

# Streptococcus equi ssp. zooepidemicus -bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen

## 1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

Balter, S. *et al.* 2000

Nupponen, M. 2006

## 2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* -bakteerin osoittamiseen maidosta ja maitotuotteista.

## 3 Määritelmä(t)

Streptokokit ovat fakultatiivisesti anaerobisia, grampositiivisia, katalaasinegatiivisia kokkibakteereita. *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* kuuluu Lancefieldin ryhmään C ja muodostaa leveän kirkkaan  $\beta$ -hemolyyttisen vyöhykkeen veriagarilla.

*S. equi ssp. zooepidemicus* -bakteeria esiintyy hevosten hengitysteiden ja sukupuolielinten limakalvoilla. Bakteeri voi aiheuttaa hengitystieinfektioita, haavainfektioita, utaretulehdusta ja abortteja erityisesti hevosilla, mutta myös muilla eläinlajeilla. Ihmisellä bakteeri voi olla oireettomana nielussa tai aiheuttaa nielutulehduksen sekä jälkitautina nivel- ja aivokalvontulehduksen, verenmyrkytyksen tai munuaiskerästulehduksen. Ihmisten tautitapaukset ovat liittyneet eläinlajien kanssa (erityisesti hevoset) ja pastöroimattomien maitotuotteiden käyttöön.

## 4 Periaate

*S. equi ssp. zooepidemicus* -bakteerin osoittaminen maitotuotteista koostuu kahdesta eri vaiheesta: näyte rikastetaan amfoterisiinia, nalidiksiini- ja oksoliinihappoa sisältävässä liemessä ja bakteeri eristetään selektiivimaljoilta. Eristetyt kannat tunnistetaan morfologisten, serologisten ja biokemiallisten ominaisuuksien perusteella.

## 5 Mahdolliset virhelähteet

Raakamaitojuustoja tutkittaessa tyypillisten *S. equi ssp. zooepidemicus* -pesäkkeiden poiminta voi olla vaikeaa runsaan taustamikrobiflooraan vuoksi.

Samassa rikastusliemessä rikastuvat myös muut C- ja G-ryhmän  $\beta$ -hemolyyttiset streptokokit, jotka tuottavat melko samannäköisiä kuivia, pieniä, valkoisia pesäkkeitä.

Maljojen kylmäsäilytyksen aikana joidenkin bakteerien  $\alpha$ -hemolyysi voi muuttua niin, että se muistuttaa  $\beta$ -hemolyysiä.

## 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  $37 \pm 1$  °C

## 8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Todd-Hewitt-liemipohja ja siihen lisättävät antibiootit: nalidiksiinihappo (15 mg/ml), oksoliinihappo (2,5 mg/ml) ja amfoterisiini (2,5 mg/ml). Antibioottien pitoisuudet valmiissa selektiivisessä Todd-Hewitt-liemessä (sT-HB) ovat 60 mg/l nalidiksiinihappoa, 10 mg/l oksoliinihappoa ja 10 mg/l amfoterisiinia.
- 2) Edwards-agar
- 3) Modifioitu streptokokkiselektiiviagar (mSSA)
- 4) Veriagar
- 5) Katalaasireagenssi, 3% vetyperoksidi
- 6) Gramvärjäysliuokset
- 7) Streptococcal grouping kit (Oxoid Diagnostic Reagents)
- 8) Rapid ID 32 Strep -API, valmistaja BioMérieux

## 9 Kontrollikannat

*S. equi ssp. zooepidemicus* EELA 504

## 10 Näytteen esikäsittely

Suorita mahdollinen esikäsittely toimintaohjeen LAB 223 mukaisesti.

## 11 Suoritus

### 11.1 Rikastus

Jos näyte on kiinteää, siirrä osa näytettä aseptisesti pakkauksestaan steriiliin Stomacher-pussiin. Sekoita näyte tasaiseksi massaksi puristelemalla pussia. Punnitse 25 g näytettä steriiliin Stomacher-pussiin. Jos näyte on nestemäinen, sekoita näyte hyvin kääntämällä näyteastiaa nopeasti 25 kertaa ylösalaisin. Varo vaahtoamista. Pipetoi 10 ml näytettä steriiliin astiaan.

Kaada huoneenlämpöinen selektiivinen Todd-Hewitt-liemi näytteen päälle suhteessa: 1 osa näytettä + 9 osaa lientä. Homogenoi näytettä 60 s Stomacherilla. Inkuboi aerobisesti  $37 \pm 1$  °C ensin  $24 \pm 3$  h ja edelleen  $24 \pm 3$  h.

Streptococcus equi ssp. zooepidemicus -bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen

## 11.2 Viljely agarmaljoille

Viljele rikastusta 10 µl silmukalla hajotusviljely Edwards- ja mSSA-agareille sekä 24 h että 48 h rikastuksen jälkeen. Viljele myös kontrollikanta EELA 504, *S. equi ssp. zooepidemicus*. Inkuboi maljoja aerobisesti  $37 \pm 1$  °C  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  ja tarvittaessa edelleen  $24 \pm 3\text{h}$ .

## 11.3 Maljojen lukeminen

Maljat luetaan 24 h ja vielä 48 h inkuboinnin jälkeen, mikäli 24 h inkuboinnin jälkeen ei ole tyypillisiä pesäkkeitä.

## 11.4 Edwards

Edwardsin agarilla *S. equi ssp. zooepidemicus* -bakteeri kasvaa hieman kuultavina pieninä, vaaleina pesäkkeinä muodostaen kirkkaan β-hemolyysin pesäkkeen ympärille. Osa kannoista voi tuottaa hyaluronihappoa, jolloin pesäkkeen ympärille ja päälle muodostuu kirkas lima.

## 11.5 mSSA

*S. equi ssp. zooepidemicus* kasvaa mSSA:lla pieninä kuivina valkoisina pesäkkeinä, joiden halkaisija on alle 1 mm. Pesäkkeen ympärillä on kirkas β-hemolyysi. Osa kannoista voi tuottaa hyaluronihappoa, jolloin pesäkkeen ympärille ja päälle muodostuu kirkas lima.

## 12 Varmistuskokeet

### 12.1 Pesäkkeiden valinta varmistuskokeisiin

Viljele molemmilta selektiiviagareilta viisi tyypillistä pesäkettä hajotusviljelynä puhtasviljelmäksi veriagarille. Inkuboi  $+37 \pm 1$  °C  $24 \pm 3\text{h}$ .

### 12.2 Katalaasikoe

Tee katalaasikoe puhtasviljelmistä työohjeen LAB 2054 mukaisesti.

*S. equi ssp. zooepidemicus* on katalaasinegatiivinen. Käytä negatiivisena kontrollina myös EELA 504 -kanta.

### 12.3 Gramvärjäys

Tee värjäys puhtasviljelmistä työohjeen LAB 2053 mukaisesti.

## Streptococcus equi ssp. zooepidemicus -bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen

*S. equi ssp. zooepidemicus* on grampositiivinen kokki ja muodostaa ketjuja. Ketjuissa solut voivat näyttää erikokoisilta. Mikäli kanta muodostaa hyaluronihappoa, se voi haitata gramvärjäyksessä ja näkyä vaaleanpunaisena seittinä solujen ympärillä.

### 12.4 Lancefield-ryhmän määrittäminen

Varmista ensin yksi eristetyistä viljelmistä Streptococcal grouping kitillä työhöhen LAB 2012 mukaisesti Lancefield-ryhmän määrittämiseksi.

*S. equi ssp. zooepidemicus* kuuluu Lancefieldin ryhmään C.

Mikäli eristetty viljelämä ei kuulu C-ryhmään, tutkitaan muut eristykset yksitellen.

### 12.5 Rapid ID 32 Strep- API

Mikäli eristetty viljelämä kuuluu Lancefieldin ryhmään C, tee Rapid ID 32 Strep - API valmistajan ohjeen mukaisesti.

### 13 Tulokset

Jos *S. equi ssp. zooepidemicus* -bakteereita ei todeta, tulos ilmoitetaan: *S. equi ssp. zooepidemicus* ei todettu / 25 g tai tutkittu määrä.

Jos *S. equi ssp. zooepidemicus* -bakteereita todetaan, tulos ilmoitetaan: *S. equi ssp. zooepidemicus* todettiin / 25 g tai tutkittu määrä.

### 14 Menetelmän validointi

EELAn bakteriologian tutkimusyksikön elintarvikemikrobiologian ryhmän validointikokeissa 2004 siirrostettiin tuorejuustomatriisiin 3 eri pitoisuutena *S. equi ssp. zooepidemicus* 6052/6/2003-kantaa. Lisäksi tutkittiin siirrostamattomia näytteitä.

Validoinnissa menetelmän toteamisrajaksi määritettiin 39-48 pmy/g juustoa ja spesifisyydeksi saatiin 100%.

### 15 Menetelmän status

Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä

Virallinen menetelmä

Sisäinen menetelmä

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* -bakteerin osoittaminen ja tunnistaminen**16 Laadunvarmistusmenetelmät**

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailu/kontrollikantojen käyttö	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>
Valvontakortit	<input type="checkbox"/>

**17 Viitteet**

Balter, S. , Benin, A., Lima Pinto, S.W., Martins Teixeira, L., Gripp Alvim, G., Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliott, J., Facklam, R and A. Schuchat, 2000. Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil, The Lancet 355, 1776-1780.

Nuppunen Maija, 2006. *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* -bakteerin analytiikka ja esiintyvyys maitotuotteissa, Pro gradu -opinnäytetyö, Helsingin yliopisto.

**18 Muutokset edelliseen versioon**

18.1.2012 Ylätunnisteeseen vaihdettu yksikön uusi nimi sekä hyväksyjä. Menetelmään päivitetty nykyiset työ- ja toimintaohjeiden numerot. Elatusaine- ja reagenssiluettelossa sekä Lancefieldin ryhmän määrittämisessä Streptex-kitti korvattu Streptococcal grouping kitillä.  
Tämän ohjeen laatija: Hakkinen Marjaana