

***Clostridium perfringens* -bakteerin määrittäminen ja tunnistaminen. Pesäkelaskentatekniikka.**

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 7937:2004

(SC 37 °C / 20 h maljavalu, nitraatti-liikkuvuusagar 37 °C / 24 h ja laktoosi-gelatiiniagar 37 °C / 48 h tai API 20A / API Rapid ID 32A)

- 1) Tyypillisistä pesäkkeistä viljellään aina puhdasviljelmät veriagarille varmistuskokeita varten.
- 2) Laktoosi-gelatiini-agarputkia ei lueta 24 h inkuboinnin jälkeen, vaan ainoastaan 48 h inkuboinnin jälkeen.
- 3) Määrittämissä laskemien mm. lihaluujauhonäytteille käyttäen suurempaa viljelytilavuutta.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Elintarvikkeille, rehuille ja orgaanisille lannoitevalmisteille.

3 Määritelmä(t)

Clostridium perfringens on yleinen ruokamyrkytysbakteeri. *C. perfringens*-bakteereita esiintyy yleisesti maaperässä sekä ihmisen ja eläinten suolistossa.

C. perfringens on liikkumaton, grampositiivinen, anaerobinen, itiöitä muodostava, 4 – 6 µm pitkä sauvabakteeri. Bakteeri kasvaa suurehkoina (1 – 4 mm 24 tunnin inkuboinnin jälkeen), pyöreinä, säännöllisenmuotoisina ja tasaisina pesäkkeinä. *C. perfringens* on yleensä hemolyyttinen, hydrolysoi gelatiinia, pelkistää nitraattia sekä tuottaa happoa ja kaasua laktoosista.

4 Periaate

Näyte viljellään maljavaluna SC-agarille. Maljoille valetaan vielä pintakerros samasta agarista. Maljoja inkuboidaan anaerobisesti 37 °C / 20 ± 2 h. Tyypilliset pesäkkeet lasketaan ja varmistetaan biokemiallisesti.

***Clostridium perfringens* -bakteerin määrittäminen ja tunnistaminen. Pesäkelaskentatekniikka.**

5 Mahdolliset virhelähteet

Pesämäärän laskeminen vaikeutuu, jos pesäkkeet leviävät SC-agarilla ja agar tästä syystä mustuu.

Tutkittavaa näytettä ei saa pakastaa, koska vegetatiiviset *C. perfringens* -bakteerisolut kestävät huonosti jäätymistä. Tosin osa rehu- ja lannoitevalmistämisnäytteistä saapuu laboratorioon käytännön syistä pakastettuina.

Näyte on viljeltävä viivyttämättä, koska *C. perfringens* on anaerobinen bakteeri ja on herkkä hapelle.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskennellessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223. API Rapid 32A testisarjan reagenssit lisätään ja liuskat luetaan veto-/laminaarikaapissa.

7 Laitteet ja välineet

1. Mikrobiologinen perusvälineistö
2. Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher-400 pusseja
3. Anaerobiastioita, kaasunkehittäjiä ja anaerobi-indikaattoreita
4. Lämpökaappi 37 ± 1 °C
5. Mikroskooppi
6. Veto- tai laminaarikaappi

8 Elatusaineet ja reagenssit

1. Sulfiitti-sykloseriini -agar (SC), esimerkiksi à 200 ml
2. Peptonisuolaliuos, peptoni 0,1%, suola 0,85% (PEPSU), mikäli toimintaohjeessa LAB 728 ei toisin mainita
3. Naudan- tai lampaanveriagar nystyrämaljoilla
4. Nitraatti-liikkuvuusagarputket
5. Laktoosi-gelatiiniagarputket
6. D-sykloseriiniliuos
7. 0,4% sulfaniilihappo 15%:ssa etikkahapossa (NIT A-reagenssi)
8. 5-amino-2-naftaleenisulfonihappo (5-2-ANSA) 15%:ssa etikkahapossa (NIT B-reagenssi)
9. Sinkkijauhe
10. Gram-värit
11. API 20A tai API Rapid ID 32A sekä tarvittavat reagenssit (BioMérieux)

9 Kontrollikannat

1. *Clostridium perfringens* EELA 3
2. *Clostridium sordellii* EELA 422

10 Näytteen esikäsittely

Esikäsittele näyte tarvittaessa toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

11 Suoritus

Näytemäärä on 10 g ellei muuta sovita. Tee sopivat laimennokset toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

Viljele laimennoksista rinnakkaiset maljat. Pipetoi maljoihin 1 ml laimennoksia. Pipetoi tarvittaessa laimennoksesta 10^{-1} yhteensä 10 ml viidelle tyhjälle maljalle esimerkiksi 2 ml:n erissä (pipetointilavuus voi olla 1 – 2,5 ml, maljojen määrä valitaan pipetointilavuuden mukaisesti). Lisää temperoituun SC-agariin D-sykloseriiniliuosta, loppukonsentraatio 40 mg/100 ml (eli 2 ml Oxoidin [100 mg/ml] supplementtia 500 ml:aan). Kaada 10 – 15 ml SC-agaria maljoihin. Sekoita hyvin ja anna jähmettyä. Kaada vielä maljoille n. 10 ml pintakerros samasta agarista ja anna jähmettyä.

Inkuboi maljoja anaerobisesti 37 ± 1 °C / 20 ± 2 h.

Laske tyypilliset, mustat pesäkkeet maljoilta, joilla kasvaa enintään 150 pesäkettä. Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan.

12 Varmistuskokeet (putkikokeet tai gram-värjäys ja API-koesarja)

12.1 Pesäkkeiden valinta

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

Tee pesäkkeistä puhtasviljelmät naudan- tai lampaanveriagarille varmistustestejä varten. Inkuboi 37 ± 1 °C / 20 ± 2 h anaerobisesti.

12.2 Pesäkkeiden siirrostus varmistuskokeisiin

Mikäli varmistuskokeisiin käytettäviä elatusaineita ei ole valmistettu samana päivänä, kuumenna agarputkia kiehuvaan veteen n. 15 minuuttia hapen poistamiseksi. Jäähdytä nopeasti inkubointilämpötilaan.

Siirrosta varmistustestiputket puhtasviljelmillä. Viljele jokaista varmistustestityyppiä/elatusainetta kohti positiivinen (*C. perfringens* EELA 3) ja negatiivinen kontrolli (siirrotamaton putki). Viljele lisäksi nitraatti-liikkuvuusagariin kontrolliksi *C. sordellii* EELA 422.

Clostridium perfringens -bakteerin määrittäminen ja tunnistaminen. Pesäkelaskentatekniikka.

12.3 Nitraatti-liikkuvuusagar

Siirrosta silmukalla yksi pesäke pistoviljelyynä putken pohjaan. Käytä kontrolleina *C. perfringens* EELA 3 - ja *C. sordellii* EELA 422 -kantoja.

Inkuboi anaerobisesti 37 ± 1 °C / 24 h.

12.3.1 Nitraatti-liikkuvuusagarin tulkinta

Liikkuvuus:

Liikkuvuus / liikkumattomuus todetaan tarkastelemalla kasvua. Mikäli kasvua esiintyy ainoastaan pistokohdassa, kanta on liikkumaton. Jos kanta on liikkuva, kasvu leviää tasaisesti koko alustaan.

Nitraatin pelkistäminen:

Yhdistä erillisessä putkessa NIT A - ja NIT B -reagenssia 1:1 (esim. 1 ml + 1 ml). Lisää nitraatti-liikkuvuusagarputkeen 0,2 – 0,5 ml yhdistettyä reagenssia. Punaisen värin muodostuminen 15 minuutin kuluessa on osoitus positiivisesta tuloksesta. *C. perfringens* pelkistää voimakkaasti nitraatin nitriitiksi (yleensä välitön reaktio, voimakas punainen). Viljelmät, jotka antavat heikon reaktion (vaaleanpunainen) eivät ole *C. perfringens*- bakteereita

Jos väri ei ole 15 minuutin kuluessa muuttunut punaiseksi, lisää spaattelin kärjellinen sinkkijauhetta putkeen ja seisota edelleen 10 minuuttia. Jos tämän jälkeen muodostuu punaista väriä, bakteeri ei ole pelkistänyt nitraattia nitriitiksi, ja tulos on negatiivinen. Jos putken väri on muuttumaton, bakteeri on pelkistänyt nitraatin typpikaasuksi ja tulos on positiivinen.

C. perfringens pelkistää nitraattia eikä ole liikkuva.
C. sordellii EELA 422 ei pelkistä nitraattia ja on liikkuva.

12.4 Laktoosi-gelatiiniagar

Siirrosta silmukalla yksi pesäke pistoviljelyynä putken pohjaan.

Inkuboi anaerobisesti 37 ± 1 °C / 48 h.

12.4.1 Laktoosi-gelatiiniagarin tulkinta

Laktoosi:

Laktoosin fermentaatio muuttaa elatusaineen punaruskean värin keltaiseksi ja saa aikaan kaasun muodostumista. Positiivisen kontrollin tulee olla selvästi keltainen ja siinä tulee olla kaasua. Negatiivisen kontrollin tulee olla muuttumaton eli punaruskea ilman kaasunmuodostusta.

Gelatiini:

***Clostridium perfringens* -bakteerin määrittäminen ja tunnistaminen. Pesäkelaskentatekniikka.**

Gelatiinin hajotus todetaan pitämällä putkea 1 h jääkaapissa (5 ± 3 °C) ja tarkastelemalla sen jälkeen elatusaineen jähmeyttä. Jos elatusaine pysyy liuksena eikä jähmety, gelatiini on hajonnut. Positiivisen kontrollin tulee olla selvästi liuosmainen ja negatiivisen jähmettynyt.

C. perfringens fermentoi laktoosia ja hajottaa gelatiinia.

12.5 Gram-värijäys ja API-koesarja

Tee verimaljoilla hemolyyttinä kasvaneista viljelmistä gramvärjäykset. Varmista gram-positiiviset, itiölliset sauvat API 20 A - tai API Rapid ID 32A -testillä.

12.6 Yhteenveto varmistuskokeista

Varmistuskoe	<i>C. perfringens</i>	<i>C. sordellii</i>
Liikkuvuus	ei liikkuva	liikkuva
Nitraatin pelkistys	+	-
Laktoosin fermentaatio	+	
Gelatiinin hajotus	+	

TAI

Gram-positiivinen ja

C. perfringens-bakteerille ominainen profiili API 20 A - tai API Rapid ID 32A -testeissä.

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 *C. perfringens* -bakteerin määränä pmy/g tai pmy/ml.

14 Menetelmän validointi

Menetelmän validointitulokset (Schulten ym. 2001) 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"/>
Menetelmävertailut	<input checked="" type="checkbox"/>
Vertailukantojen / kontrollikantojen käyttö putkivarmistuskokeissa	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismääriytykset	<input type="checkbox"/>

17 Viitteet

*)ISO7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony count technique.

Schulten, S.M., Benschop, E., Nagelkerke, N.J.D., Mooijman, K.A. Validation of Mikrobiological Methods. Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937 (second edition, 1997). RIVM report 286555 002, Bilthoven, the Netherlands, 2001.

*)Alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä huoneessa B214.

18 Muutokse edelliseen versioon

16.5.2013: Evira 3412/4 Lisätty gram-värijäys otsikoihin 12. ja 12.5. sekä gram-tulos kohtaan 12.6. Työturvallisuuskohtaan lisätty API Rapid 32A reagenssien käsittely, laitteisiin veto- tai laminaarikaappi.
Ohjeen laajijat: Tuula Johansson, Satu Hakola