

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 6888 -1:1999,/ Amd 1:2003, muunnos.

(Baird-Parker 37 °C / 24 – 48 h, naudanveriagar 37 °C / 24 h, koagulaasikoe)

- 1) Varmistettavista pesäkkeistä viljellään puhdasviljelmät veriagarille.
- 2) Tulokset ilmoitetaan toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu koagulaasipositiivisten stafylokokkien määrittämiseen elintarvikkeista ja rehuista.

3 Määritelmä(t)

Staphylococcus-sukuun kuuluu fakultatiivisesti anaerobisia, gram- ja katalaasipositiivisia, kokkimuotoisia bakteereita. Osa lajeista on koagulaasipositiivisia. Koagulaasipositiivisten stafylokokkien joukossa on kantoja, jotka voivat tuottaa stafylokokkienterotoksiinia. Pääasiassa tällainen on *S. aureus*, mutta eräät *S. intermedius* ja *S. hyicus* kannat voivat myös muodostaa enterotoksiineja.

4 Periaate

Koagulaasipositiiviset stafylokokit määritetään kvantitatiivisesti viljelemällä tunnettu määrä näytettä selektiiviselle alustalle. Inkuboinnin jälkeen lasketaan erikseen tyypillisen näköiset ja epätyypilliset pesäkkeet. Osa pesäkkeistä varmistetaan tutkimalla vapaan koagulaasin muodostus putkikoagulaasikokeella.

5 Mahdolliset virhelähteet

Baird-Parkerilla voi kasvaa epätyypillisiä pesäkkeitä tai muuta häiritsevää kasvustoa. Koagulaasikokeen tuloksen tulkinta voi joskus olla vaikeaa, jos tulkinta suoritetaan suositusajan jälkeen.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

7 Laitteet ja välineet

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

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Peptonisuolaliuos, peptoni 0,1%, suola 0,85% (PEPSU) tai Dilucup, mikäli toimintaohjeessa LAB 703 ei toisin mainita
- 2) Baird–Parker -agar (BP) maljoina tai pulloissa
- 3) Munankeltuais–telluriitti -emulsio
- 4) Veriagar
- 5) Koagulaasi-putket

9 Kontrollikannat

- 1) *Staphylococcus aureus* EELA 6

10 Näytteen esikäsittely

Esikäsittele näyte tarvittaessa toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

11 Suoritus

11.1 Agarin sulatus ja temperointi

Sulata tarvittaessa Baird–Parker -agar ja jäähdytä se 45 °C:een ennen valamista toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti. Lisää jäähtyneeseen agariin munankeltuais–telluriitti -emulsiota 5 ml/100 ml agaria, ja vala maljoiksi.

Kuivata maljoja ennen siirrostusta laminaarikaapissa 20 – 30 minuuttia.

Tee näytteestä tarvittavat laimennokset toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11.2 Viljely

Siirrosta laimennoksista pintalevityksenä 0,1 ml Baird–Parker -agarille (maljan halkaisija 90 mm), viljele rinnakkaiset maljat. Jos on tarpeen määrittää pieniä pitoisuuksia, voit siirrostaa näytteestä tai ensimmäisestä laimennoksesta 1,0 ml isolle (halkaisija 140 mm) Baird–Parker -maljalle tai jakaa 1,0 ml kolmelle tavalliselle maljalle.

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

Inkuboi maljoja 37 °C / 24 ± 2 h ja 48 ± 2 h.

11.3 Pesäkkeiden laskeminen

Tarkastele maljoja sekä 24 h että 48 h inkuboinnin jälkeen

Merkitse maljan pohjaan kaikki tyypilliset pesäkkeet 24 h kasvatuksen jälkeen. Merkitse 48 h kasvatuksen jälkeen uudet tyypilliset ja erikseen mahdolliset epätyypilliset pesäkkeet. Laske pesäkkeet maljoilta, joilla on korkeintaan 150 tyypillistä pesäkettä.

Tyypilliset pesäkkeet ovat mustia tai harmaita, kiiltäviä ja kuperia. Halkaisija on 1 – 1,5 mm 1 vrk jälkeen ja 1,5 – 2,5 mm 2 vuorokauden jälkeen. Pesäkkeitä ympäröi kirkas vyöhyke. Aivan pesäkkeen ympärillä kirkkaassa vyöhykkeessä näkyy usein kapea, läpinäkymätön rengas.

Epätyypillisiä pesäkkeitä muodostavia koagulaasipositiivisia stafylokokkeja esiintyy esim. maitovalmisteissa ja katkaravuissa. Epätyypilliset stafylokokkipesäkkeet ovat kiiltävän mustia ja niitä voi ympäröidä kapea valkoinen rengas. Kirkastunut vyöhyke on tuskin nähtävissä tai sitä ei ole lainkaan. Samoin läpinäkymätön rengas puuttuu tai on heikosti näkyvä. Vaihtoehtoisesti epätyypilliset pesäkkeet voivat olla väriltään harmaita; näiltä pesäkkeiltä kirkastunut vyöhyke puuttuu.

12 Varmistuskokeet

12.1 Pesäkkeiden valinta varmistuskokeisiin

Viljele tyypillisistä ja epätyypillisistä pesäkkeistä puhdasviljelmät veriagarille. Jos mahdollista, varmista vähintään viisi tyypillistä ja viisi epätyypillistä pesäkettä jokaiselta laskettavalta maljalta. Inkuboi 37 °C 24 ± 2 h.

Tee puhdasviljelmistä varmistuskokeet. Käytä positiivisena kontrollina *S.aureus* EELA 6 -kantaa.

12.2 Puhdasviljelmien tarkastelu

Tarkastele puhdasviljelmän hemolyysiä ja pesäkemorfologiaa. Stafylokokit kasvavat veriagarilla sileinä, läpinäkymättöminä ja kuperina harmaanvalkoisina tai heikosti keltaoransseina pesäkkeinä. Pesäkkeiden halkaisija on 1 – 2 mm. Useimmat koagulaasipositiiviset kannat ovat hemolyyttisiä, mutta ei-hemolyyttisiäkin kantoja esiintyy.

12.3 Koagulaasipositiivisten stafylokokkien varmistaminen

Varmista kantojen vapaan koagulaasin tuotto putkiagglutinaatiokokeella työohjeen LAB 2051 mukaisesti.

S. aureuksen lisäksi ainoastaan *S. intermedius* ja osa *S. hyicus* subsp. *hyicus* -kannoista tuottavat vapaata koagulaasia. Toisin kuin *S. aureus* ja *S. intermedius*,

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

useimpien *S. hyicus* subsp. *hyicus* -kantojen koagulaasireaktio on kuitenkin myöhäinen ja heikko.

13 Tulokset

13.1 Tulosten laskeminen

Laske tulos toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

13.2 Tulosten ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan koagulaasipositiivisten stafylokokkien määränä pmy/g tai ml näytettä toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

14 Menetelmän validointi

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien määritysmenetelmän validointitulokset (De Buyser et al. 2003) on esitetty viitemenetelmän lisälehdessä 1 (Amendment 1, 2003).

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 elintarvikemikrobiologiassa	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>

17 Viitteet

ISO 6888-1 (1999) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

Amendment 1 (2003) Inclusion of precision data. Alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä huoneessa B214

De Buyser, M.L., Lombard, B., Shulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, R., Lahellec, C. (2003) Validation of EN ISO standard methods 6888 part 1 and 2:1999,

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Koagulaasipositiivisten stafylokokkien määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka.

Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. Int. J. Food Microbiol., 83(2), 185-194.

18 Muutokset edelliseen versioon

17.2.2014 Evira 3466/5. Menetelmästä poistettu *Staphylococcus aureus* –bakteerin määrittäminen ja muutoksen myötä toinen kontrollikanta *Staphylococcus epidermidis* EELA 40. Työturvallisuuden toimintaohjeen numero korjattu. Toiseksi vastuuhenkilöksi vaihdettu Hakkisen tilalle Annukka Markkula.
Ohjeen laatijat: Satu Hakola ja Annukka Markkula.