

# Patogeenisten *Vibrio* –suvun bakteerien osoittaminen elintarvikkeista

## 1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

NMKL 156:1997, muunnos

- 1) Menetelmä ei sisällä kvantitatiivista määritystä
- 2) Näytettä punnitaan 20 g:n sijasta 25 g
- 3) Rikastuslienteen inkubointilämpötila on  $42 \pm 1$  °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<sup>+</sup>-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 työskenneltäessä 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  $37 \pm 1$  °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/ $18 \pm 2$  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/ $18 \pm 2$  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  $37 \pm 1$  °C/ $24 \pm 3$  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  $37 \pm 1$  °C/ $24 \pm 3$  h. Jos epäillään 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 oksidaasiposiitivisia, 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 vaihevastakohtavalaisilla.

### 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/  $18 \pm 2$  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/alginolyticus* 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