

## **Bakteerien lukumäärän määrittäminen naudanveriagarilla. Pesäkelaskentatekniikka.**

### **1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat**

Naudanveriagar  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 1^\circ\text{C}/18$  - 24 h aerobisesti ja/tai anaerobisesti. Menetelmä ei ole standardimenetelmä.

### **2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmä soveltuu aerobisten ja anaerobisten, hemolyyttisten ja non-hemolyyttisten bakteerien lukumäärän määrittämiseen elintarvikkeista ja bakteerivalmisteista, kuten kompostin kiihdyttimistä. Menetelmää voidaan soveltaa, kun halutaan määrittää *S. aureus*-, *B. cereus*- ja/tai *C. perfringens*-bakteereiden lukumääriä. Haluttaessa myös muita hemolyyttisesti ja non-hemolyyttisesti kasvavia bakteereita voidaan tunnistaa bakteerien lukumäärän laskemisen jälkeen suku- tai lajitasolle.

### **3 Määritelmä(t)**

Hemolyyttisillä bakteereilla tarkoitetaan bakteereita, jotka muodostavat naudanveriagarilla pesäkkeitä, joita ympäröi kirkas hemolyysivyöhyke eli alue, jolla verisolut ovat hajonneet (ns.  $\beta$ -hemolyysi). Yleensä *S. aureus*-, *B. cereus* ja *C. perfringens*-bakteerikannat muodostavat naudanveriagarilla hemolyyttisiä pesäkkeitä, joten menetelmää voidaan käyttää niiden lukumäärän määrittämiseen.

### **4 Periaate**

Näyte siirrostetaan pintaviljelynä ei-selektiiviselle kasvualustalle. Maljoja inkuboidaan  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  tai  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ :ssa  $24 \pm 2$  h, tarvittaessa sekä aerobisesti että anaerobisesti. Hemolyyttiset ja non-hemolyyttiset pesäkkeet lasketaan ja ne tunnistetaan tarvittaessa. Tuloksen perusteella lasketaan hemolyyttisten ja/tai non-hemolyyttisten bakteerien määrä tai *S. aureus*-, *B. cereus* ja/tai *C. perfringens*-bakteerien lukumäärä /g tai /ml näytettä.

### **5 Mahdolliset virhelähteet**

Osa *Bacillus* -suvun bakteereista on ei-hemolyyttisiä. Tiheillä maljoilla taustakasvu häiritsee, jolloin *Bacillus* -pesäkkeet jäävät pieniksi ja epätyypillisiksi.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

**Bakteerien lukumäärän määrittäminen naudanveriagarilla. Pesäkelaskentatekniikka.**

---

## 6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223. Menetelmä ei sisällä erityisiä työturvallisuusriskejä.

## 7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher-400 pusseja
- 3) Lämpökaappi  $30 \pm 1$  °C,  $37 \pm 1$  °C,  $55 \pm 1$  °C
- 4) anaerobiastioita, kaasunkehittämiä ja anaerobi-indikaattoreita

## 8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Peptonisuolaliuos, peptoni 0,1%, suola 0,85% (PEPSU), mikäli toimintaohjeessa LAB 728 ei toisin mainita
- 2) Naudanveriagar

## 9 Kontrollikannat

Menetelmässä ei käytetä kontrollikantoja.

## 10 Näytteen esikäsittely

Esikäsittele näyte toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti. Tee sovitut laimennokset toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

## 11 Suoritus

### 11.1 Viljely

Jos maljat ovat tuoreita, kuivata niitä ennen siirrostusta. Pidä maljoja avoimina laminaarikaapissa n. 15 minuutin ajan. Pidä anaerobiviljelyssä käytettäviä verimaljoja anaerobikolvissa jääkaappilämpötilassa vähintään vuorokausi ennen viljelyä.

Viljele sopivat laimennokset pintalevityksenä veriagarille toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

Inkuboi maljoja  $30 \pm 1$  °C,  $37 \pm 1$  °C tai  $55 \pm 1$  °C / 18 - 24 h tarvittaessa sekä aerobisesti että anaerobisesti, toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

Tee peptonisuolaliuoksesta ja veriagarista steriiliyskontrollit toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

**Bakteerien lukumäärän määrittäminen naudanveriagarilla. Pesäkelaskentatekniikka.**

---

## 11.2 Pesäkkeiden laskeminen

Laske hemolyyttisten ja/tai non-hemolyyttisten bakteerien pesäkelukumäärä maljoilta, joilla näitä pesäkkeitä kasvaa yhteensä enintään 150 pesäkettä. Pesäkemäärän laskentarajat määritellään lajikohtaisissa menetelmäohjeissa: Evira 3406, 3412 ja/tai 3466.

## 12 Tulokset

### 12.1 Tulosten laskeminen

Laske tulos toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

### 12.2 Tulosten ilmoittaminen

#### 12.2.1 Hemolyyttiset ja non-hemolyyttiset aerobisesti tai anaerobisesti kasvavat bakteerit

Tulos ilmoitetaan joko yksikössä pmy/g tai pmy/ml näytettä toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

Mikäli näytteestä on eristetty bakteereita, jotka on tunnistettu, tulokset ilmoitetaan käytetyn menetelmän mukaisesti tai tunnistamistestit mainitaan.

#### 12.2.2 *S. aureus*, *B. cereus* ja *C. perfringens*

Tulos ilmoitetaan menetelmäohjeiden Evira 3406, 3412 ja/tai 3466 mukaisesti.

## 13 Menetelmän validointi

Menetelmää ei ole validoitu.

## 14 Menetelmän status

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

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

**Bakteerien lukumäärän määrittäminen naudanveriagarilla. Pesäkelaskentatekniikka.**

---

## 15 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen käyttö	<input type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>
Valvontakortit (Bacillus sp.)	<input checked="" type="checkbox"/>

## 16 Viitteet

## 17 Muutokset edelliseen versioon

Tämän ohjeen laatijat: Tuula Johansson, Satu Hakola.  
Tarkennettu kohtia 6 Työturvallisuus sekä 11.2 Pesäkkeiden laskeminen.