

Escherichia coli –bakteerin lukumäärän määrittäminen elävistä simpukoista

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO TS 16649-3:2005

(MMGB2x ja MMGB, $37 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$, TBX-agar $44 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$)

Ei poikkeamia

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *E. coli* –bakteerin kvantitatiiviseen määrittämiseen simpukoista.

3 Määritelmä(t)

E. coli -bakteerit kuuluvat *Enterobacteriaceae* –heimoon. Ne ovat fakultatiivisesti anaerobisia, gramnegatiivisia sauvoja, jotka tuottavat happoa ja kaasua laktoosista. *E. coli* -kannoista 95 – 97% tuottaa betaglukuronidaasia.

E. coli –bakteerien lukumäärää elävissä simpukoissa käytetään simpukanlihan ulosteperäisen kontaminaation indikaattorina. Simpukantuotantoalueiden luokittelu perustuu simpukoiden lihasta määritettyyn *E. coli* –bakteeritasoon (EU-direktiivi 91/492/EEC).

4 Periaate

E. coli -bakteerin lukumäärän määrittämiseen käytetään 3 x 5 putken MPN-menetelmää. Tunnetusta määrästä näytettä tehdään laimennussarja. Kolmesta peräkkäisestä laimennoksesta siirrostetaan tunnettu määrä MMGB-liemeen ja inkuboidaan $37 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$.

Inkuboinnin jälkeen viljellään 10 µl hajotusviljelynä TBX-kromogeeniagarille niistä putkista, joissa on muodostunut happoa laktoosista. Haponmuodostus näkyy indikaattorivärin muutoksena keltaiseksi. Maljat inkuboidaan $44 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$.

Betaglukuronidaasia tuottavat bakteerit kasvavat TBX-agarmaljoilla sinivihreinä pesäkkeinä. Putket, joista kasvaa TBX-agarilla sinivihreitä pesäkkeitä, tulkitaan positiivisiksi.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Escherichia coli –bakteerin lukumäärän määrittäminen elävistä simpukoista

5 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 232.

6 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Lämpökaappi 37 ± 1 °C
- 3) Lämpökaappi 44 ± 1 °C

7 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Laimennosvesi
- 2) MMGB2x (=Muunnettu glutamaattiliemi, Minerals modified glutamate broth, kaksinkertainen pitoisuus)
- 3) MMGB (=Muunnettu glutamaattiliemi, Minerals modified glutamate broth)
- 4) TBX –agar (5-bromo-4-kloro-3-indolyyli- β -D-glukoronidiagar)

8 Kontrollikannat

- 1) *E. coli* EELA 261 (ATCC 35218)
- 2) *Klebsiella pneumoniae* EELA 424

9 Näytteen esikäsittely

9.1 Näytteiden kuljetus

Kuljeta näytteet laboratorioon kylmälaukussa, jossa on kylmävaraajat, niin että lämpötila on n. 4°C. Näytteet eivät saa jäätyä. Aika näytteenotosta tutkimuksen alkamiseen ei saa ylittää 24 h.

9.2 Näytteiden valmistelu

Käytä kertakäyttökäsineitä, vaihda käsineet näytteiden välillä. Ota näytteeksi ostereita vähintään 10 kpl, sinisimpukoita 15 kpl ja sydänsimpukoita 30 kpl. Hylkää auenneet ja vahingoittuneet simpukat.

Hankaa simpukat puhtaiksi kylmän, juoksevan johtoveden alla ja kuivaa ne puhtailla paperipyyhkeillä. Avaa simpukat steriilillä (liekitetyllä ja jäähdytetyllä) veitsellä seuraavasti:

Escherichia coli –bakteerin lukumäärän määrittäminen elävistä simpukoista

Osterit: aseta veitsi kuorten väliin saranapuolelle. Työnnä veitsi simpukan sisään ja väännä ylempää kuorta auki siten, että neste valuu steriiliin punnittuun Stomacher-pussiin. Työnnä veitsen terä simpukan läpi ja katkaise lihaskiinnikkeet. Poista yläkuori ja raaputa alemman kuoren sisältö astiaan. Avaa kymmenen osteria samaan pussiin.

Sini- ja sydänsimpukat: pane veitsi kuorten väliin ja erota kuoret vääntämällä veistä. Kerää neste steriiliin punnittuun Stomacher-pussiin. Leikkaa kuoret yhdistävä lihas poikki ja raaputa sisältö pussiin. Avaa vähintään 15 sinisimpukkaa tai 30 sydänsimpukkaa samaan pussiin.

10 Suoritus

10.1 Homogenointi Stomacherilla

Laita simpukanlihaa sisältävä pussi kahden Stomacher-pussin sisään, jotta mahdollisesti mukana olevat kuorensirut eivät pääse läpi. Purista ilma pois ja homogeneroi 2 – 3 min.

10.2 Laimentaminen

Ota 50 g homogenaattia toiseen Stomacher-pussiin. Lisää pussiin n. 100 ml laimennosvettä valmiiksi mitatusta 450 ml:sta. Homogeneroi vielä Stomacherilla 2 – 3 min. Lisää homogenoinnin jälkeen jäljelläoleva laimennosvesi ja sekoita hyvin. Tämä on laimennos 10^{-1} .

Valmista laimennos 10^{-2} lisäämällä 10 ml laimennosta 10^{-1} 90 ml:aan laimennosvettä. Jos on odotettavissa, että näytteen *E. coli* –pitoisuus on suuri, laimenna näytettä edelleen samalla tavoin.

Säilytä tutkimuksesta ylijäävä homogenaatti jääkaapissa, kunnes tutkimus on valmis.

10.3 Rikastus

Siirrosta 10 ml laimennosta 10^{-1} viiteen putkeen, joissa on 10 ml MMGB2x-lientä. Siirrosta 1 ml laimennosta 10^{-1} viiteen putkeen, joissa on 10 ml MMGB-lientä. Siirrosta 1 ml laimennosta 10^{-2} viiteen putkeen, joissa on 10 ml MMGB-lientä. Jos näytettä on laimennettu pidemmälle, siirrosta myös kutakin seuraavaa laimennosta viiteen putkeen, joissa on 10 ml MMGB-lientä. Inkuboi putket $37 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 2$ h.

10.4 Putkien luku

Tarkastele inkuboinnin jälkeen, onko putkissa muodostunut happoa, mikä näkyy elatusaineen keltaisena värinä. Vähäinenkin keltainen väri luetaan positiiviseksi tulokseksi. Jollei happoa ole muodostunut, tulos on negatiivinen.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Escherichia coli –bakteerin lukumäärän määrittäminen elävistä simpukoista

10.5 Viljely TBX-maljoille

Tee kaikista putkista, joissa on muodostunut happoa, hajotusviljely 10 µl:n silmukalla TBX-agarille. Sekoita putkien sisältö hyvin ennen viljelyä. Yhden agarmaljan voi jakaa viiteen osaan. Inkuboi maljat $44 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 2 \text{ h}$.

Käytä positiivisena kontrollina *E. coli* EELA 261- kantaa ja negatiivisena kontrollina *Klebsiella pneumoniae* EELA 424 kantaa (toimintaohje LAB706).

10.6 Maljojen lukeminen

E. coli kasvaa maljoilla sinivihreinä (betaglukuronidaasipositiivisina) pesäkkeinä. Putket, joista siirrostetuilla maljoilla kasvaa sinivihreitä pesäkkeitä, tulkitaan *E. coli*a sisältäviksi.

11 Varmistuskokeet

Menetelmässä ei käytetä varmistuskokeita.

12 Tulokset

12.1 Tuloksen laskeminen

Laske positiivisten putkien lukumäärät kolmesta peräkkäisestä laimennoksesta ja katso niitä vastaava MPN-arvo MPN-taulukosta (Liite 1, Taulukot 1-3).

12.2 Tulosten ilmoittaminen

Ilmoita tulos *E. coli* –bakteereita MPN/100 g.

13 Menetelmän validointi

Menetelmää verrattiin NMKL:n menetelmään 96:1994 (Tuoreiden ja pakastettujen kalastustuotteiden mikrobiologinen tutkimus). Vertailussa EELA 3506 –menetelmä osoittautui herkemmäksi kuin NMKL:n menetelmä.

14 Menetelmän status

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

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Escherichia coli –bakteerin lukumäärän määrittäminen elävistä simpukoista

15 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"/>

16 Viitteet

ISO TS 16649-3:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide.

Donovan TJ, Gallacher S, Andrews NJ, Greenwood MH, Graham J, Russell JE, Roberts D & Lee R 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. Communicable Disease and Public Health 1 (3): 188 – 196.

Hakkinen M, 2004. *Escherichia coli* –bakteerin lukumäärän määrittäminen elävistä simpukoista EELA 3506 –menetelmän validointi.

17 Muutokset edelliseen versioon

Tämän ohjeen laadinta: Marjaana Hakkinen.
Vaihdettu logo, yksikön nimi sekä ohjenumerointi vastaamaan nykyistä käytäntöä.
Tekninen päivitys.