

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

1 Menetelmäviitteet ja poikkeama

ISO 21567:2004, muunnos

Shigella-selektiivinen rikastusliemi+kaliumtelluriitti (1mg/l) + novobiosiini (20 mg/l) (TSS-N20) 41,5 °C /16-20 h, Hektoen Enteric (HE) -agar 37 °C/24-48 h, XLD-agar 37 °C/24-48 h, TSI-agar 37 °C/24 h, TSA 37°C/24 h, gramvärjäys, liikkuvuusagar 37 °C/24, Simmons sin sitraattiagar, natriumasetaattiagar ja mukaattiliemi 37 °C/24, API 20E 37 °C/24.

- 1) Rikastusliemenä käytetään 0,5 mg/l novobiosiinia sisältävän shigellaliemen sijasta 1 mg/l kaliumtelluriittiä ja 20 mg/l novobiosiinia sisältävää shigellaselektiivistä lientä, jonka puskurointia on tehostettu (TSS-N20).
- 2) Rikastusliemi inkuboidaan aerobisesti Stomacher-pussissa, josta ilma on tarkoin poistettu, ei anaerobisesti.
- 3) Kiinteitä valikoivia agareita on kaksi: Hektoen enteric - ja XLD-agar; ei käytetä lisäksi MacConkey-agaria, joka on vähiten selektiivinen.
- 4) Christensenin sitraattiagarin sijasta käytetään Simmons sin sitraattiagaria.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *Shigella*-suvun bakteerien osoittamiseen elintarvikkeista.

3 Määritelmä(t)

Shigella-bakteeri on sauvamainen gramnegatiivinen bakteeri, joka on katalaasi-positiivinen, oksidaasinegatiivinen, fakultatiivisesti anaerobinen, laktoosinegatiivinen ja H₂S-negatiivinen eikä tuota kaasua glukoosista muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta.

Shigella-sukuun kuuluu neljä lajia:

Shigella dysenteriae, seroryhmä A, jossa 13 serovaria
Shigella flexneri, seroryhmä B, jossa 6 serovaria ja joitakin ala-serovareja
Shigella boydii, seroryhmä C, jossa 18 serovaria
Shigella sonnei, seroryhmä D, jossa 1 serovari

Kaikki *Shigella*-lajit aiheuttavat tautia ihmiselle.

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

4 Periaate

Shigellojen osoittaminen vaatii rikastuksen valikoivassa rikastusliemessä. Rikastuksen jälkeen näyte viljellään kahdelle kiinteälle, valikoivalle elatusaineelle, joista toinen on hyvin selektiivinen (HE) ja toinen vähemmän selektiivinen (XLD). Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan biokemiallisesti ja serologisesti.

Shigella on patogeeninen bakteeri ja voi aiheuttaa vakavan sairauden (*S. dysenteriae* tyyppi 1 kuuluu patogeenisuusluokituksessa luokkaan 3). Shigellan infektiivinen annos on pieni (*S. dysenteriae* – n. 10 bakteeria, muut lajit muutamia satoja bakteereita), minkä vuoksi työskentelyssä on noudatettava suurta varovaisuutta.

5 Mahdolliset virhelähteet

Jotkut enterobakteerit muistuttavat pesäkemorfologialtaan hyvin läheisesti shigelloja. Onkin suositeltavaa poimia selektiivimaljoilta varmistettavaksi useampi kuin 5 pesäkettä erityisesti ruokamyrkytystutkimusten yhteydessä. Validoinnissa käytetyistä matriiseista varsinkin jäävuorisalaatti sisälsi runsaasti enterobakteereita ja sen vuoksi *S. flexnerin* osoittaminen oli vaikeaa.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223. Shigella-bakteerit ovat ihmiselle vakavaa tautia aiheuttavia bakteereja. Sen takia laboratoriotyöskentelyssä tulee noudattaa huolellisuutta ja varovaisuutta. Bakteereita käsitellessä tulee käyttää työtakkia, suusuojaa ja suojahansikkaita. Työvaiheet, joissa on roiskevaara, suositellaan tehtäväksi laminaarivirtauskaapissa. Toksiinитоitä tehtäessä suositellaan myös suojalasien käyttöä.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher-400 pusseja
- 3) Lämpökaappi 37 ± 1 °C
- 4) Lämpökaappi $41,5 \pm 1$ °C

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Shigellaselektiivinen rikastusliemi + kaliumtelluriitti (1mg/l) + novobiosiini (20 mg/l) (TSS-N20)
- 2) Hektoen Enteric -agar (HE)
- 3) Ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti-agar (XLD)
- 4) Tryptikaasi-soija-agar (TSA) tai naudanveriagar
- 5) Triple-Sugar-Iron-agar (TSI)
- 6) Liikkuvuusagar
- 7) Simmons sitraattiagar
- 8) Natriumasetaattiagar
- 9) Mukaattiliemi

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

10) API 20E

9 Kontrollikannat

- 1) *Shigella flexneri* EELA 464 (ATCC 12022)
- 2) *Shigella sonnei* EELA 465 (ATCC 25931)
- 3) *Escherichia coli* EELA 42
- 4) *Citrobacter freundii* EELA 436

10 Näytteen esikäsittely

Esikäsittele näyte ja tee sovitut laimennokset toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11 Suoritus

11.1 Rikastus

Ota aseptisesti 25 g/ml:n näyte ja siirrä se Stomacher-pussiin. Lisää 225 ml TSS-N20 lientä. Homogenisoi Stomacherissa 30 sekuntia. Määritä pH aseptisesti ja säädä tarvittaessa $7,0 \pm 0,2$. Poista ilma pussista mahdollisimman tarkoin. Taita pussin suu ja sulje se tiiviisti. Inkuboi 16-20 tuntia $41,5 \pm 1$ °C:ssa.

11.2 Viljely agarmaljoille

Sekoita rikaste kevyesti pussia puristelemalla. Viljele rikasteesta 10 µl silmukalla hajotusviljelyynä HE- ja XLD-agareille. Inkuboi 37 ± 1 °C 20-24 h.

Mikäli alustoilla ei ole nähtävissä tyypillisiä tai epäilyttäviä pesäkkeitä ja muidenkin pesäkkeiden kasvu on olematonta tai vähäistä, inkuboi maljoja edelleen 18-24 h ennen kuin luet ne uudestaan.

Viljele kontrollikannoiksi *S. flexneri* EELA 464 ja *S. sonnei* EELA 465.

11.3 Maljojen lukeminen

S. sonnei saattaa muodostaa kahdenlaisia pesäkkeitä samalla agaralustalla: sileitä, pyöreitä, kuperia pesäkkeitä (vaihe 1) ja litteitä, epäsäännöllisiä, mattapintaisia pesäkkeitä (muistuttavat *B. cereus* -pesäkkeitä, mutta keskusta koholla) (vaihe 2). Pesäkemorfologian vaihteluun liittyy yleensä 120 megadaltonin plasmidin ja virulenssin katoaminen.

11.3.1 HE

Shigellat kasvavat HE-agarilla vihertävinä, kosteina, läpikuultavina, kohollaan olevina pesäkkeinä koska ne eivät käytä laktoosia eivätkä pelkistä sulfaattia sulfidiksi. Kasvusto muuttaa alustan värin vihreästä sinertäväksi.

S. sonnei -lajiin kuuluvat kannat ovat yleensä yli 40 h inkuboinnin jälkeen sekä laktoosittia sakkaroosiposiitivisia. Lisäksi on kuvattu laktoosiposiitivisia *S. flexneri* 2a - ja *S.*

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

boydii 9 -kantoja. Nämä muodostavat HE-agarilla oransseja pesäkkeitä, joita ympäröi mattapintainen saostumavyöhyke.

11.3.2 XLD

Shigellat kasvavat XLD-agarilla läpinäkuultavina pesäkkeinä koska ne eivät käytä ksyloosia, laktoosia tai sakkaroosia eivätkä pelkistä sulfaattia sulfidiksi. Pesäken keskusta on vaaleanpunertava/kirsikanpunainen (väritään sama kuin elatusaine). Alustan väri säilyy muuttumattomana.

Laktoosi- ja/tai sakkaroosiposiitiiviset shigellakannat muodostavat XLD-agarilla keltaisia pesäkkeitä, joita ympäröi mattapintainen saostumavyöhyke.

11.3.3 Häiritsevä kasvusto

Häiritsevän kasvuston pesäkkeiden ulkonäköä on kuvattu viitemenetelmän liitteessä olevassa taulukossa C (Liite 1).

12 Varmistuskokeet

12.1 Puhdasviljelmät

Siirrosta jokaiselta selektiiviseltä maljalta vähintään viidestä (mikäli mahdollista), selvästi erillään olevasta, tyyppillisestä tai shigellabakteeriksi epäilyistä pesäkkeestä puhdasviljelmät hajotusviljelynä naudanveriagarille tai TSA:lle.

Mikäli maljalla on havaittavissa tyyppillisiä tai epäiltyjä pesäkkeitä, mutta ne eivät kasva erillisinä, viljele pesäkkeistä HE- tai XLD-agarille jatkoviljelmät hajotusviljelynä siten, jotta saat erillisiä pesäkkeitä ja pystyt edelleen viljelemään tyyppillisistä pesäkkeistä puhdasviljelmiä naudanveriagarille tai TSA:lle.

Inkuboi 37 ± 1 °C/18-27 h.

Tarkasta viljelmien puhtaus. Viljele sekaviljelmät puhtaaksi. Tee puhdasviljelmistä biokemialliset varmistuskokeet alla olevien ohjeiden mukaisesti. Käytä positiivisena kontrollikantana sitraatti-, asetaatti- ja mukaattikokeissa *C. freundii* EELA 436 -kantaa, TSI-kokeessa lisäksi *E. coli* EELA 42 -kantaa, jolloin saadaan osoitetuksi TSI-agarin toimivuus sekä glukoosin, laktoosin ja/tai sakkaroosin käytön ja sulfaatin pelkistykseen osalta, mutta myös kaasuntuoton osalta.

12.2 TSI

Viljele puhdasviljelmistä TSI-agarille sekä pinta- että pistoviljelynä. Inkuboi 37 ± 1 °C/21-27 h. Viljele kontrollikannoiksi *S. flexneri* EELA 464, *E. coli* EELA 42 ja *C. freundii* EELA 436.

Shigellat eivät käytä laktoosia tai sakkaroosia, joten ne antavat alustan värisen tai punaisen (alkaalisen) pintareaktion, mutta käyttävät glukoosia, joten ne antavat keltaisen (happamen) reaktion pohjakerroksessa. Tosin *S. sonnei* -lajiin kuuluvat kannat ovat yleensä yli 40 h inkuboinnin jälkeen sekä laktoosi- että sakkaroosi-positiivisiä. Lisäksi on kuvattu laktoosiposiitiivisiä *S. flexneri* 2a - ja *S. boydii* 9 -kantoja.

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

Laktoosi ja/tai sakkaroosipositiiviset kannat muuttavat TSI-alustan pinnaltaan keltaiseksi -> koko putki keltainen.

Shigellat eivät pelkistä sulfaattia sulfidiksi, joten alusta ei mustu.

Shigellat eivät muodosta glukoosista kaasua alustaan lukuun ottamatta joitakin *S. flexneri* 6 biovaria ja joitakin *S. boydii* 13 ja 14 kantoja. HUOM! Elintarvikkeissa voi esiintyä epätyypillisiä, kaasua muodostamattomia *E. coli* -kantoja.

E. coli EELA 42 käyttää laktoosia tai sakkaroosia ja glukoosia, joten koko alusta muuttuu väriltään keltaiseksi. Lisäksi se tuottaa kaasua.

C. freundii EELA 436 ei käytä laktoosia tai sakkaroosia, joten se antaa alustan värisen tai punaisen (alkalisen) pintareaktion, mutta käyttää glukoosia, joten se antaa keltaisen (happaman) reaktion pohjakerroksessa. Se pelkistää sulfaattia sulfidiksi, joten alusta mustuu. Se ei muodosta glukoosista kaasua alustaan.

12.3 Gramvärjäys

Tee puhtasviljelmistä gramvärjäys. Shigellat ovat gramnegatiivisia sauvabakteereita.

12.4 Liikkuvuusagar

Siirrosta yksi pesäke kutakin puhtasviljelmää suoralla viljelysauvalla pistoviljelmäksi liikkuvuusagarputkeen. Inkuboi 37 ± 1 °C / 20-27 h. Viljele kontrolleiksi *S. flexneri* EELA 464 ja *E. coli* EELA 42.

Shigellat ovat liikkumattomia, joten kasvusto ei leviä pistokanavan ympärille. *E. coli* on liikkuva, joten kasvusto leviää pistokanavan ympärille. HUOM! Epätyypillisiä, liikkumattomia *E. coli* -kantoja voi esiintyä elintarvikkeissa.

12.5 Simmons sinitraattiagar

Viljele sinitraattiagar pintaviljelynä vinopinnalle. Käytä suoraa viljelysauvaa, jotta vältät puhtasviljelmäagaralustan siirtymistä siirroksen mukana sinitraattiagarille. Inkuboi 37 ± 1 °C/24 h. Viljele kontrolleiksi *S. flexneri* EELA 464 ja *C. freundii* EELA 436.

Shigellat ovat sitraattinegatiivisia, joten alustan väri säilyy muuttumattomana (vihreänä). *C. freundii* EELA 436 on sitraattipositiivinen, joten alustan väri muuttuu siniseksi.

12.6 Natriumasetaattiagar

Viljele natriumasetaattiagar vinopinnalle. Käytä suoraa viljelysauvaa, jotta vältät puhtasviljelmäagaralustan siirtymistä siirroksen mukana asetaattiagarille. Inkuboi 37 ± 1 °C /48 h. Viljele kontrolleiksi *S. flexneri* EELA 464 ja *C. freundii* EELA 436.

Mikäli kasvua ei ole todettavissa, inkuboi edelleen 48 h.

Shigellat eivät kasva tai kasvavat hyvin heikosti alustalla, joten sen väri säilyy muuttumattomana eli vihreänä. *C. freundii* EELA 436 on asetaattipositiivinen, joten alustan väri muuttuu siniseksi.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

12.7 Mukaattiliemi

Viljele mukaattiliemi siirrostamalla siihen silmukalla bakteerimassaa. Inkuboi 37 ± 1 °C /48 h. Viljele kontroleiksi *S. flexneri* EELA 464, *S. sonnei* EELA 465 ja *C. freundii* EELA 436.

Tarkastele inkuboinnin jälkeen kasvua ja värinmuodostusta. Mikäli kasvua ei ole havaittavissa, inkuboi viljelmiä edelleen 48 h ja lue uudelleen.

Shigellat ovat *S. sonnei* -lajia lukuunottamatta mukaattinegatiivisia, joten alustan väri säilyy muuttumattomana eli sinisenä. *C. freundii* EELA 436 on mukaattiposiitivinen, joten alustan väri muuttuu keltaiseksi tai oljenkeltaiseksi. *S. sonnei* -lajin mukaattireaktio on vaihteleva: 6,4 % positiivisia 48 h inkuboinnin jälkeen ja 36,7 % positiivisia 96 h inkuboinnin jälkeen.

12.8 API 20E

Mikäli eristämäsi viljelmä/viljelmät ovat tehtyjen biokemiallisten tutkimusten perusteella shigella/shigelloja, tee lisäksi API 20E valmistajan ohjeiden mukaisesti.

12.9 Serotyypitys

Lähetä shigelloiksi tunnistamasi kannat serotyypitettäväksi KTL:n suolistobakteriologian laboratorioon.

13 Tulokset

Tulos ilmoitetaan *Shigella flexneri/boydii/sonnei* todettiin/ei todettu / 25 g/ml näytettä. Serotyypitustuloksen valmistuttua ilmoitetaan myös serovari.

14 Menetelmän validointi

14.1 Tulosten oikeellisuus ja toteamisraja

Menetelmän antamien tulosten oikeellisuutta ja toteamisrajaa on tutkittu EELAn bakteriologian tutkimusyksikön elintarvikemikrobiologian ryhmän siirrostetuilla näytteillä suorittamissa validointikokeissa 2002-2003. Näytematriiseina olivat pakastekatkaravut, Brie-juusto ja jäävuorisalaatti. Näytteet siirrostettiin *S. flexneri* EELA 464 (ATCC 12022) ja *S. sonnei* EELA 465 (ATCC 25931) kannoilla 2-3 pitoisuutena. Tutkittavat shigellakannat kylmästressattiin säilyttämällä siirrostettuja näytteitä 4 ± 1 °C/5h. Lisäksi tutkittiin siirrostamattomia näytteitä.

Osaan näytteitä lisättiin myös *E. coli* -bakteeria häiritseväksi kasvustoksi. *E. coli* vaikeutti shigellojen, erityisesti *S. flexnerin* toteamista, joten tuloksia ei ole otettu huomioon menetelmän oikeellisuutta ja toteamisrajaa määritettäessä.

Immunomagneettinen separaatio ei parantanut menetelmän sensitiivisyyttä. Tosin tuolloin käytössä olleet paramagneettiset kuulat olivat vasta kehittelyasteella.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

Validoinnissa verrattiin shigellaselektiivistä lientä, joka sisälsi novobiosiinia 20 mg/l (SS-N20), liemeen, joka sisälsi selektion parantamiseksi lisäksi kaliumtelluriittia 1 mg/l (TSS-N20). TSS-N20 -liemi antoi enemmän positiivisia tuloksia *S. sonnei* -kannalla siirrostetuista katkarapu- ja salaattinäytteistä, mutta vähemmän positiivisia *S. sonnei* -kannalla siirrostetuista juustonäytteistä ja *S. flexneri* kannalla siirrostetuista salaattinäytteistä kuin SS-N20-liemi. TSS-N20 -liemestä viljellyt maljat kasvoivat joidenkin näytteiden osalta vähemmän kilpailevaa bakteeristoa kuin SS-N20 -liemestä siirrostetut. Menetelmään valittiin TSS-N20 -liemi. Validointiaineisto oli tosin pieni. Yhteenveto TSS+20N -liemellä saaduista tuloksista on taulukossa 1.

Taulukko 1. Yhteenveto shigellamenetelmän validoinneista TSS+20N -liemellä ilman *E. coli* -lisäystä.

	Pakaste- katkaravut	Brie-juusto	Jäävuorisalaatti
<i>S. sonnei</i> pmy/25g	0,8-29	0,8-29	0,8-290
Positiiviset/siirrostetut näytteet	5/6	3/6	13/14
Sensitiivisyys (%)	83	50	93
Toteamisraja (pmy/25 g)	1-8	3	1-8
<i>S. flexneri</i> pmy/25g	3-62	3-62	3-620
Positiiviset/siirrostetut näytteet	4/6	6/6	4/14
Sensitiivisyys (%)	67	100	29
Toteamisraja (pmy/25 g)	3-6	3-6	5, jos taustamikrobeja vähän, muutoin 53
Negatiiviset/0-näytteet	2/2	2/2	4/4
Spesifisyys (%)	100	100	100

15 Menetelmän status

 Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä

 Virallinen menetelmä

 Sisäinen menetelmä

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Shigella-bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen rikastus-viljelyllä

16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen käyttö	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input checked="" type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset, dispersio-indeksi	<input checked="" type="checkbox"/>
Valvontakortit	<input type="checkbox"/>

17 Viitteet

*) ISO 21567:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Shigella* spp.

*) Kopio standardista alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä huoneessa B214 (Evira, Helsinki)

18 Päivityshistoria

27.1.2012 Vastuuhenkilö vaihdettu, korjattu toimintaohjeiden numerointi. Tekninen päivitys.

Laatija: Hallanvuo Saija

LIITE: ISO 21567:2004(E), Annex C, Description of *Shigella* colony morphology and colour on selective agars for both identification and quality control purposes, liite 1