

***Yersinia enterocolitica* -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista**

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO/DIS 10273:2015

(Suoraviljely CIN –agar 30°C/24 h. Rikastus ITC-liemessä 25°C/2 vrk, KOH-käsittelyn jälkeen ja ilman KOH-käsittelyä CIN -agar 30°C/24 h. Rikastus PSB-liemessä 25°C/2 vrk, KOH-käsittelyn jälkeen ja ilman KOH-käsittelyä CIN -agar 30°C/24-48 h. Veri- tai ravintoagar 30°C/24 h. Urea, eskuliini, CR-MOX, pyratsinamidaasi, API 20E tai MALDI-TOF-tutkimus, tai vaihtoehtoinen varmistus ail-PCR ja pyratsinamidaasi. Biotyyppityksessä salisiini, ksyloosi, trehaloosi, tween-esteraasi ja indoli)

- 1) Jatkotutkimuksiin on lisätty serotyyppitys sekä virulenssigeenien osoitus PCR-menetelmillä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *Yersinia enterocolitica* -bakteerin osoittamiseen elintarvikkeista.

3 Määritelmä(t)

Yersinia -bakteerit ovat gramnegatiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia sauvabakteereita, jotka kuuluvat *Enterobacteriaceae* -heimoon. Suvussa on kolme primaarisesti ihmiselle patogeenista lajia: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. enterocolitica*. *Yersinia* -bakteerit ovat liikkumattomia 35 - 37°C:ssa, mutta liikkuvat 25°C:ssa.

Y. enterocolitica on ureaasipositiivinen ja rikkivetynegatiivinen, käyttää mannitolia ja tuottaa happoa, mutta ei kaasua glukoosista. *Y. enterocolitica* -kannat ovat sakkaroosi- ja sorbitolipositiivisia, mutta ramnoosi ja melibioosinegatiivisia. *Y. enterocolitica* ei kykene sitraatin hydrolyysiin, mitä hyödynnetään *Y. enterocolitican* erottelemisessä sen kaltaisista lajeista, etenkin *Y. intermedia* –kannoista. Psykrotrofisena *Y. enterocolitica* pystyy kasvamaan jääkaappilämpötiloissa, mutta tuhoutuu pastöroinnissa.

Y. enterocolitica -kannat jaetaan kuuteen biotyyppiin biokemiallisen testauksen perusteella (1A, 1B, 2, 3, 4 ja 5). Biotyyppiä 1A pidetään ei-patogeenisena ja biotyyppiä 1B ja 2-5 patogeenisina.

4 Periaate

Y. enterocolitica-bakteerin osoittamiseksi näytettä siirrostetaan kahteen selektiivirikastusliemeen (PSB, peptoni, sorbitoli ja sappisuolat sekä ITC, irgasaani, tikarsilliini ja kaliumkloroatti). Inkuboinnin jälkeen rikasteista siirrostetaan kahdelle

Yersinia enterocolitica -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

rinnakkaiselle selektiiviselle elatusaineelle (CIN, sis. kefsulodiini, irgasaani, novobiosiini) sekä alkaalikäsittelyn (KOH) kautta että ilman sitä.

Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan mikroskoipoimalla ja biokemiallisin testein.

CIN-alustojen tyypillisten pesäkkeiden arvioiminen on tärkeää tehdä tuoreilta primaariviljelmiltä. Tästä syystä näytteiden tutkiminen voidaan normaalissa viikkotyörytmissä aloittaa ainoastaan maanantaina tai tiistaina.

5 Mahdolliset virhelähteet

Tyypillisten pesäkkeiden tunnistaminen selektiivalustoilta on vaikeaa, jos näyte sisältää paljon taustamikrobistoa.

Y. enterocolitica -kantojen virulenssiplasmidi voi kadota laboratorio-oloissa, jos bakteeria siirrostetaan useita kertoja, inkuboidaan 37°C:ssa tai säilytetään pidempään kylmässä. Jatkosiirrostusten lukumäärä on pyrittävä pitämään mahdollisimman pienenä.

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) 4 ± 1°C jääkaappi
- 4) 25 ± 1°C lämpökaappi
- 5) 30 ± 1°C lämpökaappi
- 6) 37 ± 1°C lämpökaappi
- 7) Stereomikroskooppi

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Peptoni-sorbitoli-sappisuola-liemi (ISO-PSB)
 - 2) Irgasaani-tikarsilliini-kaliumklooraatti-liemi (ITC)
 - 3) 0,5% kaliumhydroksidiliuos (KOH)
 - 4) Kefsulodiini-novobiosiini-irgasaani-agar (CIN)
 - 5) Veriagar
 - 6) Ravintoagar
 - 7) Urea-agar
 - 8) Eskuliiniagar
 - 9) Kongopuna-magnesiumoksaattiagar (CR-MOX)
 - 10) Pyrazinamidase Diatabs -kiekkoja tai pyratsinamidaasiagar
 - 11) 5% tai 1% rauta-ammoniumsulfaatti (ammonium iron(II) sulfate)
 - 12) Simmons sintraattiagar
 - 13) API 20E
-

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia enterocolitica -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

- 14) Salisiiniliemi
- 15) Ksyloosiliemi
- 16) Trehaloosiliemi
- 17) Tween-80 agar
- 18) Seerumit O:3 ja O:9 (ja tarvittaessa O:27, O:5 ja O:8)

9 Kontrollikannat

- 1) *Yersinia enterocolitica* Biot. 4 / serotyyppi O:3 (Evira 595 tai Evira 584)
- 2) *Yersinia enterocolitica* Biot. 1A (Evira 596)
- 3) *Yersinia enterocolitica* Biot. 2 / serotyyppi O:9 (Evira 589)
- 4) *Yersinia enterocolitica* Biot. 2 /serotyyppi O:5,27 (Evira 608)(tarvittaessa)
- 5) *Yersinia enterocolitica* Biot. 1B /serotyyppi O:8 (Evira 610)(tarvittaessa)
- 6) *Yersinia kristensenii* Evira 523
- 7) *Yersinia fredriksenii* Evira 524
- 8) *Yersinia mollaretii* Evira 525
- 9) *Yersinia bercovieri* Evira 526
- 10) *Yersinia intermedia* Evira 527
- 11) *Citrobacter freundii* EELA 436

10 Näytteen esikäsittely

Elintarvike- ja rehunäytteet esikäsitellään tarvittaessa toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11 Suoritus

Suunnittele tutkimus niin, että maljat voidaan lukea välittömästi inkuboinnin päätyttyä. Maljojen säilytys jääkaapissa muuttaa pesäkkeiden ulkonäköä. Näytteiden tutkiminen voidaan normaalissa viikkotyörytmissä aloittaa ainoastaan maanantaina tai tiistaina.

Viljele selektiiviagarille viljelyn yhteydessä CIN- maljalle aina *Y. enterocolitica* –kannat Evira 595 ja 596, sekä tarvittaessa muut vertailukannat, helpottamaan tyyppillisten ja epätyypillisten pesäkkeiden erottamista lukuvaiheessa.

Kaaviokuva menetelmän suorittamisesta on esitetty liitteessä 1

11.1. Suoraviljely selektiivimaljoille

Punnitse/mittaa näytettä 25 g (ml), lisää 225 ml PSB -rikastuslientä ja homogeneroi Stomacherissa tai ravistelemalla 1 minuutin ajan.

Siirrosta 1 ml homogenaattia CIN maljoille siten että jaat 1 ml tilavuuden suurin piirtein tasan 2-4 CIN –maljalle (jos taustakasvua arvioidaan olevan paljon, käytetään useampia maljoja). Levitä siirros kolmiosauvalla huolellisesti maljojen pintaan (tuoreet maljat voivat vaatia kuivatuksen laminaarivirtauskaapissa ennen siirrostamista siirroksen imeytymiseksi kunnolla). Inkuboi maljoja $30 \pm 1^\circ\text{C}$ lämpötilassa 24 ± 2 h.

11.2. Rikastus PSB-liemessä ja viljely selektiivimaljoille

Inkuboi kohdassa 10.1 saatua PSB homogenaattia 25°C 44 ± 4 h. Suunnittele tutkimus niin, että siirrostusta rikasteesta maljalle ei tehdä perjantaina.

Sekoita PSB-liemi hyvin inkuboinnin jälkeen ja siirrosta 0,5 ml PSB-lientä 4,5 ml:aan tuoretta (käyttöpäivää edeltävänä päivänä valmistettua) 0,5% KOH-liuosta. Sekoita ja siirrosta 20 s ± 5 s kuluessa 10 µl:n silmukallinen CIN--maljalle hajotusviljelynä siten, että saadaan erillisiä pesäkkeitä. Viljele rikastusliemestä myös silmukallinen (10 µl) hajotusviljelmänä suoraan CIN-agarille. Viljele myös yllämainitut vertailukannat selektiivimaljoille. Inkuboi maljoja 30 ± 1°C lämpötilassa 24 ± 2 h.

11.3. Rikastus ITC-liemessä ja viljely selektiivimaljoille

Siirrosta 10 ml kohdassa 10.1 saatua PSB homogenaattia 90 ml:iin ITC-lientä (1:100) ja sekoita hyvin.

25°C 44 ± 4 h. Suunnittele tutkimus niin, että siirrostusta rikasteesta maljalle ei tehdä perjantaina.

Sekoita ITC-liemi hyvin inkuboinnin jälkeen ja siirrosta 0,5 ml ITC-lientä 4,5 ml:aan tuoretta (käyttöpäivää edeltävänä päivänä valmistettua) 0,5% KOH-liuosta. Sekoita ja siirrosta 20 s ± 5 s kuluessa 10 µl:n silmukallinen CIN--maljalle hajotusviljelynä siten, että saadaan erillisiä pesäkkeitä. Viljele rikastusliemestä myös silmukallinen (10 µl) hajotusviljelmänä suoraan CIN-agarille. Viljele myös yllämainitut vertailukannat selektiivimaljoille. Inkuboi maljoja 30 ± 1°C lämpötilassa 24 ± 2 h.

11.4. Maljojen lukeminen

Maljat luetaan hyvässä valaistuksessa. Apuna käytetään stereomikroskooppia.

Y. enterocolitica kasvaa CIN-agarilla 0,5 - 2 mm kokoisina pesäkkeinä. Tyypillinen pesäke on säännöllinen, keskustastaan syvänpunainen ja usein selvärajainen ("häräsilmä"). Keskustaa ympäröi läpikuultava hunttu, joka voi olla kirkas (patogeeniset kannat) tai vaalea (muut yersiniat).

Lähes tyypillisen näköisiä pesäkkeitä voivat muodostaa myös muun muassa *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella spp*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii* ja *Y. kristensenii*.

Käytä pesäkkeiden tyypillisyyden arvioimisessa apuna *Y. enterocolitica* –kantoja Evira 595 ja 596 ja tarvittaessa muita vertailukantoja.

11.5 Varmistuskokeet

Varmistuskokeet tähtäävät patogeenisen *Y. enterocolitica* tunnistamiseen, mutta antavat mahdollisuuden myös muiden *Yersinia* –lajien tunnistamiseen. Sukutasolle *Yersinia* varmistetaan pesäkemorfologian, urea-testin, API-liuskan

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia enterocolitica -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

lysiinidekarboksylaasi- (LDC), arginiinidihydrolaasi- (ADH) ja tryptofaanideaminaasitestien (TDA) avulla, tai vaihtoehtoisesti MALDI-TOF-määrityksellä.

Lajitasolla *Y. enterocolitica* varmistus tapahtuu edellisten testien lisäksi API-liuskan sakkaroosi- (SAC), sorbitoli- (SOR), ramnoosi- (RAM) ja melibioositestien (MEL) avulla. Vaihtoehtoisesti lajitason varmistus voidaan tehdä MALDI-TOF –määrityksellä.

Patogeeninen *Y. enterocolitica* varmistetaan edelleen eskuliini- ja pyratsinamidaasitesteillä tai biotyypityksellä. Lisäksi positiivinen tulos CR-MOX-testissä on vahva viite patogeenisuudesta. Patogeeninen *Y. enterocolitica* voidaan myös varmistaa *ail*-PCR- ja pyratsinamidaasitesteillä, jolloin muuta varmistusta ei tarvita.

Kaavio patogeenisen *Y. enterocolitica* varmistamisen periaatteesta on esitetty liitteessä 2.

11.5.1. Kontrollikantojen käyttö

Käytä kaikissa varmistuskokeissa kontrollikantana *Y. enterocolitica* –kanta Evira 595. Sitraattitestissä käytä positiivisena kontrollina *Yersinia intermedia* Evira 527 tai *Citrobacter freundii* EELA 436-kantaa ja CR-MOX-testissä negatiivisena kontrollina *Y. enterocolitica* 596 –kantaa.

11.5.2. Pesäkkeiden viljely ja mikroskopointi

Valitse tyypilliset pesäkkeet (5 pesäkettä/malja, jos mahdollista) jatkotutkimuksiin. Pesäkkeen tyypillisyyden tarkempaa arvioimista varten ja epätyypillisten pesäkkeiden karsimiseksi jatkotutkimuksista pesäke viljellään puhtaaksi CIN-maljalle (1 pesäke/malja). Kontrollikannat viljellään näytteiden kanssa rinnan. Maljoja inkuboidaan $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 24 ± 2 h. Puhdasviljelmien pesäkkeen ulkonäköä verrataan stereomikroskoopin avulla kontrollikantoihin ja selvästi epätyypilliset pesäkkeet hylätään. Viljele tyypilliset pesäkkeet puhtaaksi veri- tai ravintoagarille. Säilytä maljoja jääkaapissa jatkotutkimuksia varten.

11.5.3. Urea-agarin viljely ja lukeminen

Viljele pintaviljelynä ureaputki, inkuboi 25°C 48 h, tai tarvittaessa kauemmin, korkeintaan 7 vrk. Tarvittaessa ureaputkia voidaan inkuboida 30°C 24 h (esim. viikonlopputöiden välttämiseksi). *Y. enterocolitica* on ureaasipositiivinen eli kasvualusta muuttuu punaiseksi. Myös osittainen punerrus huomioidaan (heikosti positiivinen). Negatiiviset voidaan todeta varmistetuiksi negatiivisiksi 7 vuorokauden inkuboinnin jälkeen.

11.5.4. Eskuliini

Viljele eskuliiniputki pistoviljelynä. Inkuboi $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 48 h (vaihtoehtoisesti $30 \pm 1^\circ\text{C}$ / 24 h) Agarin värin muuttuminen tummaksi on positiivinen reaktio.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia enterocolitica -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista**11.5.5. Pyratsinamidaasi**

Pipetoi 0,25 ml steriiliä vettä putkeen, ja siirrosta bakteerimassaa niin paljon, että putkeen muodostuu samea suspensio (vähintään McFarland 4). Lisää yksi pyratsinamidaasikiekko ja sulje putki parafilmilla. Inkuboi 25°C 48 h. Inkuboinnin jälkeen lisää yksi pisara tuoretta (käyttöpäivänä valmistettua) 5% rauta-ammoniumsulfaattiliuosta.

Vaihtoehtoisesti testi voidaan tehdä siirrostamalla reilu silmukallinen bakteerimassaa pyratsinamidaasiagarin vinopinnalle. Inkuboi 25°C 48 h. Inkuboinnin jälkeen lisää 1 ml tuoretta (käyttöpäivänä valmistettua) 1% rauta-ammoniumsulfaattia. Reaktio luetaan 15 min kuluttua.

Punainen/oranssi väri osoittaa pyratsiinihapon muodostusta ja merkitsee positiivista reaktiota. Väritön tai vaalean keltainen väri merkitsee negatiivista reaktiota.

11.5.6. Virulenssiplasmidin läsnäolo CR-MOX -testillä

Menetelmällä tutkitaan kongopuna-magnesiumoksalaattimaljan avulla, onko eristetyllä kannalla virulenssiplasmidia.

Kosketa viljelysauvalla useita tyypillisiä pesäkkeitä eri puolilla puhtasviljelmää, ja siirrosta hajotusviljelmänä CR-MOX -agarille. Positiivisena kontrollina käytetään *Y. enterocolitica* Evira 595, negatiivisena kontrollina Evira 596-kantaa. Inkuboi 37 °C ± 1°C 48 h. Maljat on mahdollista lukea jo 24 h inkuboinnin jälkeen. Negatiiviset ja epäselvät maljat jätetään inkuboitumaan vielä toiseksi vuorokaudeksi.

Testissä kannat, joilla on virulenssiplasmidi, sitovat kongopunaa ja pesäkkeet värjäytyvät tumman oranssinpunaisiksi. Lisäksi niukka kalsiumin määrä (sidottu kasvualustasta magnesiumoksalaatin avulla) rajoittaa kantojen kasvua lämpötilan noustessa 37 C:een, jolloin pesäkkeet esiintyvät tavallista pienempinä.

Tulosten tulkinta:

Pesäkkeiden ulkonäkö	Tulos
Maljalla esiintyy pieniä, tumman oranssinpunaiseksi värjäytyneitä (plasmidillisia) pesäkkeitä (24 tai 48 h jälkeen)	Positiivinen
Maljalla esiintyy sekä pieniä, tumman oranssinpunaiseksi värjäytyneitä (plasmidillisia) pesäkkeitä, että normaalikokoisia, värittömiä tai haalean oransseja (plasmidittomia) pesäkkeitä (24 tai 48 h jälkeen)	Positiivinen
Maljalla esiintyy vain normaalikokoisia, värittömiä tai haalean oransseja (plasmidittomia) pesäkkeitä (24 tai 48 h jälkeen)	Negatiivinen

Jos kantaa inkuboidaan toistuvasti 37°C:ssa tai säilytetään useita vuorokausia huoneenlämmössä tai jääkaapissa, se voi menettää virulenssiplasmidinsa siirrostamisen yhteydessä. Testi on siksi tärkeä suorittaa mahdollisimman tuoreesta viljelmästä

11.5.7. Sitraatti (Simmons) (tarvittaessa)

Sitraattitestiä varten tee tarkistetun tyyppillisen pesäkkeen puhdasviljelmältä ja kontrolliviljelmältä objektilasille suspensio tippaan 0,9% NaCl -liuosta (jotta edelliseltä elatusaineelta mahdollisesti mukana kulkeutuva kasvusubstraatti laimentuisi). Siirrosta tätä suspensiota pintaviljelynä Simmonsin sitraattiagarille. Inkuboi 25°C 48 h. Tarvittaessa sitraattiputkia voidaan inkuboida 30°C 24 h (esim. viikonlopputöiden välttämiseksi). Reaktio on positiivinen, jos elatusaineen väri muuttuu siniseksi. Käytä positiivisena kontrollina *Yersinia intermedia* Evira 527 tai *Citrobacter freundii* (EELA 436) -kanta.

Y. enterocolitica on sitraattinegatiivinen, eli ei kasva (tai kasvaa heikosti vain siirrostuksen aloituskohdassa) Simmonsin sitraattiagarilla ja kasvualustan väri pysyy vihreänä.

11.5.8. API 20E

Valitse ureatestin perusteella tyyppilliset pesäkkeet ja tee API 20E -testi. Ymppiin tarvitaan 1 µl:n silmukallinen bakteerimassaa. Tee API-suspensiosta myös perämalja CIN- ja/tai TSA- tai veriagarille, jotta voit tarkistaa viljelmän puhtauden. Testi inkuboidaan 25°C ja luetaan 24 h kuluttua ja uudelleen 48 h kuluttua (lukuun ottamatta testejä VP, IND ja TDA, jotka luetaan ainoastaan 24 h kuluttua). Vaihtoehtoisesti testi voidaan inkuboida 30°C 24 ± 2 h (esim. viikonlopputöiden välttämiseksi). API -testin antamia reaktioita verrataan API 20E -kirjastoon, huomioiden ainoastaan erillisessä testauksessa saadut urea- ja sitraatti -tulokset, jos ne ovat ristiriidassa API-testiliuskan antamiin tuloksiin.

Patogeenisen *Y. enterocolitican* tunnistustestit:

TESTI	TULOS
Urea	+
Tryptofaani deaminaasi (TDA)	-
Glukoosi (GLU)	+
Kaasun tuotto glukoosista	-
Laktoosi	-
Vetysulfidi (H ₂ S)	-
Oksidaasi	-
Lysiini dekarboksylaasi (LDC)	-
Ornitiini dekarboksylaasi (ODC)	+ ¹⁾
Sakkarooosi (SAC)	+ ¹⁾
Ramnoosi (RHA)	-
Sitraatti (CIT)	-
Salisiini	-/ + ²⁾
Eskuliini	-/ + ²⁾
Pyratsiiniamidaasi	-
Virulenssiplasmidin läsnäolo (CR-MOX)	+ ¹⁾

¹⁾ Myös negatiivisia patogeenisia kantoja esiintyy

²⁾ Biotyyppi 1A on salisiini/eskuliini positiivinen

11.5.9. Varmistus MALDI-TOF –tutkimuksella

Pesäkemorfologialtaan *Yersinia* -tyypillisille (11.5.2) ja ureaposiitivisille (11.5.3) bakteereille voidaan lajitunnistus tehdä biokemiallisten varmistustestien sijaan MALDI-TOF –tutkimuksella työohjeen LAB 7085 mukaan. Tutkimus tulee tehdä 24 h ± 3h inkuboiduista TSA-agarin puhdaskasvustoista käyttäen suoraa siirrostusta. Jos tunnistus epäonnistuu tai tunnusluku (score) <2,2, tutkimus uusitaan. Luotettavana *Yersinia* -suvun lajitunnistuksena pidetään tunnistusta, jonka tunnusluku ≥ 2,2. Jos tunnusluku on <2,2, tulos on varmistettava biokemiallisesti. Patogeenisuuden arvioimista varten on MALDI-TOF-testauksen lisäksi tehtävä vähintään pyratsinamidaasitestausta (11.5.5.) tai vaihtoehtoisesti koko biotyypitystestausta.

12. Biotyypitys

Käytä kaikissa testeissä kontrolleina *Y. enterocolitica* biotyyppi 4 (Evira 595 tai Evira 584), *Y. enterocolitica* biotyyppi 2 (Evira 589) - ja *Y. enterocolitica* BT 1A (Evira 596) -kantoja sekä tarvittaessa negatiivisena kontrollina siirrostamatonta elatusainetta. Biotyypitys tehdään mieluiten API –suspensiosta tehdystä ei-selektiivisestä perämaljasta.

12.1 Eskuliini ja pyratsinamidaasi

Kyseiset testireaktiot kuuluvat biotyypityssarjaan, hyödynnä näiden testien kohdalla kohdissa 11.5.4. ja 11.5.5 saatuja tuloksia.

12.2 Salisiini (tarvittaessa), ksyloosi ja trehaloosi

Siirrosta bakteeriviljelmää liemiputkiin nestepinnan alapuolelle. Inkuboi 25 ± 1°C/ 48 h (vaihtoehtoisesti 30 ± 1°C/ 24 h). Jos kanta tuottaa ksyloosista, trehaloosista tai salisiinista happoa, eli reaktio on positiivinen, elatusaineen väri muuttuu sinivihreästä keltaiseksi. Jos happoa ei muodostu, elatusaineen alkuperäinen väri säilyy eikä kaasua muodostu.

12.3 Tween -esteraasi

Viljele bakteeria viiva- tai hajoitusviljelmäksi Tween-80-agarille. Inkuboi 25 ± 1°C/ 48 h. Saostuman muodostuminen kasvuston ympärille on osoitus lipaasin tuotosta. Jos kanta ei tuota lipaasia, kasvuston ympärillä ei ole samennusta. Käytä positiivisena kontrollina *Y. enterocolitica* BT 1A (Evira 596)-kanta.

12.4 Indoli

Indolintuottokyky arvioidaan yleensä API-testiliuskan tuloksen perusteella. Indolintuotto tutkitaan erillisellä indolikokeella (ISO WD 10273 mukaan), jos API20E

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia enterocolitica -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

testisarjan tulos on negatiivinen ksyloositestin antaessa samanaikaisesti positiivisen tuloksen. Kyseisessä tapauksessa varmistetaan harvinainen biotyyppi 3 (tietyillä alueilla Aasiassa yleinen) ja API-liuskan indolitestin toimivuus erillisellä indolikokeella.

12.5 Biotyypitystulosten tulkinta

Katso taulukosta, mihin biotyyppiin tutkimasi *Y. enterocolitica* kuuluu. Biotyyppiä 1A lukuunottamatta kaikissa biotyypeissä on patogeenisiä kantoja. Jos tutkimasi kanta kuuluu biotyyppihin 1B – 5, sen ilmoitetaan kuuluvan patogeeniseen biotyyppiin. Eskuliini, salisiini ja pyratsinamidaasinegatiivista ja CR-MOX positiivista kantaa pidetään patogeenisena.

Yersinia enterocolitica biotyypit

	1A	1B	2	3	4	5
Eskuliini/Salisiini	+	–	–	–	–	–
Pyratsinamidaasi	+	–	–	–	–	–
Lipaasi(Tween-esteraasi)	+	+	–	–	–	–
Ksyloosi	+	+	+	+	–	v*
Trehaloosi	+	+	+	+	+	–
Indoli	+	+	+	–	–	–

*)Kirjallisuudessa eri arvioita: viivästynyt positiivinen / heikko positiivinen / positiivinen

13 Jatkotutkimukset (tarvittaessa)

13.1 PCR

Y. enterocolitica -kannalta tutkitaan tarvittaessa PCR-menetelmillä kromosomaalisen *ail*-virulenssigeenin (Evira 3572) ja/tai virulenssiplasmidin (Evira 3524) läsnäolo.

ail-geeniin perustuvalla PCR-testauksella (Evira 3572) voidaan tarvittaessa korvata kaikki muut testit patogeenisen *Y. enterocolitica* varmistuksessa paitsi pyratsinamidaasitesti (11.5.5.) (kts. kaavio 2).

13.2 Serotyypitys

Serotyypitä alustavasti patogeenisiksi todetut viljelmät lateksiagglutinaatio-kokeella O:3- ja O:9- seerumeilla (ja tarvittaessa myös muilla seerumeilla). Seerumeiden rinnalla tulee olla negatiivisena kontrollina fysiologinen suolaliuos. Tutkittavan bakteerikannan rinnalla tulee olla positiivisina kontrolleina seuraavat bakteerikannat:

Y. enterocolitica O:3, Evira 595

Y. enterocolitica O:9, Evira 589

Viljele *Y. enterocolitica*ksi tunnistetut, biotyypitettyt pesäkkeet puhdasviljelmiksi veriagarille. Inkuboi 30 ± 1°C/ 24 h.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

***Yersinia enterocolitica* -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista**

Anna seerumeiden lämmitä huoneenlämpöiseksi ennen kokeen aloittamista. Sekoita seerumit kääntelemällä pulloja muutaman kerran kevyesti ylösalaisin.

Tiputa objektilaseille seerumia. Sekoita pisaraan silmukalla tutkittavaa bakteerimassaa sekä positiivisia kontrollikantoja.

Liikuttele lasia tummaa taustaa vasten minuutin ajan. Ryynimäinen sakka = positiivinen tulos, tasainen samennus = negatiivinen tulos. Tee koe molemmilla seerumeilla.

Jos saat positiivisen tuloksen, tarkista, että kanta ei autoagglutinoi. Koe suoritetaan kuten edellä, mutta seerumin tilalla on fysiologinen suolaliuos.

14. Tulokset

Tulos ilmoitetaan *Yersinia enterocolitica* todettu/ei todettu /25 g (ml) näytettä tai tutkittu määrä. Biotyyppityksen perusteella voidaan lisäksi ilmoittaa kuuluuko bakteerikanta patogeeniseen biotyyppiin.

15. Menetelmän validointi

Menetelmää on validoitu viimeksi vuosina 2013-2014 EU-rahoitteen CEN mandaatin 13 laboratorion välisen kollaboratiivisen testauksen yhteydessä.

16. 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"/>

17. Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailu/kontrollikantojen käyttö	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input checked="" type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>
Valvontakortit	<input type="checkbox"/>

18. Viitteet

ISO 10273:2003. Microbiology – General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*

Hakkinen, M. 2001. *Yersinia enterocolitica* –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista – menetelmän validointi. EELA, sisäinen raportti.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia enterocolitica -bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

Hallanvuo S, Peltola J, Heiskanen T, Siitonen A: Simplified phenotypic scheme evaluated by 16S rRNA sequencing for differentiation between *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica* –like species. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 1077-1080.

Pöytäkangas, M. 1999. Mikrobiologisten tutkimusmenetelmien validointi: *Yersinia enterocolitica* –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista– menetelmän validointi. Insinööriyö, Espoon-Vantaan teknillinen ammattikorkeakoulu.

Wauters, G., Kandolo, K. & Janssens, M. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. Contr. Microbiol. Immunol. 9, 14 – 21.

19. Muutokset edelliseen versioon

Ohjeen laatija: Saija Hallanvuo

Evira 3445/4 menetelmäohjeen Maldi-Tof:in luotettavan tunnistuksen alarajaa on muutettu (2,3 > 2,2) perustuen 26.10.2015 päivättyyn validointiraporttiin. Menetelmäviite on korjattu ISO/DIS 10273:2015:ksi.