

***Yersinia pseudotuberculosis* –bakteerin osoittaminen**

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

Bacteriological Analytical Manual Online, 2001. USDA, Center for Food Safety & Applied Nutrition, muunnos.

(Rikastus FMP-liemessä 4 °C / 7-14 vrk, viikoittain KOH-käsittelyn jälkeen CIN-agarille ja ilman KOH-käsittelyä YPSA-agarille 30 °C / 48 h. Veri- tai ravintoagar 30 °C / 24 h. Ureaasi, sitraatti, CR-MOX, pyratsinamidaasi, API 20E tai MALDI-TOF-tutkimus).

- 1) Käytetään MacConkey-agarin tilalla YPSA-agaria
- 2) Käytetään KOH-liuosta, jonka pitoisuus on 0,25 %
- 3) Selektiiviagarmaljoja inkuboidaan 30°C / 48 h
- 4) Varmistustesteihin tehty muutoksia (Schiemann & Wauters, 1992)

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *Yersinia pseudotuberculosis* -bakteerin osoittamiseen elintarvikkeista, ympäristö ja ulostenäytteistä. Menetelmällä voi tulla esiin myös *Y. enterocolitica*, mutta sen osoittamiseen on oma menetelmä.

3 Määritelmä(t)

Yersinia-suku, joka kuuluu *Enterobacteriaceae*-heimoon, käsittää 11 lajia. Yersiniat ovat gramnegatiivisia, oksidaasinegatiivisia, katalaasipositiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia sauvabakteereita, jotka fermentoivat glukoosia. *Yersinia* -sukuun kuuluvat bakteerit ovat liikkumattomia 35 – 37 °C:ssa, mutta liikkuvat 25 °C:ssa. Suvussa on kolme primaarisesti ihmiselle patogeenista lajia: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. enterocolitica*. Näistä pääasiassa elintarvikkeiden välityksellä leviäviä ovat *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. enterocolitica*.

Y. pseudotuberculosis on ureaasipositiivinen ja rikkivetynegatiivinen, fermentoi mannitolia ja muodostaa happoa, mutta ei kaasua glukoosista. Siltä puuttuu fenyylialaniinideaminaasi- (TDA), lysiinidekarboksylaasi- (LDC) ja arginiinidihydrolaasiaktiivisuudet (ADH). Se ei kykene sitraatin hydrolyysiin (Suomessa harvinaista *Y. pseudotuberculosis* -biotyypin 3 lukuunottamatta). Se erotetaan *Y. enterocolitica* -bakteerista negatiivisten sakkaroosi- (SAC) ja D-sorbitolitestien (SOR) ja positiivisen L-ramnoositestin (RHA) avulla. Se on psykrotrofi ja pystyy kasvamaan jääkaappilämpötilassa, mutta tuhoutuu tavanomaisessa pastöroinnissa.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia pseudotuberculosis –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

4 Periaate

Y. pseudotuberculosis -bakteerin osoittamiseksi näytettä rikastetaan FMP-rikastusliemessä (sis. peptonia ja mannitolia) 4 °C:n lämpötilassa 2 viikon ajan. Rikastetta siirrostetaan viikoittain CIN-agarille KOH-käsittelyn jälkeen ja YPSA-agarille ilman KOH-käsittelyä.

Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan mikroskopoimalla ja biokemiallisin testein.

Y. pseudotuberculosis –kantojen virulenssiplasmidi voi kadota laboratorio-oloissa, jos bakteeria siirrostetaan useita kertoja tai inkuboidaan 37°C:ssa. Jatkosiirostusten lukumäärä on pyrittävä pitämään mahdollisimman pienenä.

5 Mahdolliset virhelähteet

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

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 ± 2°C jääkaappi
- 4) 25 ± 1 °C lämpökaappi
- 5) 30 ± 1 °C lämpökaappi
- 6) 37 ± 1 °C lämpökaappi
- 7) Stereomikroskooppi

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Fosfaatti-mannitoli-peptoni –liemi (FMP)
 - 2) Kaliumhydroksidi –liuos, 0,25% (KOH)
 - 3) Kefsulodiini-novobiosiini-irgasaani – agar (CIN)
 - 4) *Yersinia pseudotuberculosis* selektiiviagar (YPSA)
 - 5) Veriagar
 - 6) Ravintoagar
 - 7) Urea-agar
 - 8) API 20E
 - 9) Simmons sintraattiagar
 - 10) Kongopuna-magnesiumoksalaattiagar (CR-MOX)
 - 11) API 20E
 - 12) Pyrazinamidase Diatabs -kiekkoja tai pyratsinamidaasiagar
 - 13) 5% tai 1% rauta-ammoniumsulfaatti (ammonium iron(II) sulfate)
-

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia pseudotuberculosis –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

9 Kontrollikannat

- 1) *Yersinia pseudotuberculosis* EELA 472
- 2) *Yersinia pseudotuberculosis* Evira 612
- 3) *Yersinia pseudotuberculosis* Evira 736
- 4) *Yersinia enterocolitica* Biot. 4 / serotyyppi O:3, Evira 595
- 5) *Yersinia enterocolitica* Biot. 1A, Evira 596
- 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 vuorokauden ja kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Maljojen säilytys jääkaapissa muuttaa pesäkkeiden ulkonäköä.

Elintarvike- ja ympäristönäytteet

Punnitse/mittaa näytettä 25 g (ml), lisää 225 ml rikastuslientä ja homogeneroi stomacherissa tai ravistelemalla 1 minuutin ajan. Testinäytteen ja rikastusliemen suhde tulee olla 1:9 (massa/tilavuus).

Pintasivelynäytteet tai maitosuodatinnäytteet: Ei punnita. Lisää näytepussiin 225 ml rikastuslientä. Sekoita huolellisesti käsin puristelemalla.

Ulostenäytteet

Punnitse 10 g ulostenäytettä, lisää 90 ml rikastuslientä ja homogeneroi stomacherissa tai ravistelemalla 1 minuutin ajan.

11.1 Suoraviljely selektiivimaljoille

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 (tuoret maljat voivat vaatia kuivatuksen laminaarivirtauskaapissa ennen siirrostamista siirroksen imeytymiseksi kunnolla). Inkuboi maljoja 30 ± 1 °C lämpötilassa 24 ± 2 h.

11.2 Rikastusviljely

Inkuboi rikastuliemiä 4 ± 2 °C:ssa.

Viljele rikastusliemestä selektiivimaljoille 7 vrk \pm 1 vrk ja 14 vrk vrk \pm 1 vrk:n inkuboinnin jälkeen. Suunnittele tutkimus niin, että siirrostusta rikasteesta maljalle ei tehdä perjantaina.
Inkuboi 4 ± 2 °C:ssa.

Viljele rikastusliemestä selektiivimaljoille 7 vrk \pm 1 vrk ja 14 vrk vrk \pm 1 vrk:n inkuboinnin jälkeen. Suunnittele tutkimus niin, että siirrostusta rikasteesta maljalle ei tehdä perjantaina.

11.3 Viljely selektiiviagarimaljoille

Sekoita rikastusliemi hyvin inkuboinnin jälkeen. Siirrosta 0,5 ml rikastusliemestä 4,5 ml:aan tuoretta (käyttöpäivää edeltävänä päivänä valmistettua) 0,25% KOH-liuosta. Sekoita ja siirrosta 20 s \pm 5 s kuluessa silmukallinen (10 μ l) hajotusviljelmänä CIN -agarille Tee rinnakkaisviljelmät CIN-agarille. Viljele YPSA-agar ilman KOH-käsittelyä.

Jos *Y. pseudotuberculosis* todetaan jo 7 vrk:n rikastuksen jälkeen, kylmärikastusta ei tarvitse jatkaa.

Viljele aina CIN- ja YPSA-maljoille *Y. pseudotuberculosis* (EELA 472 ja/tai EVIRA 612) –kanta positiiviseksi kontrolliksi. Viljele YPSA-maljalle *Y. enterocolitica* Evira 596 -kanta negatiiviseksi kontrolliksi. Viljele tarvittaessa myös muut kontrollikannat selektiivimaljoille helpottamaan tyypillisten ja epätyypillisten pesäkkeiden erottamista lukuvaiheessa.

Inkuboi CIN-maljoja 30 ± 1 °C lämpötilassa 24 ± 2 h. Maljat tarkistetaan aina myös 48 h kuluttua. Inkuboi YPSA-maljoja 30 ± 1 °C 48 ± 4 h.

11.4 Maljojen lukeminen

Maljat luetaan hyvässä valaistuksessa. Apuna käytetään stereomikroskooppia.

Tyypillinen pesäke on tavallisesti hyvin pieni ($\leq 0,5$ mm), eikä helposti erotu paljaalla silmällä 24 h inkuboinnin jälkeen. Aluksi tyypillinen pesäke voi olla väritön ja läpikuultava. Myöhemmin pesäkkeen keskusta muuttuu syvän punaiseksi, ja se voi olla kupera ja epäselväräinen. Pesäkkeen reunat ovat läpikuultavat. Stereomikroskoopilla katsottaessa keskusta on hyvin tumma, kiteinen tai rakeinen. Lähes tyypillisen näköisiä pesäkkeitä voivat muodostaa 24 h inkuboinnin jälkeen myös muun muassa *Y. intermedia* ja *Y. kristensenii*.

YPSA-agarilla *Y. pseudotuberculosis* -pesäkkeet ovat ruskeanmustia tai ruskeanharmaita, mattapintaisia, pinnaltaan epätasaisia. Pesäkkeen halkaisija on n. 1 mm 48 h inkuboinnin jälkeen.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia pseudotuberculosis –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

11.5 Varmistuskokeet

11.5.1 Kontrollikantojen käyttö

Käytä kaikissa varmistuskokeissa kontrollikantoina *Y. pseudotuberculosis* (EELA 472, EVIRA 612) –kantoja. 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 ± 1 °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 30 °C/24 h. *Y. pseudotuberculosis* on ureaasipositiivinen eli elatusaine muuttuu punaiseksi.

11.5.4 Sitraatti (Simmons) (tarvittaessa)

Sitraattitestiä varten tee tarkistetun tyypillisen 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) -kantaa.

Y. pseudotuberculosis on sitraattinegatiivinen (poikkeuksena harvinainen biotyyppi 3), eli ei kasva (tai kasvaa heikosti vain siirrostuksen aloituskohdassa) Simmonsin sitraattiagarilla ja kasvualustan väri pysyy vihreänä.

11.5.5 Virulenssiplasmidin läsnäolo CR-MOX -testillä

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

Kosketa viljelysauhalla useita tyypillisiä pesäkkeitä eri puolilla puhdasviljelmää, ja siirrosta hajoitusviljelmänä CR-MOX -agarille. Positiivisena kontrollina käytetään *Y.pseudotuberculosis* EELA 472/EVIRA 612- kantaa, negatiivisena kontrollina Evira

Yersinia pseudotuberculosis –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

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, värjättömiä tai haalean oransseja (plasmidittomia) pesäkkeitä (24 tai 48 h jälkeen)	Positiivinen
Maljalla esiintyy vain normaalikokoisia, värjättömiä 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.

11.5.6 API 20E

Valitse ureatestin perusteella tyypilliset pesäkkeet ja tee API 20E -testi. Ympäriin tarvitaan 1 µl:n silmukallinen (vähintään 3-5 pesäkettä) 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 ± 3 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.

11.5.7 Varmistus MALDI-TOF –tutkimuksella

Pesäkemorfologialtaan *Yersinia* -tyypillisille (11.4.2) ja ureapositiivisille (11.4.3) 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.

12 Jatkotutkimukset (tarvittaessa)

Y. pseudotuberculosis –kantojen lisävarmistamiseksi (esim. tapauksissa jossa epäillään kannan menettäneen virulenssiplasmidinsa) voidaan tehdä pyrasiinamidaasi- ja PCR -testaus. *Y. pseudotuberculosis* on pyrasiinamidaasinegatiivinen ja sillä on kromosomaalinen *ail* –virulenssigeeni.

12.1 Pyrazinamidaasi

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

Vaihtoehtoisesti testi voidaan tehdä siirrostamalla bakteerimassaa pyrasiinamidaasiagarin vinopinnalle. Inkuboi 25 °C 48 h. Inkuboinnin jälkeen lisää 1 ml 1% rauta-ammoniumsulfattia. Reaktio luetaan 15 min kuluttua.

Punainen/oranssi väri osoittaa pyrasiinihapon muodostusta ja merkitsee positiivista reaktiota. Väritön tai vaalean keltainen väri merkitsee negatiivista reaktiota. *Y. pseudotuberculosis* on pyrasiinamidaasinegatiivinen.

12.2 PCR

Tarvittaessa voidaan tutkia PCR-menetelmillä onko *Y. pseudotuberculosis* -kannalla kromosomaalinen *ail*-virulenssigeeni (Evira 3573) ja/tai virulenssiplasmidi (Evira 3524).

13 Tulokset

13.1 Tulosten ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan *Yersinia pseudotuberculosis* todettu/ ei todettu/25 g (ml) näytettä tai tutkittu määrä.

14 Menetelmän validointi

Menetelmä on validoitu jäävuorisalaatilla ja porkkanaraasteella. Menetelmän toteamisraja jäävuorisalaatilla on alle 20 pmy/25 g, herkkyys 100 %. Porkkanaraasteella toteamisraja on suuruusluokkaa 10² pmy / 25 g, herkkyys 100 %. (Järveläinen, 2006).

Vuonna 2014 menetelmää on validoitu MALDI-TOF -analyysiin pohjautuvan varmistuksen osalta.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Yersinia pseudotuberculosis –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista

15 Menetelmän status

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

16 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"/>

17 Viitteet

Bacteriological Analytical Manual Online, 2001. USDA, Center for Food Safety & Applied Nutrition. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/>.

Järveläinen, A. 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* –bakteerin osoittaminen elintarvikkeista – menetelmän validointi.

Järveläinen, A. *Yersinia pseudotuberculosis* –bakteerin analytiikka, *Y. pseudotuberculosis* – ja *Y. enterocolitica* –bakteerien esiintyminen kotimaisissa porkkanoissa, sekä patogeenisten *Yersinia* –kantojen tunnistaminen. Pro gradu –työ. Helsingin Yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, mikrobiologian osasto. (Valmistuu talvella 2006-2007)

Schiemann, DA & Wauters, G. 1992. *Yersinia*. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (toim. Vanderzant C & Splitstoesser DF), APHA, 3. painos.

18 Muutokset edelliseen versioon

Evira 3503/3 menetelmäohjeen sovellusalue on laajennettu ympäristö- ja ulostenäytteille ja siihen on lisätty ko. näytteiden esikäsittelyohjeet sekä suoraviljely. Maldi-Tof:in luotettavan tunnistuksen alarajaa on muutettu (2,3 > 2,2) perustuen 26.10.2015 päivättyyn validointiraporttiin.
