

## Alustavan *Bacillus cereus* -bakteerin ja itiöiden määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

### 1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 7932:2004

(Mossel 30 °C / 24 – 48 h, naudän- tai lampaanveriyagar 30 °C / 24 – 48 h)

- 1) Itiöiden määrittäminen on lisätty osaksi menetelmää viitemenetelmän johdantokappaleen perusteella.

### 2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu alustavan *Bacillus cereus* -bakteerin tai sen itiöiden määrittämiseen elintarvikkeista ja orgaanisista lannoitevalmisteista pesäkelaskentatekniikalla 30 °C:ssa.

### 3 Määritelmä(t)

*B. cereus* on suuri (solun paksuus >0,9 µm), grampositiivinen, fakultatiivisesti anaerobinen, itiöllinen sauvabakteeri, joka ei käytä mannitolia ja muodostaa yleensä lesitiinaasia, fermentoi glukoosia, pelkistää nitraatin nitriitiksi ja muodostaa asetoinia. Tämä menetelmä ei erottele *B. cereus* -lajeja sitä läheisesti muistuttavista, mutta harvemmin tavatuista basilluslajeista (*B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. thuringiensis* ja *B. mycoides*), minkä vuoksi menetelmällä saadaan alustava *B. cereus* -pitoisuus.

Korkea *B. cereus* -pitoisuus (yleensä yli 100 000 pmy/g) elintarvikkeissa voi aiheuttaa ruokamyrkytyksen. Ruokamyrkytystyyppinä on kaksi, ns. oksetus- ja ripulityyppi. *B. cereus* on yleinen luonnossa, joten se voi joutua helposti moniin elintarvikkeisiin. Sitä esiintyykin pieninä pitoisuuksina (< 100 pmy/g) raaissa elintarvikkeissa kuten viljassa, riisissä, lihassa, kasviksissa ja raakamaidossa. Basilluksia voi esiintyä myös maitovalmisteissa, koska pastörointi ei tuhoa niiden lämmönkestäviä itiöitä. *B. cereuksen* muodostama proteaasi ja lesitiinaasi voivat aiheuttaa saostumista ja makuvirheitä maitovalmisteissa.

### 4 Periaate

Näyte kuumennetaan, mikäli halutaan määrittää itiöpitoisuus. Kuumennettu tai kuumentamaton näyte siirrostetaan pintaviljelyyn selektiiviselle kasvualustalle, maljoja inkuboidaan 1 – 2 vrk 30 °C:ssa. Tyypilliset pesäkkeet lasketaan ja varmistetaan tarkastelemalla kasvun tyypillisyyttä ei-selektiivisellä agarmaljalla. Tuloksen perusteella lasketaan alustavan *B. cereus* -bakteerin tai itiöiden pitoisuus/g tai /ml näytettä.

## 5 Mahdolliset virhelähteet

Jos pesäkkeet kasvavat elatusalustalla tiheässä, ne jäävät pieniksi ja epätyypillisiksi.

Mannitoliposiitiviset pesäkkeet saattavat muuttaa koko elatusaineen keltaiseksi, jolloin *B. cereus* -pesäkkeiden tyypillinen väri ei tule esiin.

Lesitinaasinegatiiviset ja heikosti lesitinaasiposiitiviset pesäkkeet ovat vaikeita tunnistaa.

## 6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskennellessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

## 7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher 400 -pusseja
- 3) Lämpökaappi  $30 \pm 1$  °C

## 8 Elatusaineet, reagenssit

- 1) Peptonisuolaliuos, peptoni 0,1%, suola 0,85% (PEPSU), mikäli toimintaohjeessa LAB 728 ei toisin mainita
- 2) Mossel-agar (MOSSEL)
- 3) Naudanveriagar (NAVERI) tai lampaanveriagar

## 9 Kontrollikannat

- 1) *B. cereus* EVIRA 594

## 10 Näytteen esikäsittely

Mikäli määritetään näytteen itiöpitoisuus, nestemäistä näytettä tai kiinteän näytteen ensimmäistä laimennosta kuumennetaan vesihauteessa 10 min 80 °C:ssa vegetatiivisten solujen tuhoamiseksi. Tämän jälkeen laimennussarjan tekoa jatketaan normaalisti.

## 11 Suoritus

Laimenna näyte toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti. Viljeltävät laimennokset valitaan tapauskohtaisesti.

Kuivata maljat tarvittaessa ennen siirrostusta pitämällä niitä avoimina laminaarikaapissa n. 15 minuutin ajan.

Viljele sopivat laimennokset pintalevityksenä Mossel-agarille. Viljele laimennoksista rinnakkaiset maljat.

Imeytä näyte maljoille mahdollisimman hyvin pitämällä niitä kansi ylöspäin huoneenlämmössä n. 15 minuuttia ennen inkubointia.

Jos menetelmän herkkyyttä halutaan lisätä, voidaan tavallisten petrimaljojen (Ø 9 cm) sijasta käyttää isoja maljoja (Ø 14 cm), joille siirrostetaan 1 ml näytettä pintalevityksenä. Vastaavasti voidaan käyttää kolmea tavallista maljaa, joille viljellään yhteensä 1 ml. Viljele rinnakkaismaljat.

Inkuboi maljoja  $30 \pm 1$  °C / 18 – 24 h. Mikäli pesäkkeet eivät tämän jälkeen ole vielä selvästi nähtävissä, jatka inkubointia toiset 18 – 24 h.

## 11.1 Pesäkkeiden laskeminen

Laske pesäkkeet maljoilta, joilla on alle 150 pesäkettä mielellään kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta.

## 11.2 Pesäkkeiden valinta varmistuskokeisiin

### 11.2.1 Mossel

*B. cereus* kasvaa Mossel-maljalla suurina, vaaleanpunaisina pesäkkeinä, joita yleensä ympäröi saostumavyöhyke.

Maljan ja pesäkkeiden vaaleanpunainen väri osoittaa, ettei bakteeri käytä mannitolia. Jos maljalla kasvaa runsaasti mannitolia käyttäviä mikro-organismeja, jotka tuottaessaan happoa muuttavat alustan värin keltaiseksi, saattaa *B. cereukselle* tyypillinen vaaleanpunainen väri heiketä tai hävitä kokonaan.

Saostumavyöhykkeen aiheuttaa lesitinaasin muodostus. Jotkut *B. cereus* -kannat tuottavat hyvin vähän tai eivät tuota lainkaan lesitinaasia. Tyypilliset lesitinaasi-negatiiviset ja lesitinaasi-positiiviset pesäkkeet varmistetaan.

## 12 Varmistuskokeet, veriagar

Varmista 5 pesäkettä kultakin laskemaltasi maljalta. Mikäli maljalla kasvaa vähemmän kuin 5 tyypillistä/epäilyttävää pesäkettä, varmista kaikki pesäkkeet.

Varmistus tehdään viljelemällä varmistettavat pesäkkeet naudan- tai lampaanveriagarille. Inkuboi viljelmiä  $30 \pm 1$  °C /  $24 \pm 2$  h. Viljele tarvittaessa positiivisena kontrollina *B. cereus* Evira 594 -kanta.

*B. cereus* kasvaa veriagarilla isoina, epäsäännöllisinä, mattapintaisina, vihertävän-harmaina pesäkkeinä, jotka ovat yleensä ison hemolyysivyöhykkeen ympäröimiä. Hemolyysivyöhykkeen laajuus voi vaihdella; myös nonhemolyyttisiä kantoja esiintyy.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Bacillus cereus* -bakteerin määrittäminen ja alustava tunnistaminen. Pesäkelaskentatekniikka.

## 12.1 Yhteenveto varmistuskokeista/-testeistä

<b>Agar</b>	<b>Varmistaminen alustavaksi <i>B.cereukseksi</i></b>
Mossel-agar	Vaaleanpunaiset saostumavyöhykeen ympäröivät pesäkkeet
Veriagar	Pesäkkeet isoja, epäsäännöllisiä, mattapintaisia ja vihertävänharmaista. Yleensä iso hemolyysivyöhyke pesäkkeen ympärillä (hemolyysivyöhykkeen laajuus voi vaihdella tai hemolyysi voi puuttua).

## 13 Tulokset

### 13.1 Tulosten laskeminen

Tulos lasketaan toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti varmistuneiden pesäkkeiden prosenttiosuuden perusteella.

### 13.2 Tulosten ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti alustavana *B. cereus* -bakteerin tai jos näyte on kuumennettu, alustavana *B. cereus* -itiöiden määränä pmy/g tai pmy/ml.

## 14 Menetelmän validointi

Menetelmän validointitulokset (Schulten ym. 1998) on esitetty viitemenetelmässä.

## 15 Menetelmän status

Standardimenetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input type="checkbox"/>
Virallinen menetelmä	<input type="checkbox"/>
Referenssimenetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Sisäinen menetelmä	<input type="checkbox"/>

## 16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
---	-------------------------------------

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Bacillus cereus* -bakteerin määrittäminen ja alustava tunnistaminen. Pesäkelaskentatekniikka.

---

Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen/kontrollikantojen käyttö tarvittaessa	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismäärittäykset	<input type="checkbox"/>

## 17 Viitteet

ISO 7932: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Bacillus cereus* - Colony count technique at 30 °C.

Parry, J. M., Turnbull, P. C. B. and Gibson, J. R. (1983). A colour atlas of *Bacillus* species.

Schulten, S.M., Van de Lustgraaf, B.E.B., Nagelkerke, N.J.D & in 't Veld, P.H. Validation of Microbiological Methods, Enumeration of *Bacillus cereus* according to ISO 7932 (second edition). Report No. 286555001, National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, the Netherlands, 1998.

\* Alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä

## 18 Muutokset edelliseen versioon

13.10.2015

Vanha testikanta EELA 21. muutettu käytössä olevaan Evira 594 kantaan.

Korjattu vanhat toimintaohjenumeroinnit vastaamaan nykyistä numerointi käytäntöä.

Ohjeen laatija: Tuula Johansson