

Patogeenisten *Vibrio* –suvun bakteerien osoittaminen elintarvikkeista

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

NMKL 156:1997, muunnos

- 1) Menetelmä ei sisällä kvantitatiivista määrittystä
- 2) Näytettä punnitaan 20 g:n sijasta 25 g
- 3) Rikastuslienteen inkubointilämpötila on 42 ± 1 °C:n sijasta $41,5 \pm 0,5$ °C
- 4) Biokemiallinen varmistus tehdään API 20E:llä

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *Vibrio parahaemolyticus*-, *Vibrio cholerae*-, *Vibrio vulnificus*- ja *Vibrio alginolyticus* –lajien osoittamiseen elintarvikkeista.

3 Määritelmä(t)

Vibrio-suvun bakteerit ovat gramnegatiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia, liikkuvia, pilkunmuotoisia tai suoria sauvoja. Useimmat lajit ovat oksidaasi- ja katalaasipositiivisia ja käyttävät glukoosia, mutta eivät muodosta kaasua. Lähes kaikille lajeille Na^+ -ionit ovat välttämätön kasvutekijä.

Vibriot ovat yleisiä bakteereita suolapitoisuudeltaan vaihtelevissa vesiympäristöissä, missä ne voivat elää sekä vapaina että meressä elävien eläinten pinnalla ja suolistossa. Joitakin lajeja esiintyy myös makeissa vesissä.

Vibrio parahaemolyticus, *V. cholerae*, *V. vulnificus* ja *V. alginolyticus* kasvavat 42°C:ssa, eivät tuota arginiinidehydrolaasia, tuottavat lysiinidekarboksylaasia ja pelkistävät nitraattia nitriitiksi. *V. cholerae* ja *V. alginolyticus* hajottavat sakkaroosia, *V. parahaemolyticus* ja *V. vulnificus* eivät. *V. cholerae* pystyy kasvamaan ilman natriumioneja, kun taas *V. alginolyticus* voi kasvaa jopa 10% suolapitoisuudessa.

4 Periaate

Patogeenisten *Vibrio*-lajien osoittamista varten näytettä siirrostetaan kahteen rinnakkaiseen selektiiviseen rikastusliemeen (alkalinen peptonivesi, jossa 2 % NaCl, pH 8,6 ja suola-polymyksiiniliemi, jossa 2% NaCl ja polymyksiini). Inkuboinnin jälkeen rikasteet viljellään selektiiviagarille (TCBS, sis. tiosulfaatti, sitraatti, suola ja sakkaroosi). Tyypilliset pesäkkeet varmistetaan mikroskopoimalla ja biokemiallisin testein.

5 Mahdolliset virhelähteet

Jos matriisissa on runsaasti taustaflooraa, tyypillisten pesäkkeiden havaitseminen selektiivimaljoilta on vaikeaa. Eristysten puhtauden toteaminen suolaravintoagarilta voi tuottaa hankaluuksia.

Jos näytteitä tai viljelmiä säilytetään alle 7°C:ssa, vibriot voivat kuolla.

Vibriot voivat tuhoutua näytteestä pakastettaessa.

TCBS-agarmaljojen säilyvyysaika on vain 1 vrk. Vanhentuneilta maljoilta tyypillisten pesäkkeiden tunnistaminen on epävarmaa ja taustafloora voi häiritä toteamista

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) Lämpökaappi $41,5 \pm 0,5$ °C
- 4) Lämpökaappi 37 ± 1 °C
- 5) Jääkaappi 7 – 10 °C

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Alkalinen peptonivesi, suolapitoisuus 2% (ALKPE)
- 2) Suola-polymyksiiniliemi
- 3) TCBS (=tiosulfaatti-sitraatti-suola-sakkaroosiagar)
- 4) Veriagar
- 5) Suola-ravintoagar
- 6) Suolaliuos 2%
- 7) API 20E
- 8) Oksidaasireagenssi
- 9) Gram-värijäysliuokset
- 10) Nitraattireagenssi A (NIT-A)
- 11) Nitraattireagenssi B (NIT-B)
- 12) Kovacsin reagenssi
- 13) TDA-reagenssi (API)
- 14) VP1-reagenssi (API)
- 15) VP2-reagenssi (API)

9 Kontrollikannat

- 1) *Vibrio parahaemolyticus* EELA 77
- 2) *Vibrio alginolyticus* EELA 468
- 3) *Vibrio cholerae* EELA 471
- 4) *Vibrio vulnificus* EELA 473

10 Näytteen esikäsittely

Suorita mahdollinen esikäsittely toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti.

11 Suoritus

11.1 Rikastus alkalisessa peptonivedessä

Punnitse 25 g näytettä, lisää 225 ml alkalista peptonivettä (suolapit. 2%) ja homogeneri stomacherissa tai ravistelemalla 2 minuuttia. Inkuboi $41,5 \pm 0,5$ °C/ 18 ± 2 h.

11.2 Rikastus suola-polymyksiiniliemessä

Punnitse 25 g näytettä, lisää 225 ml suolapolymyksiinilientä ja homogeneri stomacherissa tai ravistelemalla 2 minuuttia. Inkuboi $41,5 \pm 0,5$ °C/ 18 ± 2 h.

11.3 Viljely TCBS-agarmaljoille

TCBS-agarmaljojen säilyvyysaika on vain 1 vrk. Kuivaa maljat ennen käyttöä niin, että niiden pinta on kuiva. Sekoita molemmat rikastusliemet hyvin. Siirrosta rikastusliemistä 10 µl:n silmukallinen TCBS-agarmaljoille hajotusviljelynä siten, että saadaan erillisiä pesäkkeitä. Käytä kontrolleina EELA 77, 468, 471 ja 473 –kantoja.

Inkuboi maljat 37 ± 1 °C/ 24 ± 3 h.

11.4 Maljojen lukeminen ja pesäkkeiden puhtaaksiviljely

Poimi maljoilta seuraavanlaisia pesäketyyppejä:

V. cholerae : keltaisia, litteitä, läpimitta 2 – 3 mm

V. parahaemolyticus : sinivihreitä, läpimitta 3 – 5 mm

V. vulnificus : sinivihreitä, läpimitta 2 – 3 mm

V. alginolyticus : keltaisia, läpimitta 3 – 5 mm.

Valitse vähintään viisi tyypillistä pesäkettä (jos mahdollista) jatkotutkimuksiin. Viljele pesäkkeet puhtaiksi veriagarille ja suolaravintoagarille. Inkuboi 37 ± 1 °C/ 24 ± 3 h. Jos epäillä useampia *Vibrio*-lajeja, valitse vastaavasti useampia pesäkkeitä. Säilytä alkuperäiset maljat sekä eristetyt kannat maljoilla 7 -10 °C:ssa, kunnes kaikki varmistuskokeet on tehty.

12 Varmistuskokeet

12.1 Oksidaasikoe ja gramvärjäys

Tee puhtasviljelmistä oksidaasikoe (työhje LAB 2055) ja gramvärjäys (työhje LAB 2053). Gramvärjäystä varten tee bakteerisuspensio 2% suolaliuokseen. Vibriot ovat oksidaasipositiivisia, gramnegatiivisia suoria tai pilkunmuotoisia sauvoja.

12.2 Liikkuvuus

Tutki liikkuvuus alkalisessa peptonivedessä tai 2% suolavedessä. Tiputa pisara suolavettä objektilasille, sekoita siihen silmukalla bakteerimassaa, peitä peitinlasilla ja mikroskopoi vaihevastakohtavalaisituksella.

12.3 Biokemiallinen varmistus

Varmista tyypilliset pesäkkeet biokemiallisesti API 20E:llä. Tee bakteerisuspensio 5 ml:aan 2% suolavettä API-ohjeesta poiketen. Tee myös nitraatinpelkistyskoe. Inkuboi $37 \pm 0,5$ °C/ 18 ± 2 h.

12.4 Jatkotutkimukset

Jos API 20E :llä saadaan tulokseksi *Vibrio cholerae*, bakteerikanta lähetetään Kansanterveyslaitokseen serotyypitystä varten.

Jos näytteestä todetaan *V. parahaemolyticus*, tutkitaan PCR-menetelmällä (Evira 3509), onko kannalla *tdh*- ja *trh*-geenit. Yli 95%:lla patogeenisista kannoista on jompikumpi tai molemmat.

13 Tulokset

Tulos ilmoitetaan *Vibrio cholerae/parahaemolyticus/vulnificus/alginoliticus* todettu / 25 g näytettä tai tutkittu määrä tai patogeenisia *Vibrio*-bakteereja ei todettu/ 25 g näytettä tai tutkittu määrä.

14 Menetelmän validointi

Menetelmä on validoitu käyttäen matriiseina katkarapuja, kirjolohta sekä sinisimpukoita ja testiorganismeina *V. alginolyticus* EVIRA 468 -, *V. parahaemolyticus* EVIRA 77-, *V. vulnificus* EVIRA 473 - sekä *V. cholerae* EVIRA 471 –bakteerikantoja.

Validoinnissa menetelmän toteamisrajaksi saatiin $10^1 - 10^2$ pmy/25 g näytettä (Hakkinen, 2002).

15 Menetelmän status

- | | |
|---|-------------------------------------|
| Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Virallinen menetelmä | <input type="checkbox"/> |
| Sisäinen menetelmä | <input type="checkbox"/> |

16 Laadunvarmistusmenetelmät

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

17 Viitteet

NMKL 156:1997. Patogeeniset *Vibrio*-lajit. Osoittaminen ja lukumäärän määrittäminen elintarvikkeista.

Hakkinen M, 2002. Patogeenisten *Vibrio*-suvun bakteerien osoittaminen elintarvikkeista (EELA 3504) –menetelmän validointi.

18 Muutokset edelliseen versioon

18.1.2012 Ylätunnisteeseen vaihdettu yksikön uusi nimi sekä hyväksyjä. Menetelmään päivitetty nykyiset työ- ja toimintaohjeiden numerot. Kontrollikantojen numerot korjattu.
Tämän ohjeen laatija: Hakkinen Marjaana