

Enterobakteerien määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 21528-2:2004

(VRBG 37 °C/24h, ravintoagar/TSA 37 °C/24h, oksidaasikoe, glukoosiagar 37 °C/24h)

- 1) Ravintoagarin sijasta voidaan käyttää TSA:ta.
- 2) Siirrostettava näytemäärä voi olla myös 0,1 ml.
- 3) Menetelmää voidaan soveltaa myös orgaanisille lannoitevalmisteille.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu enterobakteerien määrittämiseen elintarvikkeista, rehuista ja orgaanisista lannoitevalmisteista pesäkelaskentatekniikalla 37 °C:ssa.

3 Määritelmä(t)

Enterobakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobeja, gramnegatiivisia ja oksidaasi-negatiivisia sauvoja, jotka fermentoivat glukoosia.

4 Periaate

Näyte viljellään maljavalutekniikalla käyttäen rinnakkaismaljoja. Maljoja inkuboidaan aerobisesti 37 ± 1 °C / 24 ± 2 h ja pesäkkeet lasketaan. Pesäkemäärien ja laimennosten perusteella lasketaan enterobakteerien määrä millilitrassa tai grammassa näytettä.

5 Mahdolliset virhelähteet

Jotkut enterobakteerit muodostavat halkaisijaltaan alle 0,5 mm olevia pesäkkeitä. Siksi maljat saa lukea aikaisintaan 22 h kuluttua.

Maljoilla saattaa kasvaa oksidaasipositiivisia pesäkkeitä (*Aeromonas*), jotka kuitenkin karsiutuvat oksidaasitestillä.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratorioissa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223. Menetelmän reagenssit ja elatusalustat eivät edellytä erityisiä varotoimenpiteitä.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Tasoravisteliija tai Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher -400 pusseja
- 3) Lämpökaappi 37 ± 1 °C

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Laimennusliuos: peptoni-suolaliuos (PEPSU) tai Dilucup, ellei toimintaohjeessa LAB 728 toisin mainita
- 2) Violettipuna-sappi-glukoosi (VRBG)-agar 100 tai 200 ml pulloissa
- 3) Ravintoagar-/TSA-maljat
- 4) Glukoosiagarputket
- 5) Oksidaasireagenssi

9 Kontrollikannat

- 1) *Escherichia coli* EELA 42
- 2) *Pseudomonas aeruginosa* EELA 258

10 Näytteen esikäsittely

Näytemäärä on 10 g tai enemmän riippuen näytteen paloiteltavuudesta. Kovia, kuivattuja näytteitä, kuten kuivalihoa tai purutikkuja, seisotetaan 1:10 laimennoksessa 30 minuuttia + 4 °C ennen laimennussarjan tekoa. Lisää näytteiden esikäsittelystä on luettavissa toimintaohjeesta LAB 702.

11 Suoritus

Sulata ja temperoi tarvittava määrä VRBG-agaria (25 ml/näyte) toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

Tee näytteestä sopivat laimennokset esimerkiksi toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

Viljele laimennoksista rinnakkaiset maljat. Pipetoi tyhjiin petrimaljoihin 1 ml (0,1 ml) laimennoksia. Kaada maljoihin n. 10 ml temperoitua VRBG-agaria, sekoita hyvin ja anna jähmettyä. Kaada jähmettymisen jälkeen maljoille n. 15 ml pintakerros samaa agaria ja anna jähmettyä. Inkuboi 37 ± 1 °C / 24 ± 2 h.

11.1 Pesäkkeiden laskeminen

Enterobakteerit kasvavat VRBG-agarilla vaaleanpunaisina tai punaisina pesäkkeinä, joita saattaa ympäröidä saostumakehä. Pesäkkeet voivat olla myös limaisia ja värittömiä tai valkeita. Pesäkkeiden halkaisija tulee olla vähintään 0,5 mm.

Laske tyypilliset pesäkkeet maljoilta, joilla kasvaa vähemmän kuin 150 pesäkettä.

12 Varmistuskokeet

12.1 Pesäkkeiden valinta varmistuskokeisiin

Viljele varmistettavista pesäkkeistä puhdasviljelmät varmistuskokeita varten ravinto-agarille tai TSA:lle. Ellei maljalla kasva tyypillisiä pesäkkeitä, valitse valkeita pesäkkeitä varmistettavaksi. Varmista vähintään viisi pesäkettä. Jos näytematriisissa kasvaa runsaasti enterobakteereja (esim. komposti, raa'at kasvikset), voit varmistaa useampia pesäkkeitä (esim. 10 kpl). Inkuboi maljoja 37 ± 1 °C / 24 ± 2 h.

Tee puhdasviljelmistä varmistuskokeet.

12.2 Oksidaasikoe

Tee oksidaasikoe työhjeen LAB 2055 mukaisesti. Käytä tarvittaessa kontrollikantoina *E. coli* EELA 42 -kantaa (oksideasinegatiivinen) ja *P. aeruginosa* EELA 258 -kantaa (oksideasiposiitivinen).

Enterobakteerit ovat oksidaasinegatiivisia.

Mikäli kanta on oksidaasiposiitivinen, älä jatka kantaa glukoosin fermentaatiokokeeseen.

12.3 Glukoosin fermentaatio

Siirrosta pesäke pistoviljelynä glukoosiagarputken pohjalle. Inkuboi 37 ± 1 °C / 24 ± 2 h. Käytä tarvittaessa positiivisena kontrollina *E. coli* EELA 42 -bakteerikantaa ja negatiivisena kontrollina siirrostamatonta glukoosiagarputkea.

Enterobakteerit fermentoivat glukoosia, jolloin elatusaineen väri muuttuu violetista keltaiseksi. Useimmat enterobakteerit tuottavat lisäksi kaasua.

13 Tulokset

13.1 Tulosten laskeminen

Tuloksen laskeminen kuvattu toimintaohjeessa LAB 703.

Laskukaava: $\frac{\text{pmy/g} \times \text{oksideasinegatiivisten lkm} \times \text{glukoosiposiitivisten lkm}}{\text{oksideasitestin lkm} \times \text{glukoositestien lkm}}$

13.2 Tulosten ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan enterobakteerien pitoisuutena pmy/g tai pmy/ml toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

14 Menetelmän validointi

Menetelmää ei ole validoitu. Menetelmä on ollut käytössä pitkään.

15 Menetelmän status

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

16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen/kontrollikantojen käyttö (tarvittaessa)	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismäärittäykset	<input type="checkbox"/>

17 Viitteet

ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count method.

ISO/FDIS 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.

18 Muutokset edelliseen versioon

21.9.2012 Evira 3462/05

Kohta 6. Lisätty lause työturvallisuuskappaleeseen. Kohta 10. Täydennetty näytteiden esikäsittelyä kuivien näytteiden ja näytemäärän osalta. 12.1. Vähennetty varmistettavien pesäkkeiden lukumäärä viiteen (-10 kpl). 12.2. ja 12.3. Varmistustestien kontrollikantojen käyttö muutettu tarvittaessa tehtäväksi (esim. perehdytettäessä). 13.1. Lisätty laskukaava.Laatiija: Satu Hakola.