuvies produktus, daržoves.

Pagal Europos maisto saugos tarnybos (angl. *EFSA*) pateiktus duomenis 2005 metais *L. monocytogenes* išskirta iš įvairių maisto produktų, daugiausiai iš jau paruoštų vartoti (angl. *ready-to-eat*) maisto produktų. Juose aptikta iki 39 % visų išskirtų *L. monocytogenes* bakterijų. Daugiausiai teigiamų mėginių ir mėginių, turinčių daugiau kaip 100 bakterijų/g buvo užregistruota paruoštuose vartoti žuvies produktuose. Mėginių, kurie viršijo 100 bakterijų/g koncentraciją, taip pat rasta paruoštuose vartoti mėsos produktuose ir sūriuose (9 pav.) [53].



9 pav. *Listeria monocytogenes* paplitimas maisto produktuose, 2005 metais [53].

Daugelyje šalių, tarp jų ir Lietuvoje, yra priimtas reikalavimas, kad 25 g/ml produkto nebūtų aptinkama *L. monocytogenes* bakterijų (taip vadinamas „nulinės tolerancijos“ kriterijus). Bet, kai kurių autorių duomenimis, neįmanoma pagaminti produkto, kuriuose visiškai nebūtų *L. monocytogenes*, nes ne visi gamybos procesai pakankamai efektyvūs listericidiniu požiūriu, o mikroorganizmas yra nepaprastai gyvybingas, gali augti gamybos aplinkoje bei pakartotinai užkrėsti produktą [36]. Net perdirbant žaliavą be *L. monocytogenes*, proceso metu ji gali būti užkrėsta šiuo mikroorganizmu.

Maisto gamybos proceso metu neįmanoma visiškai inaktyvuoti *L. monocytogenes* bakterijų, todėl yra kontroliuojamas jų augimas produkte. Rizika susirgti listerioze yra nedidelė, jei produkte *L. monocytogenes* yra mažiau nei 100 KSV/g [19, 27].

Pagrindinės maisto paruošimo proceso operacijos galinčios turėti įtakos *L. monocytogenes* augimui yra sušaldymas, sūdymas, rūkymas, nitritai ir kt..

Žinoma, kad gramteigiamos bakterijos yra atsparesnės sušaldymui nei gramneigiamos bakterijos [11] daugiau mikroorganizmų išlieka gyvybingais greitai sušaldant maisto produktus [36].

Nustatyta, kad šaldant *L. monocytogenes* iki -18°C buferyje, jos koncentracija sumažėja 10 kartų, kai tuo tarpu šaldant mitybos terpėje sumažėja tik 50 % [36]. Tačiau duomenų apie sušaldymo įtaką šiam mikroorganizmui nėra daug. Todėl tiriant produktą, būtina laikytis aseptinių sąlygų. Jeigu reikia paimti tiriamąjį mėginį iš sušaldyto mėginio, jis atšildomas prekinėje taroje arba taroje, kurioje jis buvo atvežtas į laboratoriją. Mėginys turi būti atšildomas

per 18 h nuo 0° iki 4° C temperatūroje. Kai reikia atšildyti greitai, mėginys laikomas ne ilgiau kaip 15 minučių ne aukštesnėje kaip 45° C temperatūroje. Atšildant mėginį nuo 35° iki 45° C temperatūroje, jis nuolat purtant atšildomas vandens vonelėje, kurios temperatūra reguliuojama [29].

Druskos koncentracija produkte vandens fazėje turi siekti 6 %, kad būtų sustabdytas *L. monocytogenes* augimas 5° C temperatūroje [38]. Bet tai įtakotų produkto skonines savybes.

Produkto rūkymas taip pat neužtikrina patogeninių bakterijų žuvimo, nes listerijų ląstelės gali augti ir rūkymo proceso metu [36], todėl tiriant produktą labai svarbu tiriamąjį mėginį imti ir iš produkto vidinės dalies.

Nitritai, natrio laktatas slopina *L. monocytogenes* augimą 5° C temperatūroje, nors 10° C temperatūroje nitritai įtakos beveik neturi [36].

L. monocytogenes augimas slopinamas rūgščioje aplinkoje (esant mažam terpės pH), todėl kai kurios rūgštys (acto, pieno, citrinų) naudojamos mikroorganizmo augimo prevencijai mėsos produktų gamyboje [41, 50].

Bakteriocinai - tai bakterijų rūšių produkuojami biologiškai aktyvūs baltymai, turintys antimikrobinį poveikį, tokie kaip laktocinas 705, lizinas, pediocinas AcH, reuterinas, sakacinas, divercinas ir kt. Jų poveikis listerijų augimui gali ne tik padėti, t.y. mažinti patogeninių bakterijų augimą, bet ir pakenkti. Jie nėra pakankamai stabilūs, o jų aktyvumas priklauso nuo daugelio faktorių [36].

Į visa tai reikėtų atsižvelgti tiriant produktą dėl monocitogeninių listerijų buvimo, kadangi įvairių priedų buvimas gali trukdyti 25 gramuose ar mililitruose mėginio aptikti *L. monocytogenes*.

Taigi, dauguma rinkoje tiekiamų produktų atitinka mikrobiologinius reikalavimus dėl *L. monocytogenes*, nes visi gamintojai mažiau ar daugiau naudoja anksčiau minėtas priemones stabdančias šių bakterijų dauginimąsi. Tačiau, tai neapsaugo nuo pavojaus užsikrėsti rizikos grupės asmenims - nėščioms moterims, vaikams, ir senyvo amžiaus žmonėms. Todėl rekomenduojama atsargiai rinktis vartojamus maisto produktus, o gal net kai kurių visai atsisakyti.

Pagal PSO listeriozės susirgimo rizika, įvertinus produkto vartojimo dažnį, yra tokia: tikimybė susirgti listerioze suvalgius šaltai rūkytos žuvies yra 4,2 karto didesnė nei išgėrus pasterizuoto pieno ir, atitinkamai, 1500 ir 1840 kartų didesnė nei suvalgius ledų ar fermentuotos mėsos [36, 42].

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1 Tyrimo objektas ir eiga

Ėminiai tyrimui iš įvairių užsakovų buvo pristatomi į Nacionalinę visuomenės sveikatos priežiūros laboratoriją (NVSPL), Klaipėdos skyriaus mikrobiologinių tyrimų poskyrį. Tirti tik tinkami tyrimui (t.y. reprezentatyvūs, kurie buvo nesugadinti ir nepasikeitę dėl kt. priežasčių) ėminiai. Šiame darbe neaprašomas ėminių ėmimas. Kaip paimti ėminį, nurodoma produktui tirti skirtame standarte. Jei tokio standarto nėra, suinteresuotos šalys šiuo klausimu susitardavo. Visi ėminiai buvo analizuojami tą pačią dieną.

Tirtos maisto žaliavos ir produktai skirstomi į grupes:

- pienas ir pieno produktai,
- mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros,
- kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai,
- žuvis ir jū produktai,
- žali kiaušiniai,
- žalios daržovės ir vaisiai,
- gaivieji gėrimai ir alus,
- konditerijos gaminiai,
- kiti gaminiai.

Maisto žaliavų ir produktų mikrobiologiniai tyrimai *L. monocytogenes* aptikimui laboratorijoje atliekami pagal galiojančius standartizuotus metodus nuo 2001 metų.

L. monocytogenes aptikimui taikytas akredituotas standartas LST EN ISO 11290-1:2003 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimas ir skaičiavimas. Bendrasis metodas. 1 dalis. Aptikimo metodas. (angl. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996)*) bei jo keitinys LST EN ISO 11290-1:2003/A1:2005 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimas ir skaičiavimas. Bendrasis metodas. 1 dalis. Aptikimo metodas. 1 keitinys. Išskiriamosios terpės ir hemolizės tyrimo pakeitimas, glaudumo duomenų pateikimas. (angl. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method. Amendment 1. Modification of the isolation medium and the hemolysis test, inclusion of precision data (ISO 11290-1:1996/AM 1:2004)*).

Analizė apie laboratorijoje 2001-2008 metais tirtas maisto žaliavas ir produktus bei išskirtas *L. monocytogenes* bakterijas atlikta 2007–2009 metų laikotarpyje (1 lentelė, 1 priedas).

1 lentelė. NVSPL ištirtų maisto žaliavų ir produktų kiekis.

Tyrimo data	Ėminių kiekis
2001	1754
2002	4090
2003	7177
2004	9071
2005	10437
2006	8956
2007	8425
2008	6786

Darbo metu, kartu su mikrobiologiniais *Listeria monocytogenes* tyrimais buvo išanalizuotas Lietuvos gyventojų sergamumas listerioze 2003–2008 metais naudojantis Užkrečiamųjų ligų profilaktikos ir kontrolės centro (ULPKC) duomenimis (2 priedas).

2 lentelė. ULPKC užregistruoti užsikrėtusiųjų atvejai.

Data	Užregistruoti atvejai
2003	2
2004	1
2005	2
2006	4
2007	4
2008	7
Viso per analizuotą laikotarpį	20

2.2. Tyrimui naudotos mitybinės terpės ir reagentai

Terpėms ruošti naudotos vienodos kokybės sudedamosios dalys ir tokio pat analizinio grynumo klasės cheminės medžiagos; arba paruoštos dehidratuotos terpės. Visų aprašytų terpių sudėtis, paruošimas, išpilstymas, sterilizacija, laikymas ir kontrolė nurodyti darbo 3 priede.

PASTABA: gaminamų mitybinių terpių kokybės kontrolė buvo atliekama remiantis patvirtinta darbo instrukcija.

1. Selektivityvoji pirminio pagausinimo terpė (pusės stiprumo Frazerio sultinys) - esant sumažintai selektyviųjų medžiagų koncentracijai;
2. Selektivityvoji antrinio pagausinimo terpė (Frazerio sultinys) - esant didelei selektyviųjų medžiagų koncentracijai;
3. Pirmoji selektyvi standi sėjimo terpė - *Listeria* agaras pagal Ottaviani ir Agosti (ALOA) (arba Oksfordo agaras (Oxford));
4. Antroji selektyvi standi sėjimo terpė - PALKAM'o agaras (arba *Listeria* agaras pagal Ottaviani ir Agosti (ALOA) (arba Oksfordo agaras (Oxford)));
5. Triptono sojos mielių ekstrakto agaras (TSMEA) - standžioji mitybos terpė;
6. Avies kraujo agaras;
7. Angliavandenių (ramnozės ir ksilozės) testas;
8. Agaras judrumui nustatyti;
9. CAMP (Christie, Atkins, Munch - Petersen) testas ir tiriamos kultūros (pvz. *S. aureus* ATCC 25923, *L.monocytogenes* ATCC 19117, *L. innocuae* ATCC 33090);
10. Vandens peroksido tirpalas;

2.3. Tyrimui naudota įranga ir indai

Naudota įprasta ir speciali mikrobiologijos laboratorijai skirta įranga ir indai. Jų naudojimas, priežiūra, valymas, sterilizavimas ir kalibravimas aprašyti laboratorijos darbo instrukcijose. **PASTABA:** Vietoj daugkartinių stiklinių indų gali būti naudojami vienkartiniai, panašūs indai.

- Sausojo sterilizavimo įranga (džiovinimo spinta) - galinti palaikyti 170-175° C temperatūrą ir užmušanti mikroorganizmus sausu karščiu. Joje sterilizuojami tik metaliniai ir stikliniai indai;
- Drėgnojo sterilizavimo įranga (autoklavas) - galintis palaikyti 121±1° C temperatūrą;
- Termostatai - palaikantys 25±1°, 30±1°, 37±1° C temperatūrą;
- Svarstyklės - sveriančios ± 0,01g tikslumu naudojamos mėginio porcijos svėrimui;
- Peristaltinis homogenizatorius;
- Vandens vonelė - palaikanti nuo 47±2° C temperatūrą;
- Laminaras – su horizontalia laminarine srove, Hepa filtrais;
- PH-metras - kurio kalibravimo tikslumas ±0,1 pH vienetų esant 25° C temperatūrai, o minimali matavimo riba 0,01 pH vieneto;
- Mikroskopas – didinantis 500X;

- Petri lėkštelės – naudojamoms stiklinėms arba plastikinėms Petri lėkštelėms 90-100 mm skersmens;
- Graduotos pipetės – 1 ±0,01 ml iki 10 ml, graduotos po 0,1 ml ir 0,5 ml;
- Vienkartinės kilpelės;
- Buteliukai ir kolbutės – 500 ml talpos, mitybinės terpės laikymui;
- Mėgintuvėliai – 15 ml talpos;
- Stikliniai matavimo cilindrai ir kolbos;
- Homogenizavimo maišeliai;
- Objektiniai mikroskopavimo stikliukai.

2.4. Mėginių paruošimas tyrimui ir tyrimo eiga

Tiriamieji mėginiai ir pradinė suspensija buvo ruošiami pagal specialųjį kiekvienos žaliavos ar produkto standartą.

Monocitogeninių listerijų aptikimo tyrimo schema pavaizduota 10 paveiksle.

Pradinės suspensijos ruošimas. Skiediklis yra selektyvioji pirminio pagausinimo terpė (pusės stiprumo Fraserio sultinys). 25 g arba 25 ml tiriamojo mėginio dedama į 225 ml arba 225 g selektyvios pagausinimo terpės. Mėginio ir terpės santykis turi būti 1:10 (masė ir tūris arba tūris ir tūris). Homogenizuojama peristaltiniame homogenizatoriuje 30 – 60 sekundžių.

Pirminis pagausinimas. Paruošta pradinė suspensija laikoma 24 ± 2 h, 30 °C temperatūroje.

PASTABA Inkubuojant medžiaga gali nusidažyti juodai.

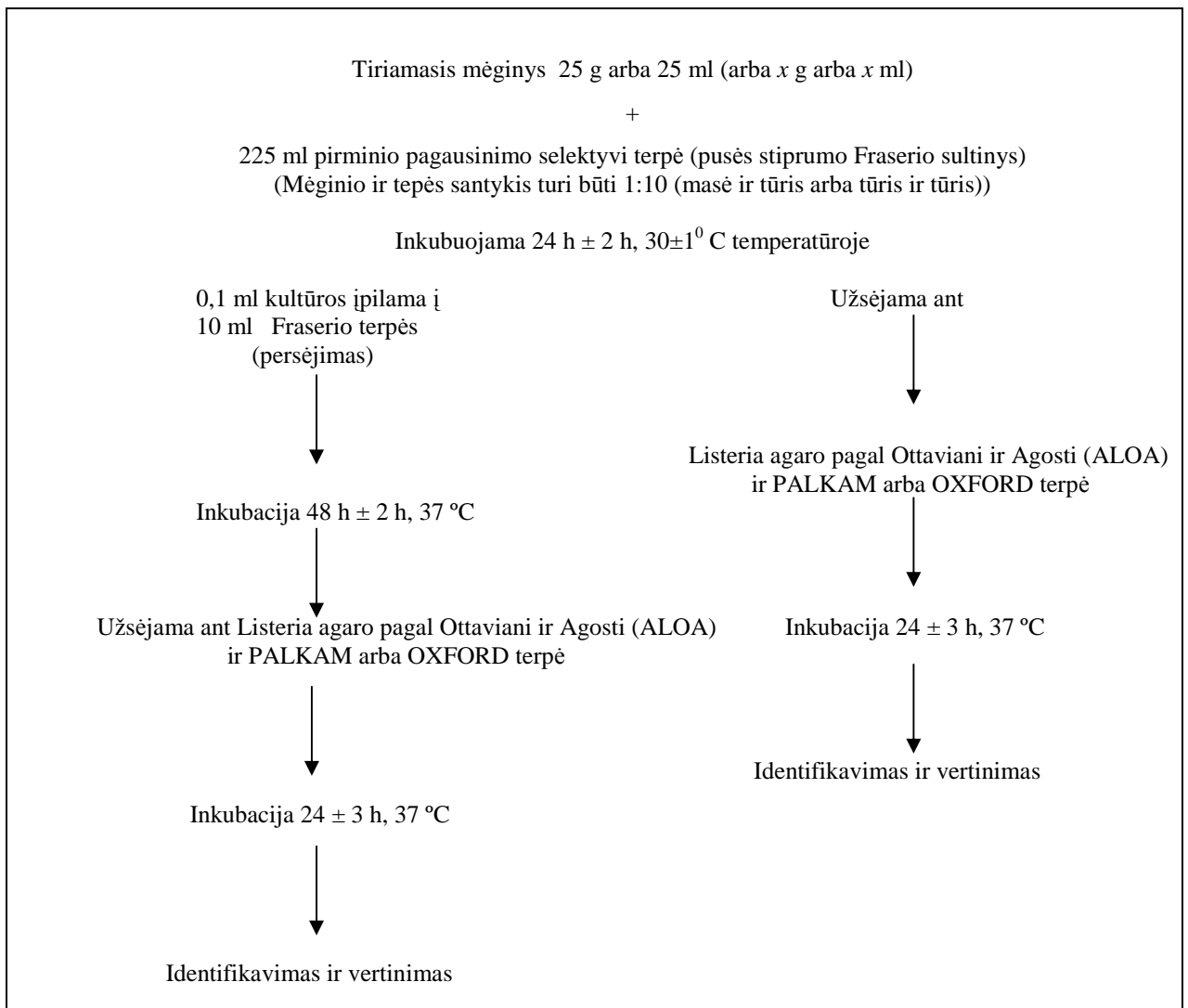
Antrinis pagausinimas. Po pirminio pagausinimo inkubavimo 0,1 ml gautos kultūros (neatsižvelgiant į spalvą) pasėjama į 10 ml antrojo pagausinimo terpės (Fraserio sultinio). Inkubuojama 48 ± 2 h, 37 °C temperatūroje.

Sėjimas. Sterilia kilpele paimama pirminio pagausinimo kultūros (pusės stiprumo Fraserio sultinio) ir užsėjama ant pirmos selektyvios agarų terpės (*Listeria* agarų pagal Ottaviani ir Agosti (ALOA)) paviršiaus taip, kad užaugtų atskiros kolonijos.

Tokiu pat būdu užsėjama antroji selektyvioji terpė (PALKAM'o agaras arba Oxfordo agaras).

Tokia pat procedūra atliekama ir su antrojo pagausinimo terpe (Fraserio sultinio), kuri buvo inkubuota 48 ± 2 h, 37 °C temperatūroje.

Inkubavimas. Visos užsėtos lėkštelės apverčiamos ir dedamos į 37° C temperatūros termostatą 24 ± 3 h. **PASTABA** Papildomai inkubuojama 24 ± 3 h, kai augimas silpnas arba kai nėra kolonijų.



10 pav. Monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimo schema [paruošta remiantis 30, 31].

2.5. Tyrimo rezultatų identifikavimas ir vertinimas

Po inkubavimo apžiūrima, ar yra įtariamų *Listeria spp.* kolonijų:

- *Listeria* agare pagal Ottaviani ir Agosti (ALOA) listerijų kolonijos - žalsvai žydros spalvos, apsuptos nepermatoma zona (būdingos kolonijos).

PASTABA Kai kurių *L. monocytogenes* padermių kolonijos būna apsuptos labai silpna zona (net gi be zonos) šoko atveju, ypač rugšties šoko. Kitos patogeninių *L. monocytogenes* padermės, pasižymi žemu fosfatidilinizitolfosfolipazės C (*angl. k.* PIPLC) aktyvumu, aptinkamu, kai inkubavimo trukmė yra ilgesnė, pvz. kaip 4 paros.

- PALKAM'o agare kolonijos yra mažos arba net labai mažos, pilkšvai žalios spalvos, kartais su juodais centrais ir visada apsuptos tamsia zona. Po 48 h inkubavimo *Listeria spp.* kolonijos tampa nuo 1,5 mm iki 2 mm skersmens, žalios spalvos, įdubusiu centru ir juosiamos juodos zonos.

- Oksforo agare po 24 h išaugusios kolonijos mažos (1 mm skersmens), pilkšvos spalvos, apsuptos tamsia zona. Po 48 h kolonijos patamsėja, gali žalsvai švytėti, skersmuo 2 mm, aureolės juodos, centrai įdubę.

***Listeria spp.* patvirtinimas.** Iš kiekvienos selektyvios agarų lėkštelės (ALOA, PAL-KAM'o) paimamos 5 įtariamoms *Listeria spp.* kolonijoms. Jei vienoje lėkštelėje yra mažiau nei penkios, patvirtinimui imamos visos. Pasirinktos kolonijos sėjamos brūkšniais ant padžiovinto triptono sojos mielių ekstrakto agarų (TSMEA), kad gerai išaugtų pavienės kolonijos. Lėkštelės sudedamos 18 – 24 h į $37\pm 1^\circ\text{C}$ temperatūros termostatą. Išaugusios būdingos kolonijos yra nuo 1 mm iki 2 mm skersmens, išgaubtos, bespalvės, nepermatomais kraštais. Išaugusios kolonijos vertinamos kaip aprašyta žemiau.

Katalazės testas – ant objekcinio stiklelio užlašinamas lašas vandenilio peroksido tirpalo ir sterilia kilpele įdedama gauta kultūra. Katalazės testas teigiamas (+), jei lašas intensyviai puoja.

Dažymas Gramo būdu – imama atskiros kolonijos ir dažoma Gramo būdu. *Listeria spp.* yra gramteigiamos, smulkios ($0,5 - 0,2\ \mu\text{m} \times 0,4 - 0,5\ \mu\text{m}$) polimorfiškos lazdelės.

Judrumo testas (jeigu reikalingas) – iš TSMEA būdingos kolonijos paimta kultūra įsmeigiama į agarą judrumui nustatyti. Inkubuojama 48 h, $25\pm 1^\circ\text{C}$ temperatūroje. Vertinamas augimas smeigimo vietoje. *Listeria spp.* auga po agarų viršutiniu sluoksniu ir yra judrios, skėčio formos kolonijos. Jeigu auga nepakankamai, pasėli galima inkubuoti dar 5 paras ir vertinti smeigimo vietoje.

***Listeria monocytogenes* patvirtinimas (2 lentelė)**

Hemolizė – jeigu morfologinės, fiziologinės savybės ir katalazės testas yra būdingi *Listeria spp.*, norint nustatyti hemolizę, reikia užsėti lėkštelę su avies kraujo agaru. Lėkštelių su avies kraujo agaru paviršius padžiovinamas. Kilpele paimamos atskiros kolonijos nuo TSMEA terpės ir užsėjamos sektoriais. Baigiant sėti kiekvieną sektorių, kilpelė įsmeigiama giliai į terpę. Taip lygiagrečiai ant lėkštelės užsėjamos teigiama (*L. monocytogenes* ATCC 19117) ir neigiama (*L. innocua* ATCC 33090) kontrolinės kultūros. Inkubuojama $24\ \text{h} \pm 2\ \text{h}$ 37°C temperatūroje.

Tiriamos ir kontrolinės kultūros *L. monocytogenes* patvirtinama, kai yra siaura šviesi, skaidri zona (β -hemolizė). *L. innocua* pasėlio vietoje skaidrios zonos nėra (11 pav., 3 lentelė) *L. seeligeri* hemolizė pilna. *L. ivanovii* β -hemolizės zona plati ir aiški. Lėkštelės apžiūrimos ryškioje šviesoje, lyginant tiriamąsias ir kontrolines kultūras.



11 pav. *L. monocytogenes* ir *L. innocua* pasėlių hemolizės zonos.

Angliavandenių skaidymas – ant TSMEA išaugusi kultūra kilpele išsėjama į ramnozės ir ksilozės sultinius. Pasėliai inkubuojami 37° C temperatūroje nuo 24 h iki 48 h. Geltona ramnozės, raudona ksilozės spalvos – teigiama reakcija (gaminama rūgštis) (3 lentelė).

3 lentelė. *Listeria spp.* identifikavimo reakcijos [30, 31].

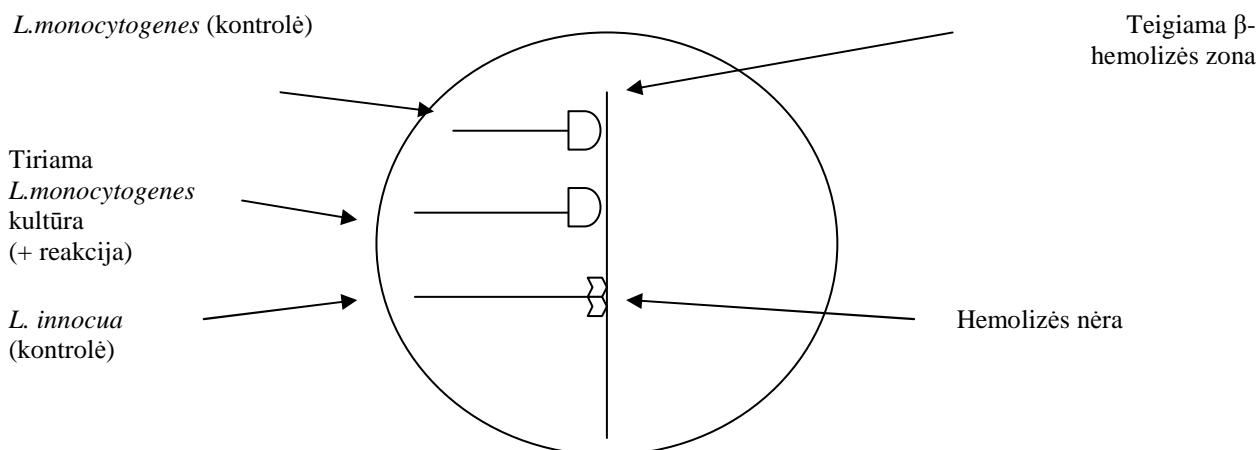
Rūšis	Hemolizė	Angliavandenių skaidymas		CAMP testas	
		Ramnozė	Ksilozė	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi subsp. murrayi</i>	-	V	-	-	-
V – kintanti reakcija (+) – silpna teigiama reakcija + – teigiama reakcija daugiau kaip 90 % – neigiama reakcija					
PASTABA Yra retos <i>L. monocytogenes</i> kultūros, kurios šioje ISO 11290 dalyje aprašytomis sąlygomis nerodo β-hemolizės ar teigiamo CAMP testo.					

CAMP testas – skersai avies kraujo agaro lėkštelės užsėjama linija *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kultūros. Pasėlis turi būti siauras ir lygus. Sėjant kilpele reikia laikyti tinkamu kampu. Tokiu pat būdu stačiu kampu šiai kultūrai užsėjama išskirta tiriamoji kultūra. Tiriamoji kultūra negali liestis su *Staphylococcus aureus* (mažiausias atstumas tarp jų turi būti nuo 1 mm iki 2 mm). Į tą pačią lėkštelę galima sėti keletą tiriamųjų kultūrų. Taip pat stačiu

kampu horizontaliai sėjamos kontrolinės *L. monocytogenes* (pvz. *L. monocytogenes* ATCC 19117) ir *L. innocua* (pvz. *L. innocua* ATCC 33090) kultūros.

Lėkštelės inkubuojamos 37° C temperatūroje nuo 18 h iki 24 h.

Maža padidėjusios β-hemolizės (nuo 2 iki 4 mm) zona tarp tiriamosios kultūros ir *S. aureus* vertinama kaip teigiama reakcija. *S. aureus* ir *L. innocua* srityje hemolizės zonos nėra (12 pav.).



12 pav. Sėjimo į lėkšteles, atliekant CAMP testą ir vertinimą, schema.

Tyrimų rezultatų vertinimas. *L. monocytogenes* yra mažos, gramteigiamos, judrios lazdelės. Katalazės testas – teigiamas, hemolizė – teigiama, skaldo ramnozė, ksilozės neskaldo, CAMP testas su *S. aureus* teigiamas.

Rezultatas pateikiamas *Listeria monocytogenes* aptikta / neaptikta tiriamojo mėginio kiekyje (25 g (ml)).

2.6. Duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant statistinį programų Statgraphics plus (angl. *StatGraphics v2.1+ for Windows*) paketą ir Microsoft Office Excel 2003 metų programą.

Duomenys apskaičiuoti vidurkiu ir standartiniu nuokrypiu.

Ryšiiui tarp kintamųjų įvertinti naudota regresinė duomenų analizė. Ar regresinė kreivė atitinka duomenis parodo apskaičiuotas determinacijos koeficientas, kuris yra lygus koreliacijos koeficiento kvadratui ir parodo, kiek procentų nagrinėjamojo veiksnio reikšmių išsibarstymo paaiškina regresijos lygtis. Determinacijos koeficientas žymimas R^2 ir apibrėžiamas santykiu: regresinio nuokrypio kvadratų suma (KSR)/ bendro nuokrypio kvadratų suma (KSB). Determinacijos koeficientas kinta nuo 0 iki 1. Kuo R^2 arčiau vieneto, tuo regresinė kreivė geriau

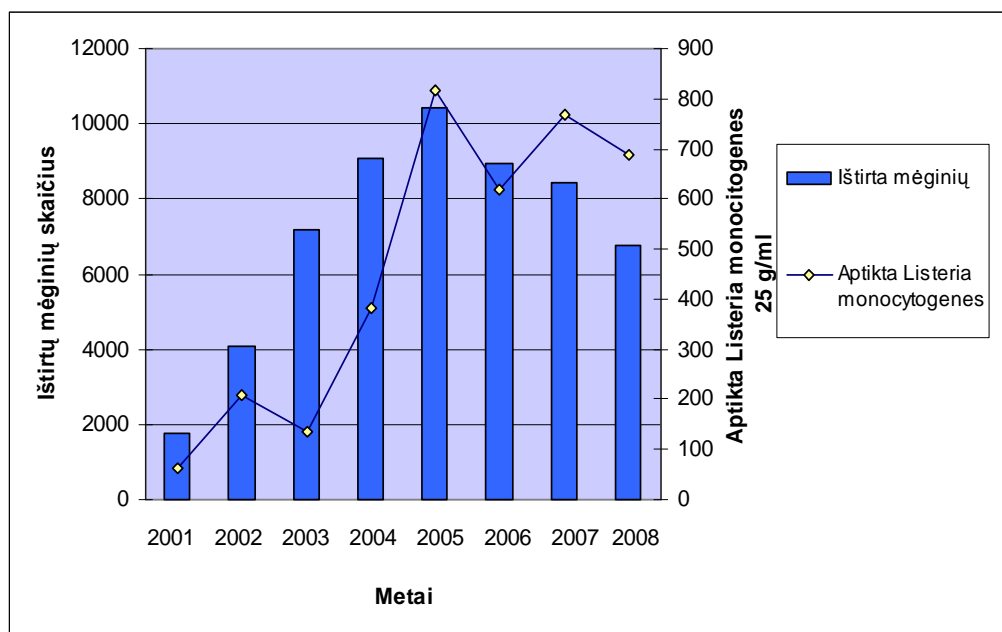
tinka eksperimentiniams duomenims. Pavyzdžiui, kai $R^2=0,7$, galima teigti, kad 70% y variacijos yra paaiškinama nepriklausomu kintamuoju x .

Patikimam skirtumui tarp imčių įvertinti taikyti neparametriniai kriterijai. Dviem nepriklausomoms imtims palyginti buvo naudotas Mano-Vitnio (Mann-Whitney, U) kriterijus. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, jeigu paklaidos tikimybės reikšmė $p < 0,01$.

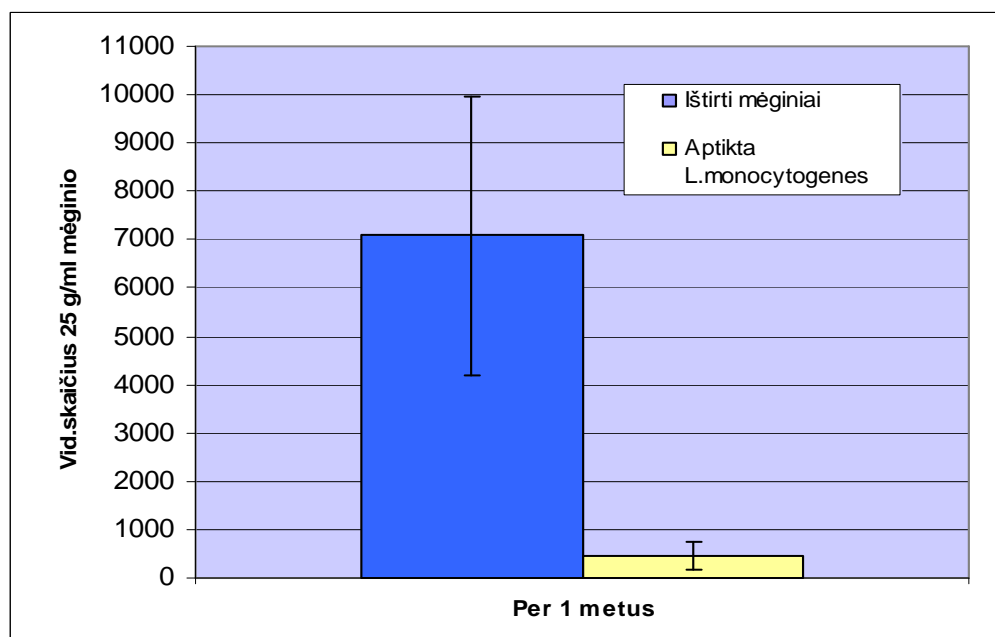
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. *Listeria monocytogenes* dinamika maisto žaliavose ir produktuose

2001-2008 metais ištyrus 56 696 maisto žaliavų ir produktų 25 g (ml) mėginius mikrobiologiniu listerijų aptikimo metodu buvo nustatyta, kad *Listeria monocytogenes* bakterijų buvo aptikta kiekvienais tyrimo metais (13 pav.). Per metus vidutiniškai ištirta $7087 \pm 2877,59$ maisto žaliavų ir produktų mėginių, kuriuose vidutiniškai aptikta $459,5 \pm 300,35$ *L. monocytogenes* bakterijų (žr. 14 pav.).



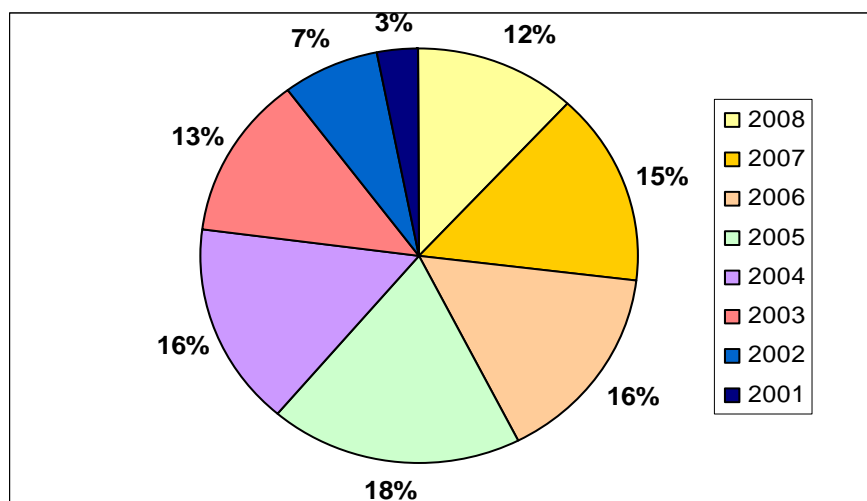
13 pav. Ištirtų mėginių ir aptiktų listerijų skaičius nuo 2001 iki 2008 metų.



14 pav. Vidutinis per metus ištirtų mėginių, kuriuose aptikta *L. monocytogenes* bakterijų, skaičius.

Nustatyta, kad didžiausias maisto produktų ir žaliavų užkrėstumas *L. monocytogenes* bakterijomis buvo 2005 metais (13 pav).

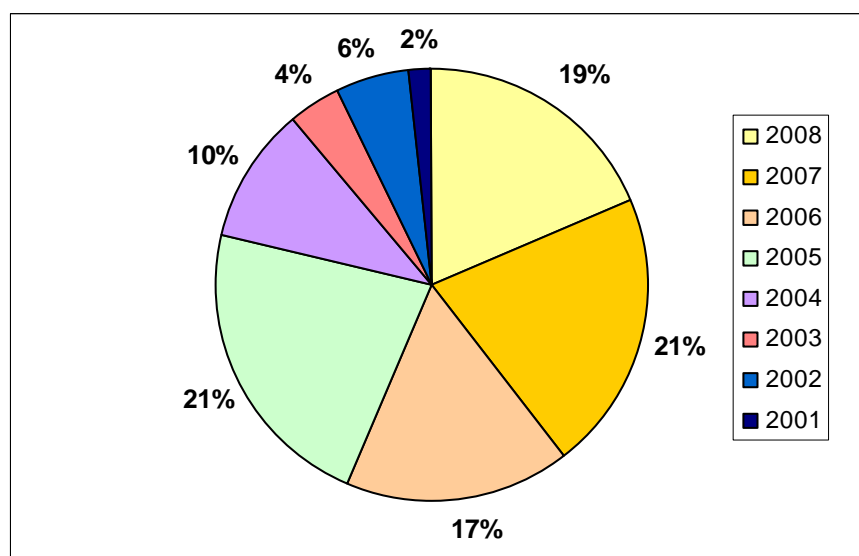
Analizuojant tiriamąjį laikotarpį daugiausiai (18%) ištirta mėginių 2008 metais, 2006 ir 2004 metais tirtų mėginių skaičius buvo panašus – 16%, kitais metais ištirta - 15% ir mažiau viso mėginių skaičiaus.



15 pav. Ištirtų mėginių skaičius (%) nuo 2001 - 2008 metų

Palyginus tirtu laikotarpio duomenis būtų galima manyti, jog augant tyrimų skaičiui daugėja ir aptiktų listerijų skaičius, tačiau nustatyta, kad nuo 2002 iki 2003 metų padidėjus tyrimų skaičiui nuo 7% iki 13% listerijų buvo aptikta 2%-ais mažiau – atitinkamai 6% ir 4%. 2006 ir 2007 metų duomenimis ištirtų mėginių skaičius sumažėjo 1%, tačiau *L. monocytogenes* aptikimas padidėjo nuo 17% iki 21% (15-16 pav.).

2004, 2006 ir 2007 metais ištirtų mėginių skaičius buvo panašus (15 pav.), tačiau mėginių, kuriuose aptikta patogeninių bakterijų skaičius ryškiai svyruoja nuo 10 % iki 17 % ir 21% (16 pav.).



16 pav. Neatitikusių higienos normų dėl išaugintų *L. monocytogenes* mėginių skaičius (%) nuo 2001-2008 metų.

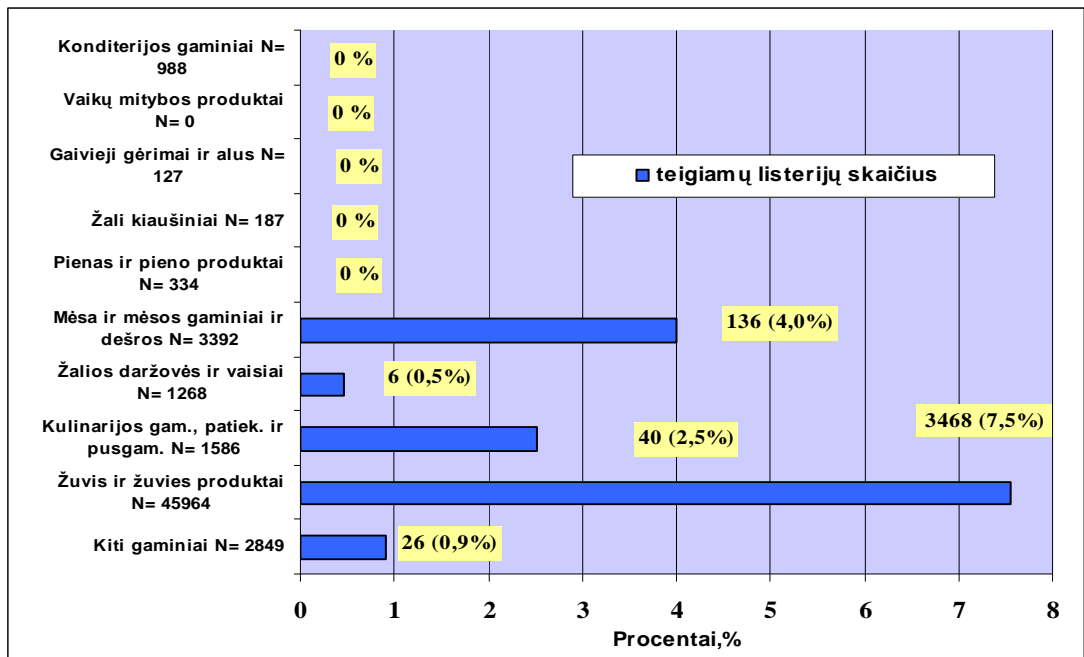
Kaip matyti iš 4 lentelės daugiausiai *L. monocytogenes* aptikta (433,5±286,18) žuvyje ir žuvies produktuose. Mažiausiai listerijų rasta buvo žaliose daržovėse ir vaisiuose, kulinarijos gaminiuose, patiekaluose, pusgaminiuose bei kituose gaminiuose.

Per tą patį minimą laikotarpį, t.y. 2001-2008 metais, nemažai listerijų taip pat aptikta mėsoje ir jos gaminiuose – vidutiniškai per metus 17±46,49, bei įvairiuose kulinarijos gaminiuose ir pusgaminiuose – 5±14,14. Gėrimuose, konditerijos gaminiuose, piene ir jų produktuose bei žaliuose kiaušiniuose *Listeria monocytogenes* neaptikta.

4 lentelė. Vidutiniškai per metus ištirtų maisto žaliavų ir produktų bei juose aptiktų *Listeria monocytogenes* skaičius.

Maisto žaliavų ir produktų grupės	Vidutinis ištirtų maisto žaliavų ir produktų skaičius 25 g/ml	Vidutinis, neatitikusių higienos normų dėl išaugintų listerijų, skaičius 25 g/ml
Gaivieji gėrimai ir alus	15,88 ± 12,99	0
Kiti gaminiai	356,13 ± 173,62	3,25 ± 5,34
Konditerijos gaminiai	123,5 ± 73,65	0
Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	198,25 ± 193,21	5 ± 14,14
Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	424 ± 289,57	17 ± 46,49
Pienas ir pieno produktai	41,75 ± 26,26	0
Žali kiaušiniai	23,38 ± 11,39	0
Žalios daržovės ir vaisiai	158,63 ± 99,97	0,75 ± 1,39
Žuvis ir žuvies produktai	5745,5 ± 2641,82	433,5 ± 286,18

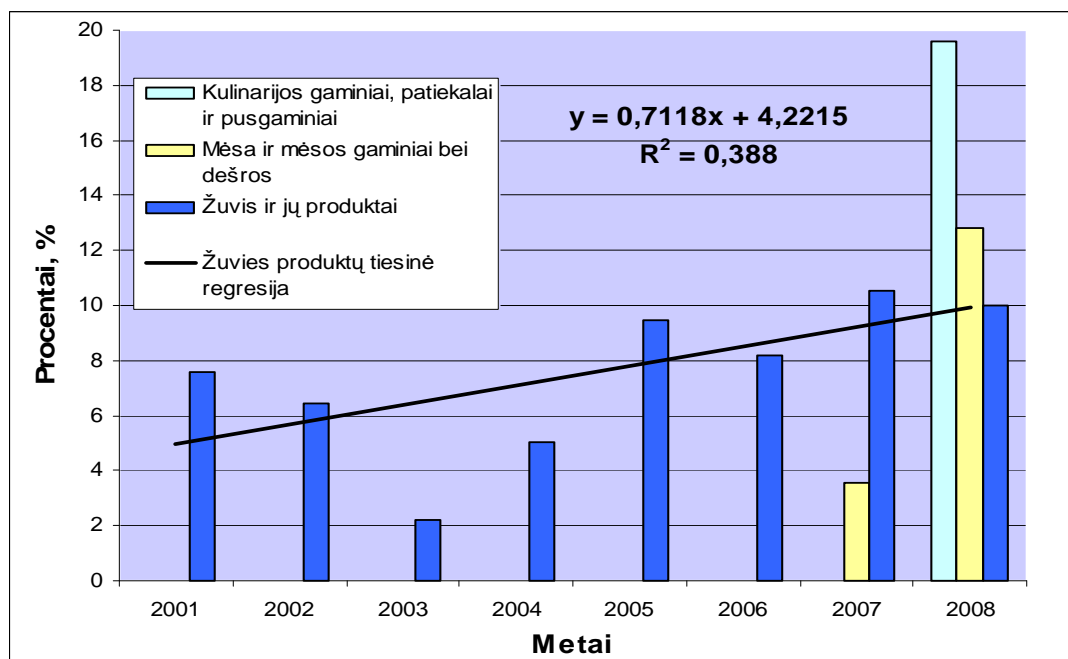
Visą tyrimo laikotarpį listerijų paplitimas žuvyje bei jos produktuose buvo intensyvesnis (7,5 %) nei kituose produktų grupėse. Antroje vietoje - mėsa bei mėsos gaminiai (4,0 %). 2,5 % patogeninių bakterijų rasta kulinarijos gaminiuose, patiekaluose ir pusgaminiuose. Žaliose daržovėse, vaisiuose ir kituose gaminiuose aptiktų listerijų skaičius nesieke 1% (19 pav.).



17 pav. *Listeria monocytogenes* paplitimas maisto produktuose (%), 2001-2008 m.

Nubraižius tiesinės regresijos kreivę ir apskaičiavus determinacijos koeficientą matyti, kad labiausiai užkrėstų listerijomis produktų (t.y. žuvies ir jos produktų) skaičius kasmet didėja beveik 39% (18 pav.).

Grafikas taip pat parodo, kad 2008-aisiais metais ypač išaugo listerijų aptikimas kulinarijos gaminiuose, patiekaluose bei pusgaminuose ir mėsos bei jos gaminiuose. Žuvyje bei jos produktuose *L. monocytogenes* aptikimas per tiriamąjį laikotarpį nuolat svyravo (18 pav.).



18 pav. Žuvies ir jų produktų tiesinė regresijos kreivė su apskaičiuotu determinacijos koeficientu R^2 užkrėsti *L. monocytogenes* bakterijomis.

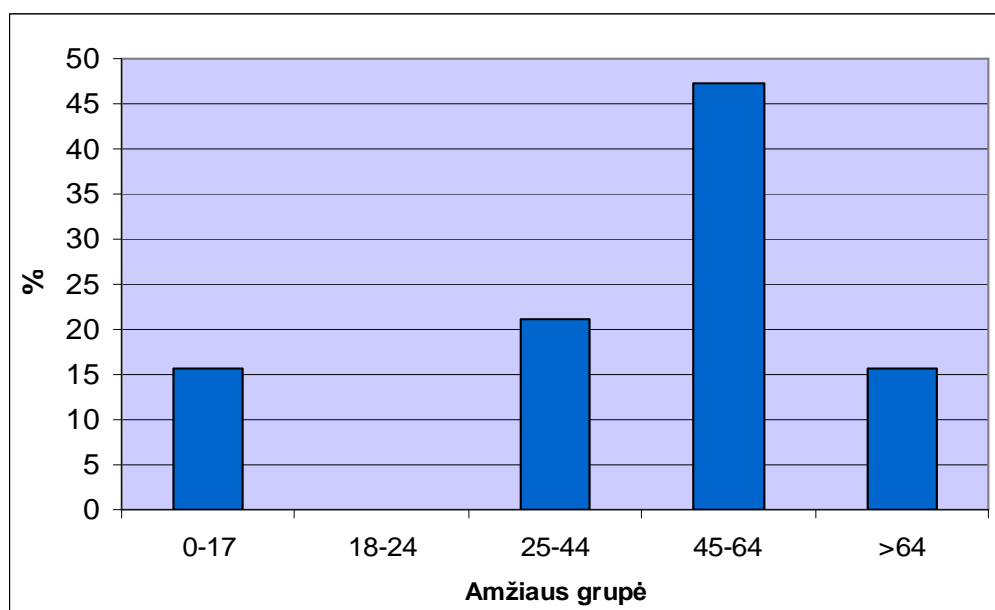
3.2. 2003–2008 metų sergamumo listerioze Lietuvoje analizė

Užkrečiamųjų ligų profilaktikos ir kontrolės centro duomenimis 2003–2008 metais listerioze užsikrėtė 20 žmonių (2 priedas). Iš jų 8 vyrai ir 9 moterys, 3 asmenų lytis (2003 ir 2004 metais) nežinoma.

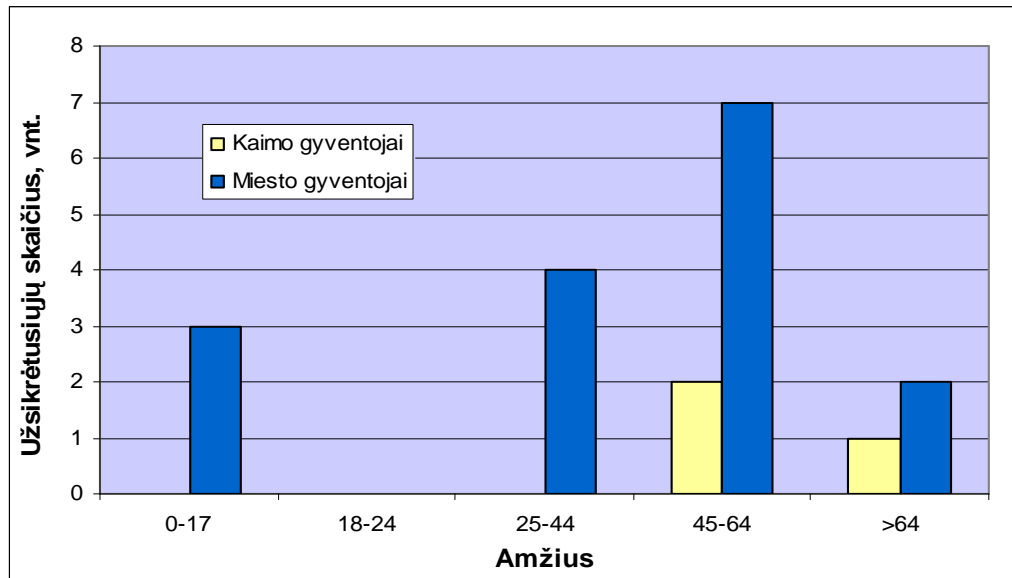
Nustatytas bendras sergamumo dažnis Lietuvoje buvo 0,6:100 000 gyventojų per šešerius metus.

Palyginus užsikrėtusiuosius pagal amžiaus grupes, nustatyta, kad daugiausiai - 9 žmonės (47%) yra 45–64 metų amžiaus grupėje. Iš jų didžiąsą dalį sudarė miesto gyventojai - 7 žmonės (20 pav.). Sergančiųjų skaičius nuo 0-17 metų ir daugiau kaip 64 metų amžiaus žmonių grupėse buvo beveik 16%. 25-44 metų amžiaus pacientai sudarė 21% visų susirgusiųjų. Per penkerius metus (t.y. nuo 2003 iki 2008 m.) asmenims nuo 18 iki 24 metų amžiaus ligos atvejų neužfiksuota (19 pav.).

Skirtumas tarp sergančių miesto ir kaimo vietovėse įvertintintas taikant Mann-Whitney U testą buvo statistiškai reikšmingas. Mieste užsikrėtusių žmonių daugiau nei kaime ($p < 0,01$) (20 pav.).



19 pav. Žinomi listeriozės atvejai (%) LTU pagal žmonių amžiaus grupes, 2003-2008 m.



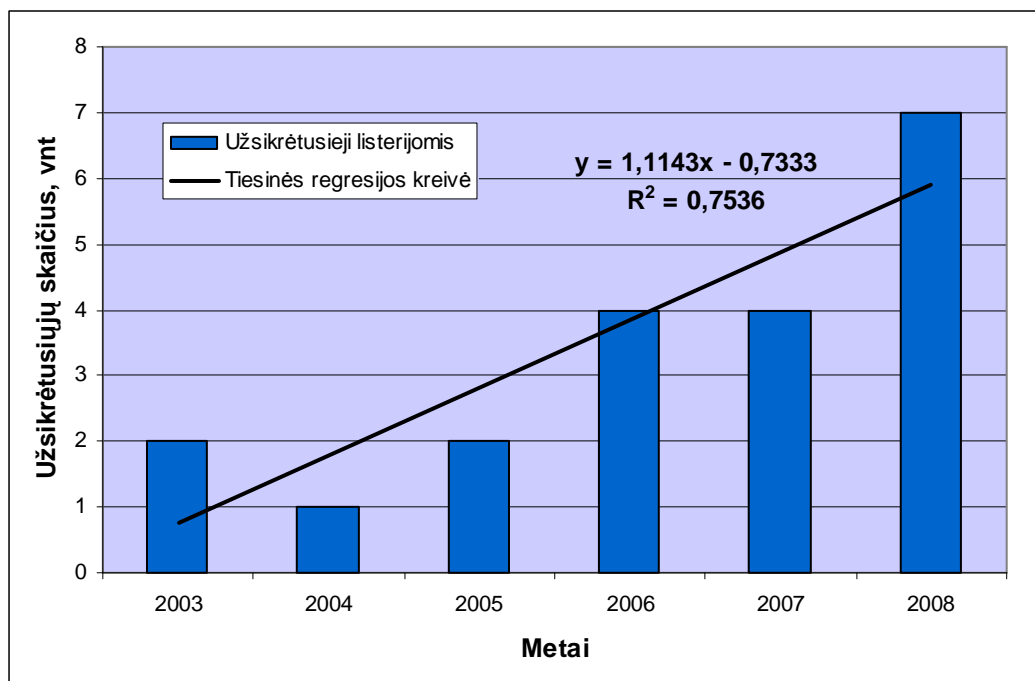
20 pav. Žinomi listeriozės atvejai LTU pagal žmonių amžiaus grupes ir gyvenimo vietą, 2003-2008 m.

Kaip matyti grafike (21 pav.), bendras sergamumas listerioze nuo 2003 metų (10%) iki 2008 metų išaugo iki 35%. Mažiausiai listerioze sirgo 2004 metais – 5% gyventojų. Per tuos metus mirė 4 žmonės.



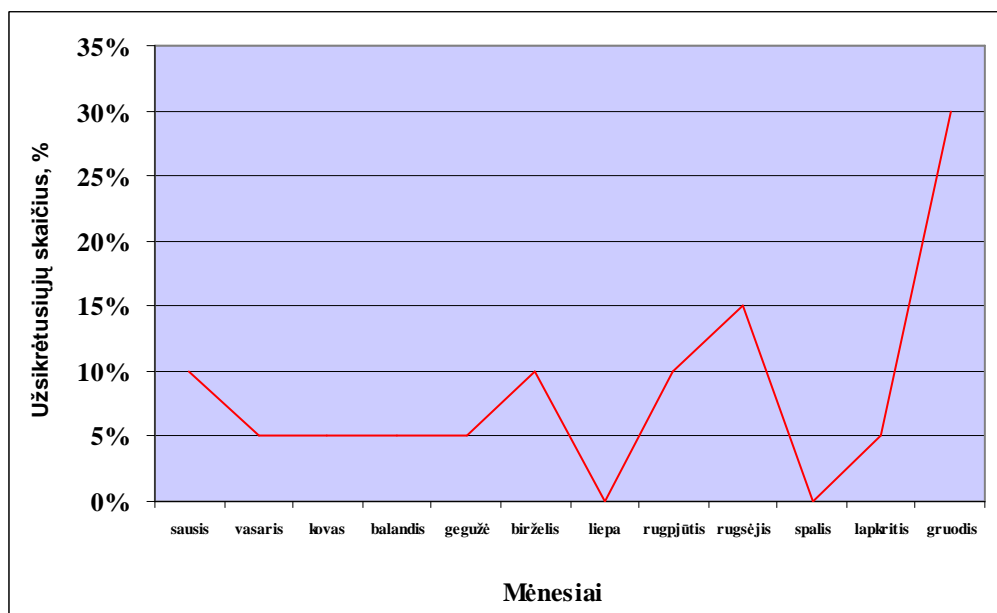
21 pav. Sergamumas listerioze (%) LTU nuo 2003-2008 m.

Apskaičiuotas determinacijos koeficientas ($R^2=0,75$) rodo, kad sergamumas kas metai didėjo 75%. 2004 metais susirgusių buvo 1, 2003 ir 2005 metais – po 2, 2006 ir 2007 – po 4, o 2008 – 7 žmonės (22 pav.).

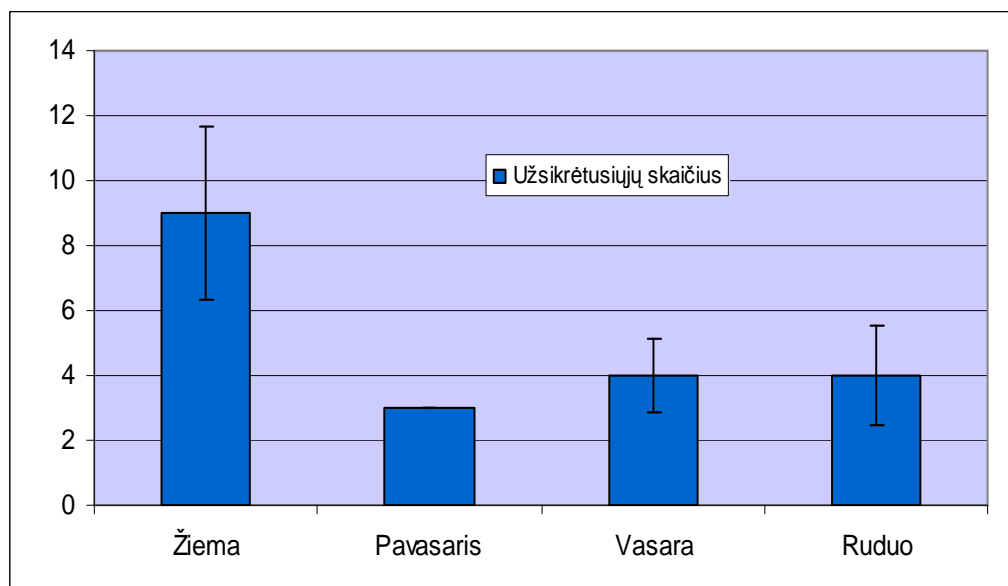


22 pav. Segamumo listerioze tiesinė regresijos kreivė ir apskaičiuotas determinacijos koeficientas R^2 .

Listeriozei Lietuvoje būdingas sezoniškumas. Daugiausiai susirgimų registruojama gruodžio (30%) ir rugsėjo (15%) mėnesiais. Mažiausiai – nuo vasario iki gegužės mėnesių (5%) (23 pav). Vis dėlto dažniausiai sergama žiemą (9 žmonės), kiek mažiau vasarą, rudenį (po 4 žmones), pavasarį - 3 (24 pav.).



23 pav. Sergamumo listerioze (%) LTU sezoniškumas 2003-2008 m.



24 pav. Sergamumo listerioze LTU sezoniškumas 2003-2008 m.

3.3. Tyrimų rezultatų aptarimas

Atlikus tyrimus galima nusakyti *Listeria monocytogenes* paplitimo dinamiką maisto žaliavose ir produktuose bei spręsti apie jų kokybę ir saugumą.

Lyginant atliktų tyrimų rezultatus su kitų autorių atliktais darbais, galima teigti, kad tirtose maisto žaliavose ir produktuose NVSPL Klaipėdos skyriuje, kaip ir kitose valstybėse, *L. monocytogenes* dažniausiai aptinkama žuvyje ir jos produktuose. Pagal 2005 metų Europos maisto saugos tarnybos duomenis (žr. 9 pav.) žuvies produktų užkrėstumas listerijomis sudaro lygiai tokią pat dalį kaip ir mėsų laboratorijoje - 7,5%. Taigi, galima teigti, kad žuvis ir žuvies produktai yra vieni iš pavojingiausių maisto produktų, galinčių sukelti listeriozę. Ši žaliava dažnai yra užkrėsta *L. monocytogenes*, galbūt todėl gamybos procese nėra listericidinių operacijų, o produkto laikymo sąlygos (žema t° bei ilga trukmė) yra tinkamos šiam mikroorganizmui augti.

Analizuojant kitų produktų bei žaliavų tyrimus mėsų laboratorijoje mėsa ir jos gaminiai buvo užkrėsti listerijomis kiek daugiau nei 4%, Europoje šis rodiklis nesiekia 3%. Lietuvoje taip pat gan didelį procentą sudaro kulinarijos gaminių, patiekalų ir pusgaminių užkrėstumas – 2,5%. Europoje šių konkrečių produktų užkrėstumas listerijomis nėra aiškus. Pieno produktai, sūriai bei vaisiai ir daržovės Europoje sudaro beveik vieną procentą (0,8%) teigiamų ėminių dėl *L. monocytogenes* bakterijų užkrėtimo, tuo tarpu Klaipėdoje esančioje laboratorijoje tirtose žaliuose daržovėse ir vaisiuose, listerijų aptinkama apie pusę procento ėminių, o piene ir jų produktuose nenustatyta visai.

Atlikta sergamumo listerioze Lietuvoje analizė parodė, kad Lietuvoje daugiausiai sergančiųjų buvo 45-64 metų amžiaus grupėje (47%), kai tuo tarpu Europoje (6 pav.) daugiausiai sirgo vyresni ir pagyvenusio amžiaus žmonės (53% atvejų asmenų buvo virš 65 metų amžiaus). Galima manyti, kad tam įtakos Europoje gali turėti ilgesnė ir geresnė vidutinė tikėtina gyvenimo trukmė, kuri Lietuvoje 2007 metais siekė moterų 77,2, o vyrų 64,9. Kai kitose ES valstybėse narėse vidutinė gyvenimo trukmė — 78 metai [61].

Šių rezultatų negalima sieti vien su vidutine gyvenimo trukme kaip sergamumą apsprendžiančiu veiksniu. Tam įtakos gali turėti mityba bei maisto paruošimas, didėjantis mirtinų apsinuodijimų alkoholiu skaičius ir kitos priežastys. Stebima sergamumo didėjimo tendencija kraujo apytakos ir virškinimo organų ligomis [62].

Kasmet vis didėjantis sergamumas listerioze Lietuvoje (2003 - 2008 metų išaugo nuo 10% iki 35%) rodo, kad *L. monocytogenes* bakterijos yra vis tiksliau identifikuojamos ir diagnozuojamos apsikrėtusiems žmonėms.

Sergamumas listerioze kasmet padidėja beveik 75%, ypač tai būdinga žiemos mėnesiais. Tačiau bendras sergamumas Lietuvoje yra mažesnis nei kitose šalyse tik 0,1:100 000 žmonių populiacijos. Europoje 2005 metais buvo 0,3:100 000 gyventojų, JAV 1996-2001 m. sumažėjo nuo 0,5 iki 0,3:100 000 žmonių populiacijos.

IŠVADOS

Apibendrinant atliktus tyrimų rezultatus ir analizę galima teigti:

1. *L. monocytogenes* daugiausiai aptikta žuvyje ir jos produktuose.
2. Nustatyta, kad mėsa ar kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai taip pat gali būti užkrėsti listerijomis ir įeina į galimą užsikrėtimo maistu rizikos grupę.
3. Nustatyta, kad *L. monocytogenes* bakterijų aptikimas nepriklausė nuo ištirtų maisto žaliavų ir produktų kiekio.
4. Didžiausia sergamumo rizika Lietuvoje pasireiškia nuo 45 iki 64 metų amžiaus asmenims.
5. Mieste gyvenantys žmonės sirgo dažniau nei kaimo gyventojai.
6. Pastebėtas sparčiai augantis susirgimų skaičius nuo 2003 iki 2008 metų.
7. Nustatyta, kad listeriozei būdingas sezoniškumas – daugiausiai susirgimų registruojama gruodžio ir rugsėjo mėnesiais.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Anon. 2000. Food-Borne Zoonoses. European commission Health and Consumer protection Directorate – General Directorate B - Scientific Health Opinions. Unit B3 - Management of scientific committees II.
2. Bacterial pathogen growth and inactivation// Fish and fisheries products hazards and controls guidance. 3rd ed. June 2001. U.S. Food and Drug Administration.
3. Ben Embarek P. K. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in sea-foods// International Journal of Food Microbiology. 1994. Vol.23. P. 17 – 34.
4. Broome C.V., Gellin B., Schwatz B. Epidemiology of listeriosis in the United States// Miller A. J., Smith J. L., Somkuti G. A. Foodborne Listeriosis. Elsevier Science Pub., New York, 1990. P. 61-65.
5. Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated with Pasteurized Milk from a Local Dairy - Massachusetts, 2007. Retrieved November 3, 2008, Prieiga per internetą:
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5740a1.htm>.
6. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Turkey Deli Meat. Retrieved November 3, 2008, Prieiga per internetą:
<http://www.cdc.gov/enterics/publications/422-Gottlieb2005.pdf>.
7. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention// Prieiga per internetą: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html
8. Dharmarha, Vaishali (December 2008). "A Focus on *Listeria Monocytogenes*". National Agricultural Library, Food Safety Research Information Office. Retrieved January 28, 2009. Prieiga per internetą: http://fsrio.nal.usda.gov/document_fsheetsheet.php?product_id=221
9. Doyle, P.M. and L.R. Beuchat, eds. 2007. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington D.C pp. 457-491.
10. Economics of foodborne disease// Prieiga per internetą:
<http://www.ers.usda.gov/briefing/FoodborneDisease/>.
11. El-Kest S. E., Yousef A. E., Marth E. H. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage// Journal of Food Science. 1991. Vol. 56(4). P. 1068-1071.
12. Euzéby J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Listeria*. Prieiga per internetą: <http://www.bacterio.cict.fr/l/listeria.html>.
13. Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*// Lund B. M, Baird-Parker T.C, Gould G.W. the Microbiological Safety and Quality of Foods. Gaithersburg (MD): Aspen, 2000. P. 1178-1232.

14. Farber, J.M. and P.I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Micribiol. Rev.* 55:476-511. Retrieved November 6, 2008, Prieiga per internetą: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372831>.
15. Fenlon D.R., Wilson J., Donachie W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing// *Journal of Applied Bacteriology*. 1996. Vol. 81. P. 641 – 650.
16. Final Diagnosis - *Listeria Monocytogenes* brain abscess, sensitive to Ampicillin and Trimethoprim/Sulfa. Prieiga per internetą: <http://path.upmc.edu/cases/case542/dx.html>.
17. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition, USDA/Food Safety and Inspection Prieiga per internetą: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>
18. Girdzijauskas V. ir kt. Mikrobiologija. Vilnius. 1976. P. 310 – 312.
19. Golden D. A., Arroy Gallyoun L. Relationship of frozen food quality to microbiol survival// *Quality in Frozen Food*. Ed. M.C. Erickson and Y. C. Hung, New Yourk. 1997. P. 484.
20. Herbert Hof. Miscellaneous Pathogenic Bacteria// Prieiga per internetą: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch016.htm>
21. Hitchins Anthony D., Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods, *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 10.
22. Imuninio atsako morfologija. Prieiga per internetą: <http://www.kmu.lt/patologija/3%20dalis.htm>
23. Janzten, M.M., J. Navas, A. Corujo, R. Moreno, V. Lopez, and J.V. Martinez-Suarez. 2006. Review. Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods Using Commercial Methods: From Chromogenic Media to Real-time PCR. *Spanish J. Agri. Research.* 4:235-247. Retrieved December 9, 2008 Prieiga per internetą: http://www.inia.es/gcontrec/pub/235-247-35-R_Specific_1157976609093.pdf.
24. Joji Suzuki, MD, Fellow in Addiction Psychiatry, Department of Psychiatry, Boston University School of Medicine. Coauthor(s): Christopher L Sola, DO, Clinical Assistant Professor, University of Vermont, College of Medicine; Director of Consultation-Liaison Psychiatry, Department of Psychiatry, Maine Medical Center; Olakunle PA Akinsoto, MD, Consulting Staff, Family Health Center, Jacksonville Medical Center, Jun 8, 2006. Prieiga per internetą: <http://emedicine.com/med/topic1319.htm>
25. Karen B Weinstein, MD, FACP, Clinical Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Loyola University; Assistant Attending, Department of Internal Medicine, Rush Medical College; Associate Program Director, West Suburban Medical Center. Coauthor(s): Joanna Ortiz, MD, Infectious Disease Attending Physician, Clinical Instructor, Department

- of Internal Medicine, West Suburban Medical Center. *Listeria monocytogenes*// Jun 23, 2008. Prieiga per internetą: <http://emedicine.com/med/topic1312.htm>
26. KidsHealth. 2008. *Listeria* Infections. Retrieved December 12, 2008. Prieiga per internetą: http://kidshealth.org/parent/infections/bacterial_viral/listeria.html.
27. Quantitative assesment of the relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. FDA/FSIS (U.S. Food and Drug Administration/ USDA Food Safety and Inspection Agency). 2003. www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html.
28. Labbe, R.G. and S. Gracia, eds. 2001. *Guide To Foodborne Pathogens*. Johnwiley & Sons, Inc., New York. Preview Retrieved December 7, 2008. Prieiga per internetą: <http://tinyurl.com/crz7h7>.
29. Lietuvos standartizacijos departamentas - LST 1615:2000 Maisto produktai ir priedai. Mėginių ėmimas ir ruošimas mikrobiologiniams tyrimams
30. Lietuvos standartizacijos departamentas - LST EN ISO 11290-1:2003 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimas ir skaičiavimas. Bendrasis metodas. 1 dalis. Aptikimo metodas. (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996)).
31. Lietuvos standartizacijos departamentas - LST EN ISO 11290-1:2003/A1:2005 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimas ir skaičiavimas. Bendrasis metodas. 1 dalis. Aptikimo metodas. 1 keitinys. Išskiriamosios terpės ir hemolizės tyrimo pakeitimas, glaudumo duomenų pateikimas. (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Amendment 1. Modification of the isolation medium and the hemolysis test, inclusion of precision data (ISO 11290-1:1996/AM 1:2004)).
32. *Listeria monocytogenes* Risk sssessment Questions and Answers. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition. USDA/Food Safety and Inspection Service. October 21, 2003.
33. Lukošienė V., Naujagimių listeriozė// Neonatologijos centras, VUVL, 2008. Prieiga per internetą: <http://www.neonatologija.lt/index.php?id=8>
34. Munroe, S. 2008. Deadly *Listeria* Outbreak in Canada Likely to Grow. Retrieved December 14, 2008. Prieiga per internetą: <http://canadaonline.about.com/b/2008/08/25/deadly-listeria-outbreak-in-canada-likely-to-grow.htm>.
35. Muriana, P. and K. Kushwaha. Food Pathogens of Concern: *Listeria monocytogenes*. Retrieved December 8, 2008.

- Prieiga per internetą: <http://fapc.okstate.edu/files/factsheets/fapc136.pdf>.
36. Narkevičius R. Šaltai rūkytos žuvies saugos užtikrinimo problemos: *Listeria monocytogenes* (apžvalga)// ISSN 1392-0227. Maisto chemija ir technologija. 2004. T.38, Nr. 2. P. 1 – 8.
Prieiga per internetą:
<http://209.85.129.132/search?q=cache:iMU3tV5poiUJ:www.lmai.lt/failai/38-2-Narkevicius.doc+L+monocytogenes&cd=4&hl=lt&ct=clnk&gl=lt>
37. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General (SANCO). 23 September 1999.
38. Peterson M. E., Pelroy G. A., Paranjpye R.N., Poysky F.T., Almond J. S., Eklund M. W. Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging method// Journal of Food Protection. 1993. Vol. 56(11). P. 938 – 943.
39. Pinner R.W. at all. Role of foods in sporadic listeriosis// Journal of the American Medical Association. 1992. Vol 267. P. 2046-2050
40. Pirie J.H.H. 1940. *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. Nature. 145:264.
41. Podolack R. K., Zayas J. F., Kastner C. L., Fung D. Y. C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157-H7 on beef by application of organic acids// Journal of Food Protection. 1996. Vol. 59(4). P. 370 – 373
42. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. Microbiological risk assessment series, No. 4. WHO/FAO, 2004. P.78.
43. Ryser, E.T. and E.H. Marth, eds. 1999. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc. New York. Preview Retrieved November 9, 2008. Prieiga per internetą:
<http://tinyurl.com/c7osnq>.
44. Rosaler Maxine, Epidemics Deadly Diseases Throughout History Listeriosis, P.10. Prieiga per internetą:
http://books.google.lt/books?id=XnNNvxZ__icC&dq=Maxine+Rosaler+Listeriosis&printsec=frontcover&source=bl&ots=Pkd64hecb&sig=iopVnse5_pXMhGHAovP6jkYngDc&hl=lt&ei=89bAScCyM5mJsAbrj_ixDQ&sa=X&oi=book_result&resnum=1&ct=result#PPT7,M1
45. Temple, M.E. and M.C. Nahata. 2000. Treatment of Listeriosis. *The Annals of Pharmacotherapy*. 34: 656-661. Abstract Retrieved December 15, 2008. Prieiga per internetą: <http://www.theannals.com/cgi/content/abstract/34/5/656>.
46. The New York Times Health Guide. 2009. Listeriosis. Retrieved January 3, 2009. Prieiga per internetą: <http://health.nytimes.com/health/guides/disease/listeriosis/overview.html>.

47. Tortora G.J., Funke B.R., Case Ch. L. Fourth Edition Microbiology and Introduction//. 1992. P. 543.
48. Todar, K. 2008. *Listeria monocytogenes*. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Retrieved November 5, 2008. Prieiga per internetą: <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>.
49. U.S. National Library of Medicine// Prieiga per internetą:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/listeriainfections.html>
50. Vasseur C., Baverel L., Hebraud M., Labadie J. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*// *Journal of Applied Microbiology*. 1999. Vol. 86 (3). P. 469 – 476
51. Zagrebnevienė Galina, Listeriozė// Prieiga per internetą:
<http://www.ulpkc.lt/ulpkc.lister.php>
52. Prieiga per internetą: <http://www.ulpkc.lt/ulpkc.ataskaitos.php>.
53. Zoonoses in The European Union, EFSA European Food Safety Authority 2005. Prieiga per internetą: www.efsa.europa.eu
54. Prieiga per internetą: http://encyclopedia.vbxml.net/Listeria_monocytogenes
55. Prieiga per internetą: <http://de.wikipedia.org/wiki/Listerien>
56. Prieiga per internetą: http://en.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes
paveikslėlis - http://phil.cdc.gov/phil_images/10302002/2/PHIL_2287_lores.jpg
57. Prieiga per internetą: <http://www.fooddiagnostics.dk/Produkter.aspx?Produkt=64754>
58. Prieiga per internetą: http://www.labm.com/news_press_release_details.htm?news_id=29
59. Prieiga per internetą: http://sms-home.com/pages/Listeria%20Isolation%20Medium_jpg.htm
60. Prieiga per internetą: <http://bacterio.iph.fgov.be/missions/listeria>
61. Prieiga per internetą: <http://www.stat.gov.lt/lt/pages/view/?id=1924>
62. Prieiga per internetą:
<http://209.85.129.132/search?q=cache:UqKaDM422ksJ:www.rmc.lt/Document/RMC%2520ataskaitos%25202006%2520bukletas.doc+rezultatu+aptarimas+L.monocytogenes&cd=16&hl=lt&ct=clnk&gl=lt>

PRIEDAI

1 priedas

Žinios apie Nacionalinės visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL), Klaipėdos skyriaus mikrobiologinių tyrimų poskyryje tirtus maisto produktus 2001 -2008 metais

Eilės Nr.	Maisto žaliavų ir produktų grupės	Ištirta mėginių	Neatitiko higienos normų dėl išaugintų listerijų (<i>Listeria monocytogenes</i>)
2001 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	81	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	139	0
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	165	0
4.	Žuvis ir žuvies produktai	807	61
5.	Žali kiaušiniai	2	0
6.	Žalios daržovės ir vaisiai	49	0
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	41	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	299	0
10.	Kiti gaminiai	171	0
	Iš viso	1754	61
2002 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	26	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	265	0
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	76	0
4.	Žuvis ir žuvies produktai	3172	205
5.	Žali kiaušiniai	26	0
6.	Žalios daržovės ir vaisiai	155	0
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	19	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	104	0
10.	Kiti gaminiai	247	3
	Iš viso	4090	208
2003 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	47	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	384	0
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	50	0
4.	Žuvis ir žuvies produktai	6040	133
5.	Žali kiaušiniai	27	0
6.	Žalios daržovės ir vaisiai	230	0
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	22	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	97	0
10.	Kiti gaminiai	280	3
	Iš viso	7177	136
2004 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	54	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	479	0
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	137	0
4.	Žuvis ir žuvies produktai	7618	383
5.	Žali kiaušiniai	41	0

6.	Žalios daržovės ir vaisiai	197	0
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	13	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	106	0
10.	Kiti gaminiai	426	0
	Iš viso	9071	383
2005 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	67	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	536	0
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	149	0
4.	Žuvis ir žuvies produktai	8632	814
5.	Žali kiaušiniai	21	0
6.	Žalios daržovės ir vaisiai	267	0
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	1	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	135	0
10.	Kiti gaminiai	629	3
	Iš viso	10437	817
2006 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	39	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	447	0
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	144	0
4.	Žuvis ir žuvies produktai	7490	613
5.	Žali kiaušiniai	20	0
6.	Žalios daržovės ir vaisiai	268	3
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	10	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	90	0
10.	Kiti gaminiai	448	1
	Iš viso	8956	617
2007 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	20	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	113	4
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	661	0
4.	Žuvis ir žuvies produktai	7247	763
5.	Žali kiaušiniai	32	0
6.	Žalios daržovės ir vaisiai	100	0
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	20	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	94	0
10.	Kiti gaminiai	138	0
	Iš viso	8425	767
2008 metai			
1.	Pienas ir pieno produktai	0	0
2.	Mėsa ir mėsos gaminiai ir dešros	1029	132
3.	Kulinarijos gaminiai, patiekalai ir pusgaminiai	204	40
4.	Žuvis ir žuvies produktai	4958	496
5.	Žali kiaušiniai	18	0
6.	Žalios daržovės ir vaisiai	3	3
7.	Gaivieji gėrimai ir alus	1	0
8.	Vaikų mitybos produktai	0	0
9.	Konditerijos gaminiai	63	0
10.	Kiti gaminiai	510	16
	Iš viso	6786	687

rugsējis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
lapkritis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gruodis	1	x	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VISO	1	x	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2005 metai																											
sausis	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
vasaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kovas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
balandis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gegužē	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
birželis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
liepa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rugpjūtis	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rugsējis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
lapkritis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gruodis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VISO	2	1	1	0	2	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2006 metai																											
sausis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
vasaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kovas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
balandis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gegužē	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
birželis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
liepa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rugpjūtis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rugsējis	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
lapkritis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gruodis	3	1	2	0	3	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VISO	4	2	2	1	4	4	2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

2007 metai																												
sausis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
vasaris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
kovas	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
balandis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
gegužē	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
birželis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
liepa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
rugpjūtis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
rugsējis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
spalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
lapkritis	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
gruodis	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
VISO	4	2	2	1	3	3	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
2008 metai																												
sausis	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
vasaris	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
kovas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
balandis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
gegužē	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
birželis	2	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
liepa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
rugpjūtis	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
rugsējis	2	1	1	0	2	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
spalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
lapkritis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
gruodis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
VISO	7	3	4	2	7	6	0	0	0	1	1	3	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	

3 priedas

Mitybos terpių ir reagentų sudėtis, jų paruošimas

1. Pusės stiprumo Fraserio sultinys - selektyvioji pirminio pagausinimo terpė

- Pagrindinė terpė

<u>Sudėtis:</u> Fermentinio gyvulių audinių hidrolizato	5,0 g
Fermentinio kazeino hidrolizato	5,0 g
Jautienos ekstrakto	5,0 g
Mielių ekstrakto	5,0 g
Natrio chlorido	20,0 g
Dinatrio hidrofosfato dihidrato	12,0 g
Kalio dihidrofosfato	1,35 g
Eskulino	1,0 g
Vandens	1000 ml

Paruošimas: Komponentai arba sausoji pagrindinė terpė ištirpinama vandenyje, jeigu reikia, pašildoma. Suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $7,2 \pm 0,2$. Terpė išpilstoma reikiamais kiekiais į tinkamos talpos kolbas. Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

PASTABA Prieš sterilizavimą į terpę (pagrindinę terpę) galima įpilti ličio chlorido tirpalo ir nalidiksino rūgšties natrio druskos tirpalo.

- Ličio chlorido tirpalas

<u>Sudėtis:</u> Ličio chlorido	3 g
Vandens	10 ml

Paruošimas: Ličio chloridas suberiamas į vandenį. Sterilizuojama filtruojant.

PASTABA Tirpinant ličio chloridą vandenyje, reikia laikytis visų būtinų saugos taisyklių, nes reakcijos metu išsiskiria šiluma. Šis tirpalas erzina gleivinę.

- Nalidiksino rūgšties natrio druskos tirpalas

<u>Sudėtis:</u> Nalidiksino rūgšties natrio druskos	0,1 g
Natrio hidroksido tirpalo 0,05 mol/l	10 ml

Paruošimas: Nalidiksino rūgšties natrio druska ištirpinama natrio hidrokside. Sterilizuojama filtruojant.

- Akriflavino hidrochlorido tirpalas

<u>Sudėtis:</u> Akriflavino hidrochlorido	0,25 g
Vandens	100 ml

Paruošimas: Akriflavino hidrochloridas ištirpinamas vandenyje. Sterilizuojama filtruojant.

- Amonio geležies (III) citrato tirpalas

<u>Sudėtis:</u> Amonio geležies (III) citrato	5,0 g
Vandens	100 ml

Paruošimas: Amonio geležies (III) citratas ištirpinamas vandenyje. Sterilizuojama filtruojant.

Visos sudėties terpė

<u>Sudėtis:</u> Pagrindinės terpės	100 ml
Ličio chlorido tirpalas	1,0 ml
Nalidiksino rūgšties natrio druskos tirpalo	0,1 ml
Akriflavino hidrochlorido tirpalo	0,5 ml
Amonio geležies (III) citrato tirpalo	1,0 ml

Paruošimas: į kiekvieną 100 ml pagrindinės terpės prieš pat naudojimą įpilama keturių rūšių tirpalų (žr. nuo Ličio chlorido iki Amonio geležies (III) citrato tirpalo).

Kokybės kontrolė

Listeria monocytogenes ATCC 19117 - teigiama

E. coli ATCC 25922 - neigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

2. Fraserio sultinys - selektyvioji antrojo pagausinimo terpė

- Pagrindinė terpė

<u>Sudėtis:</u> Mėsos peptono (gyvulių audinių skaidymo pepsinu produkto)	5,0 g
Fermentinio kazeino hidrolizato	5,0 g
Mėsos ekstrakto	5,0 g
Mielių ekstrakto	5,0 g
Natrio chlorido	20,0 g
Dinatrio hidrofosfato dihidrato	12,0 g
Kalio dihidrofosfato	1,35 g
Eskulino	1,0 g
Ličio chlorido	3,0 g
Nalidiksino rūgšties natrio druskos	0,02 g
Vandens	1 000 ml

Paruošimas: Visos sudėties sausosios terpės komponentai ištirpinami vandenyje. Jeigu reikia, pašildoma. Suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $7,2 \pm 0,2$.

Terpė supiistoma į tyrimams reikalingo tūrio mėgintuvėlius. Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

- Akriflavino hidrochlorido tirpalas (žr. anksčiau)
- Amonio geležies (III) citrato tirpalas (žr. anksčiau)

Visos sudėties terpė

Į kiekvieną pagrindinės terpės (pagrindinė terpė) mėgintuvėlį (10 ml talpos) prieš pat naudojimą įpilama po 0,1 ml tirpalų akriflavino hidrochlorido ir amonio geležies (III) citrato tirpalų. Atsargiai išmaišoma.

Kokybės kontrolė

Listeria monocytogenes ATCC 19117 – teigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

3. Oksfordo agaras - antra alternatyvi selektyvioji sėjimo terpė

- Agaro pagrindas

<u>Sudėtis</u> : Kolumbijos agaro	39 g
Eskulino	1 g
Amonio geležies (III) citrato	0,5 g
Ličio chlorido	15 g
Vandens	1000 ml
Proteazės peptono	23,0 g
Krakmolas	1,0 g
Natrio chlorido	5,0 g
Agaro (atsižvelgiant į agaro gelio tvirtumą)	nuo 9 g iki 18 g

Paruošimas: Visos sudėties sausosios terpės komponentai ištirpinami vandenyje. Jei reikia, pašildoma. Užvirinama, kad visiškai ištirptų. Suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $7,0 \pm 0,2$.

Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

- Priedas 1 000 l terpės

<u>Sudėtis</u> : Cikloheksimido	400 mg
Kolistino sulfato	20 mg
Akriflavino hidrochlorido	5,0 mg
Cefotetano	2,0 mg
Fosfomicino	10,0 mg
Etanolio	5,0 ml
Vandens	5,0 ml

Paruošimas: Visos sudėties sausosios terpės komponentai ištirpinami etanotio ir vandens mišinyje. Jeigu reikia, pašildoma. Sterilizuojama filtruojant.

Visos sudėties terpės paruošimas

Į atšaldytą iki 47 °C temperatūros pagrindinę terpę steriliai įpilamas priedas. Išpilstoma į sterilias Petri lėkšteles po 15 ml ir paliekama sukietėti. Lėkštelės su terpe laikomos tamsioje vietoje.

Kokybės kontrolė

Listeria monocytogenes ATCC 19117 – teigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

4. PALKAMO agaras - antra selektyvioji sėjimo terpė

- Agaro pagrindas

<u>Sudėtis</u> : Peptono	23,0 g
Krakmolo	1,0 g
Natrio chlorido	5,0 g
Mielių ekstrakto	3,0 g
Agaro (priklausomai nuo agaro gelio tvirtumo)	nuo 9 g iki 18 g
D-gliukozės	0,5 g
D-manitolio	10,0 g
Eskulino	0,8 g
Amonio geležies (III) citrato	0,5 g
Fenolio raudonojo	0,08 g
Ličio chlorido	15,0 g
Vandens	960 ml

Paruošimas: Komponentai arba sausas visos sudėties pagrindas ištirpinami vandenyje. Užvirinama, kad visiškai ištirtų. Suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25°C temperatūroje jis būtų $7,2 \pm 0,2$. Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

- Polimiksino B sulfato tirpalas

<u>Sudėtis</u> : Polimiksino B sulfato (100 000 TV)	0,1 g
Vandens	100 ml

Paruošimas: Polimiksino B sulfatas ištirpinamas vandenyje. Sterilizuojama filtruojant.

- Akriflavino hidrochlorido tirpalas

<u>Sudėtis</u> : Akriflavino hidrochlorido	0,05 g
Vandens	100 ml

Paruošimas: Akriflavino hidrochloridas ištirpinamas vandenyje. Sterilizuojama filtruojant.

- Natrio ceftazidimo pentahidrato tirpalas

<u>Sudėtis:</u> Natrio ceftazidimo pentahidrato	0,116 g
Vandens	100 ml

Paruošimas: Natrio ceftazidimo pentahidratas ištirpinamas vandenyje. Sterilizuojama filtruojant.

Visos sudėties terpės paruošimas

<u>Sudėtis:</u> Pagrindinės terpės (žr.anksčiau)	960 ml
Polimiksino B sulfato tirpalo (žr.anksčiau)	10 ml
Akriflavino hidrochlorido tirpalo (žr.anksčiau)	10 ml
Natrio ceftazidimo pentahidrato tirpalo (žr.anksčiau)	20 ml

Paruošimas: Į atšaldytą iki 47 °C temperatūros pagrindinę terpę (žr.anksčiau) maišant lėtai supilami tirpalai (žr.anksčiau).

Lėkštelių su agaru ruošimas

Į atitinkamo dydžio Petri lėkštelės įpilama po 15 ml šviežiai paruoštos visos sudėties terpės (žr.anksčiau). Leidžiama sustingti. Lėkštelės su terpe laikomos tamsoje.

Kokybės kontrolė

Listeria monocytogenes ATCC 19117 – teigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai..

5. Triptono sojos mielių ekstrakto agaras (TSMEA) - standžioji mitybos terpė

<u>Sudėtis:</u> Triptono sojos sultinio ¹⁾	30,0 g
Mielių ekstrakto	6,0 g
Vandens	1 000 ml
Agaro (priklausomai nuo agaro gelio tvirtumo)	nuo 9 g iki 18 g
¹⁾ Triptono	17,0 g
Sojos peptono	3,0 g
Natrio chlorido	5,0 g
Diklio fosfato	2,5 g
Gliukozės	2,5 g

Paruošimas: Komponentai arba sausoji visos sudėties terpė ištirpinama vandenyje virinant. Jeigu reikia, suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų 7,3 ± 0,2. Terpė išpilstoma į reikiamo dydžio mėgintuvėlius. Sterilizuojama 15 min autoclave 121 °C temperatūroje. Sudedama ant nuožulnaus paviršiaus. Terpė išpilstoma į sterilias Petri lėkštelės tyrimui tinkamais kiekiais. Leidžiama sustingti.

Kokybės kontrolė

E. coli 25922– teigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

6. Triptono sojos mielių ekstrakto agaras (TSMES) - skystoji mitybos terpė

<u>Sudėtis:</u> Triptono sojos sultinio ¹⁾	30,0 g
Mielių ekstrakto	6,0 g
Vandens	1 000 ml
¹⁾ Žr. (TSME)	

Paruošimas: Komponentai arba sausoji visos sudėties terpė ištirpinama vandenyje. Jei reikia, pašildoma. Jeigu reikia, suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $7,3 \pm 0,2$. Terpė išpilstoma į reikiamo dydžio kolbas arba mėgintuvėlius. Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

Kokybės kontrolė

E. coli 25922– teigiama

S. epidermidis 12228– teigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

7. Avies kraujo agaras

- Pagrindinė terpė

<u>Sudėtis:</u> Mėsos peptono	15 g
Kepenų hidrolizato	2,5 g
Mielių ekstrakto	5 g
Natrio chlorido	5 g
Agaro (priklausomai nuo gelio tvirtumo)	nuo 9 g iki 18 g
Vandens	1 000 ml

Paruošimas: Komponentai ištirpinami vandenyje virinant. Suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $7,2 \pm 0,2$. Terpė išpilstoma į reikiamo tūrio kolbas. Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

- Defibrinuotas avies kraujas. Nesant galimybės naudoti defibrinuoto avies kraujo, naudojamas donorų kraujas.

Visos sudėties pagrindinė terpė

<u>Sudėtis:</u> Pagrindinės terpės	100 ml
Defibrinuoto avies kraujo	nuo 5 ml iki 7 ml

Paruošimas: Į atšaldytą iki 47 °C temperatūros pagrindinę terpę įpilamas kraujas. Gerai išmaišoma. Išpilstorna į sterilias Petri lėkšteles tyrimui tinkamais kiekiais. Leidžiama sustingti.

Kokybės kontrolė

E. coli 25922– teigiama

S. epidermidis 12228– teigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

8. Angliavandenių (ramnozės, ksilozės) terpės

- Pagrindinė terpė

<u>Sudėtis</u> : Proteazės peptono	10 g
Mėsos ekstrakto	1 g
Natrio chlorido	5 g
Bromkrezolio purpurino	0,02 g
Vandens	1000 ml

Paruošimas: Komponentai ištirpinami vandenyje . jei reikia, pašildoma. Suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $6,8 \pm 0,2$. Terpė išpilstoma į reikiamo tūrio kolbas. Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

- Angliavandenių tirpalai

<u>Sudėtis</u> : Angliavandenio*	5 g
Vandens	100 ml
L-ramnozė arba L-ksilozė	

Paruošimas: Kiekvienas angliavandenis atskirai ištirpinamas 100 ml vandens. Sterilizuojama filtruojant.

Visos sudėties terpė

Į 9 x ml pagrindinės terpės steriliai įpilama x ml kiekvieno angliavandenio tirpalo.

Kokybės kontrolė

Ramnozės terpė:

L.monocytogenes ATCC 19117 – teigiama

L. innocue – neigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

Ksilozės terpė: *L.monocytogenes* ATCC 19117 – neigiama

9. Agarų judrumui nustatyti

<u>Sudėtis</u> : Kazeino peptono	20,0 g
Mėsos peptono	6,1 g
Agaro	3,5 g
Vandens	1000 ml

Paruošimas: Komponentai ištirpinami vandenyje virinant. Jei reikia, suderinamas terpės pH, kad po sterilizavimo 25 °C temperatūroje jis būtų $7,3 \pm 0,2$. Terpė išpilstoma į 5 ml mėgintuvėlius. Sterilizuojama 15 min autoklave 121 °C temperatūroje.

Kokybės kontrolė

L.monocytogenes ATCC 19117– teigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

10. Vandenilio peroksido tirpalas

Naudojamas 3 % (pagal masę), t. y. 10 tūrių vandenilio peroksido tirpalas

11. Kultūros CAMP testui atlikti

Atliekant CAMP testą, ir norint gauti β-hemolizę, reikia naudoti *S. aureus* ATCC 25923. CAMP testui tinka ne visos *S. aureus* padermės.

Norint išlaikyti *S. aureus* ATCC 25923, *L monocytogenes* ATCC 19117 ir *L. innocua* ATCC 33090 kultūras, jos užsėjamos ant nuožulnaus standaus TSMEA agaro (žr. anksčiau). Inkubuojamos nuo 24 h iki 28 h, 35 °C arba 37°C temperatūroje, po to laikomos $3 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūros šaldytuve. Kartą per mėnesį kultūros persėjamos.

12. *Listeria* agaras pagal Ottaviani ir Agosti (ALOA)

- Pagrindinė terpė

<u>Sudėtis</u> : Fermentinio gyvulių aydinių hidrolizato	18 g
Fermentinio kazeino hidrolizato	6,0 g
Mielių ekstrakto	10 g
Natrio piruvatas	2,0 g
Gliukozė	2,0 g
Magnio glicerofosfatas	1,0 g
Magnio sulfatas (bevandenis)	0,5 g
Natrio chloridas	5,0 g
Ličio chloridas	10,0 g
Dinatrio hidro fosfatas (bevandenis)	2,5 g
5-bromo- 4-chloro-3-indolyl-β-D-gliukopiranozidas	0,05 g
Agaras	nuo 9 g iki 18,0g ^a
Vanduo	930 ml ^b

^a priklausomai nuo agaro kietumo 925 ml, jei naudojamas amfoterino B tirpalas.

Paruošimas: Dehidratuoti komponentai ir sudėtinės dalys ištirpinamos vandenyje virinant.. Sterilizuojama autoklave 15 min 121 °C temperatūroje. Po sterilizacijos pH 7,4 ± 0,2, 25 °C.

- Nalidiksinės rūgšties tirpalas

Sudėtis: Nalidiksinės rūgšties natrio druska 0,02 g
Natrio hidroksidas (0,05mol/l) 5 ml

Paruošimas: Nalidiksinės rūgšties natrio druska ištirpinama 5 ml natrio hidroksido ir sterilizuojama filtruojant.

- Ceftazidimo tirpalas

Sudėtis: Ceftazidimas 0,02 g
Vanduo 5 ml

Paruošimas: Ceftazidimas ištirpinamas 5 ml vandens ir sterilizuojamas filtruojant per 0,45 µm membraninį filtrą.

- Polimiksino B tirpalas

Sudėtis: Polimiksino B sulfatas 76700 IU
Vanduo 5 ml

Paruošimas: Polimiksino B sulfatas ištirpinamas 5 ml vandens ir sterilizuojamas filtruojant per 0,45 µm membraninį filtrą.

Antibiotikų priedai

- Cikloheksimido tirpalas

Sudėtis: Cikloheksimidas 0,05 g
Etanolis 2,5 ml
Vanduo 2,5 ml

Paruošimas: Cikloheksimidas ištirpinamas 2,5 ml etanolio tada pridedama 2,5 ml vandens ir sterilizuojamas filtruojant per 0,45 µm membraninį filtrą.

- Amfotericino B tirpalas (alternatyvus cikloheksimido tirpalui)

Sudėtis: Amfotericinas B 0,01 g
HCl (1mol/l) 2,5 ml
Dimetilformamidas (DMF) 2,5 ml

Paruošimas: Amfotericinas ištirpinamas HCl/DMF tirpale ir sterilizuojamas filtruojant per 0,45 µm membraninį filtrą.

PASTABA HCl/DMF tirpalas toksinis, dirbti atsargiai.

- Suplementas

2 g L-α-fosfatidilinositol (Sigma P 6636) 50 ml šalto vandens. maišoma apie 30 min iki gaunama homogeninė suspensija

Autoklavuojama 121°C 15 min ir atvėsinama iki 48 °C - 50 °C.

Visos sudėties terpė

<u>Sudėtis:</u> Pagrindinė terpė	930 ml ^a
Nalidiksinės rūgšties tirpalas	5 ml
Ceftazidimo tirpalas	5 ml
Polimiksino B tirpalas	5 ml
Cikloheksimidino tirpalas	5 ml
arba Amforericino B tirpalas	10 ml
Suplementas	50 ml

^a 925 ml, kai naudojamas Amfotericino B tirpalas

Paruošimas: Į atvėsintą maždaug iki 50 °C pagrindinę terpę sudedami tirpalai, rūpestingai kiekvieną iš jų sumaišant. Paruoštos terpės pH turi būti $7,2 \pm 0,2$, 25 °C temperatūroje. Terpė turi būti homogeniška, opalescuojanti.

Lėkštelių su terpe ruošimas

Į kiekvieną iš reikiamo skaičiaus Petri lėkštelių įpilti 40 ml šviežiai paruoštos pilnos terpės. (Jei nėra didelių lėkštelių, tai į mažas Petri lėkšteles pilama apie 15 ml terpės). Leidžiama terpei sukietėti. Prieš pat naudojimą rūpestingai išdžiovinti agaro lėkšteles (patartina su nuimtais dangteliais ir su agaro sluoksniu apačioje) džiovinimo spintoje, nuo 37 °C iki 55 °C temperatūroje, kol agaro paviršius taps sausas.

Lėkštelės laikomos iki 7 dienų $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ temperatūroje tamsioje vietoje.

Kokybės kontrolė

L.monocytogenes ATCC 19117– teigiama

E. coli 25922 - neigiama

Sterilumo kontrolė: kiekvienai pagamintai partijai.

14. DAŽYMAS GRAMO BŪDU (modifikuotas Huckerio metodas)

Bakterijų ląstelių dažymas leidžia aprašyti bakterijų morfologiją ir jas klasifikuoti į dvi grupes atsižvelgiant į tai, ar tyrimo sąlygomis jos gali išlaikyti kristalvioletinį dažą. Ši savybė visų pirma priklauso nuo šių dviejų grupių ląstelių sienelių struktūros skirtumų ir yra susijusi su kitais svarbiais tarp šių dviejų grupių esamais skirtumais. Yra daug Gramo dažymo būdų, tačiau seka visada išlieka tokia, kokia yra nurodyta žemiau.

Tirpalai - galima naudoti masiškai gaminamus tirpalus. Šiuo atveju reikia laikytis gamintojo nurodymų.

- **Kristal violetinio tirpalas**

<u>Sudėtis:</u> Kristalvioletinis	2,0 g;
Etanolis (95 %)	20 ml;

Amonio oksalatas (C ₂ H ₈ N ₂ O ₄)	0,8 g;
Distiliuotas vanduo	80 ml.

Paruošimas: Kristalvioletinį ištirpinti etanolyje, o amonio oksalatą - distiliuotame vandenyje. Abu mišinius sumaišyti ir iki naudojimo palikti stovėti 24 h.

- **Jodo tirpalas**

<u>Sudėtis</u> : Jodas	1,0 g;
Kalio jodidas (KJ)	2,0 g;
Distiliuotas vanduo	100 ml.

Paruošimas: Kalio jodidą ištirpinti 10 ml distiliuoto vandens. Dalimis pridėti jodo. Šiam ištirpus, matavimo kolboje skysčio kiekį padidinti iki 100 ml.

- **Safranino tirpalas**

<u>Sudėtis</u> : Safraninas O	0,25 g;
Etanolis (95 %)	10 ml;
Distiliuotas vanduo	100 ml.

Paruošimas: Safraniną ištirpinti etanolyje, po to sumaišyti su distiliuotu vandeniu.

Dažymas. Ant objekcinio stiklelio užfiksuoti bakterijų sluoksnį, kurios augintos nuo 18 h iki 24 h, arba tada, kai sultinys yra drumstas, sluoksnį užpilti kristalvioletinio tirpalu. Palikti vienai minutei, kad įvyktų reakcija. Po to stiklelį keletą sekundžių plauti silpna vandens srove, laikant jį nuožulniai.

Stiklelį užpilti jodo tirpalu. Palikti vienai minutei, kad įvyktų reakcija. Stiklelį keletą sekundžių plauti silpna vandens srove, laikant jį nuožulniai.

Švelniai ir nepertraukiamai ant palenkto stiklelio pilti etanolį (95 %) ne daugiau kaip 30 s, arba tol, kol nebeišsiskirs violetinė spalva. Palenktą stiklelį švelniai nuplauti vandeniu tam, kad būtų pašalintas etanolis.

Stiklelį 10 s užpilti safranino tirpalu. Palenktą stiklelį nuplauti silpna vandens srove. Stiklelį nudžiovinti.

Lygiagrečiai daromas kontrolinis tepinėlis su darbinėmis kultūromis: *S. aureus* ATCC 25923 – gramteigiamos mėlynos spalvos kokai ir *E. coli* ATCC 25922 – gramneigiamos raudonos spalvos lazdelės

Interpretavimas. Tepinėlis tiriamas po mikroskopo imersiniu objektyvu. Jei bakterijų ląstelės yra mėlynos ar violetinės, vadinamos gramteigiamomis (Gram+); jei jos turi tamsiai rožinę ar raudoną spalvą, vadinamos gramneigiamomis (Gram -).

Kai kurių bakterijų tipų grynų kultūrų ir gramteigiamos, ir gramneigiamos ląstelės gali būti matomos tame pačiame mikroskopo lauke. **PASTABA** Tankiai išsidėsčiusių ląstelių reakcija gali būti netipinė.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovei dr. Silvijai Kiverytei už patarimus rašant darbą ir kruopščią literatūrinio stiliaus korekciją. NVSPL Klaipėdos skyriaus Mikrobiologinių tyrimų poskyrio vedėjai Ramutei Staponkienei už galimybę naudotis tiriamąja medžiaga ir laboratorijos duomenimis. Doc. dr. Jonui Algiui Abaravičiui už darbo recenziją. Taip pat dėkoju savo bendradarbiams, artimiesiems bei draugams už nuoširdų palaikymą ir pagalbą.