

Bestämning av koagulaspositiva stafylokocker. Koloniräkningsteknik.

1 Metodreferenser och avvikelser

ISO 6888 -1:1999,/ Amd 1:2003, variation.

(Baird-Parker 37 °C / 24–48 h, nötblodagar 37 °C / 24 h, koagulastest)

- 1) Renodlingar odlas på blodagar av de kolonier som ska konfirmeras.
- 2) Resultaten anges i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 703.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metoden lämpar sig för bestämning av koagulaspositiva stafylokocker i livsmedel och foder.

3 Definition(er)

Till släktet *Staphylococcus* hör fakultativt anaeroba, gram- och katalaspositiva, kockformiga bakterier. En del av arterna är koagulaspositiva. Bland de koagulaspositiva stafylokockerna finns stammar som kan producera stafylokockenterotoxiner. Dessa är i huvudsak *S. aureus*, men vissa stammar av *S. intermedius* och *S. hyicus* kan också bilda enterotoxiner.

4 Princip

Koagulaspositiva stafylokocker definieras kvantitativt genom att odla en känd mängd prov på selektivt medium. Efter inkuberingen räknas de kolonier som ser typiska ut skilt från de atypiska. En del av kolonierna konfirmeras genom att man analyserar bildningen av koagulas genom ett koagulastest i provrör.

5 Eventuella felkällor

Atypiska kolonier eller annan störande flora kan växa på Baird-Parker. Det kan ibland vara svårt att tolka resultat av koagulastest om tolkningen görs efter att den rekommenderade tiden har löpt ut.

Bestämning av koagulaspositiva stafylokocker. Koloniräkningsteknik.

6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iaktas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Värmeskåp 37 ± 1 °C
- 3) Stomacher homogenisator och sterila Stomacher-400 påsar eller skakapparat

8 Substrat och reagenser

- 1) Peptonsaltlösning, pepton 0,1 %, salt 0,85 % (PEPSU) eller Dilucup, om inget annat föreskrivs i verksamhetsbeskrivning LAB 703
- 2) Baird-Parker agar (BP) i skålar eller i flaskor
- 3) Egg yolk tellurite emulsion
- 4) Blodagar
- 5) Koagulasrör

9 Kontrollstammar

- 1) *Staphylococcus aureus* EELA 6

10 Förbehandling av prov

Förbehandla provet vid behov i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 702.

11 Utförande**11.1 Smältning och temperering av agar**

Smält vid behov Baird-Parker agar och kyl ner den till 45 °C innan gjutningen enligt verksamhetsbeskrivning LAB 702. Tillsätt i den nerkylda agaren egg yolk tellurite emulsion 5 ml/100 ml agar och gjut plattorna.

Torka plattorna i laminarskåp i 20–30 minuter före inokuleringen.

Gör nödvändiga spädningar av provet enligt verksamhetsbeskrivning LAB 728.

11.2 Odling

Inokulera från spädningarna 0,1 ml som ytstryk på Baird-Parker agar (plattans diameter 90 mm), odla parallella plattor. Om det är nödvändigt att bestämma små halter, kan du inokulera från provet eller den första spädningen 1,0 ml på en stor (140 mm i diameter) Baird-Parker platta eller fördela 1,0 ml på tre vanliga plattor.

Bestämning av koagulaspositiva stafylokocker. Koloniräkningsteknik.

Inkubera plattorna vid 37 °C / 24 ± 2 h och 48 ± 2 h.

11.3 Räkning av kolonier

Studera plattorna efter både 24 h och 48 h inkubering.

Märk alla typiska kolonier på plattans botten efter 24 h odling. Märk efter 48 h odling nya typiska och märk skilt eventuella atypiska kolonier. Räkna kolonierna på plattor som har högst 150 typiska kolonier.

Typiska kolonier är svarta eller grå, blanka och välvda. Diametern är 1–1,5 mm efter 1 dygn och 1,5–2,5 mm efter 2 dygn. Kolonierna omges av en klar zon. Man ser ofta en smal, ogenomskinlig ring omedelbart kring kolonin i den klara zonen.

Koagulaspositiva stafylokocker som bildar atypiska kolonier förekommer i exempelvis mjölkprodukter och räkor. Atypiska kolonier med stafylokocker är blankt svarta och kan omges av en smal vit ring. Den klarnade zonen är knappt synlig eller finns inte alls. På samma sätt fattas den ogenomskinliga ringen eller är svagt synlig. Atypiska kolonier kan alternativt vara grå till färgen; dessa kolonier saknar klarnad zon.

12 Konfirmeringstester

12.1 Val av kolonier till konfirmeringstester

Odlar renodlingar på blodagar av typiska och atypiska kolonier. Konfirmera om möjligt minst fem typiska och fem atypiska kolonier på varje platta som ska räknas. Inkubera vid 37 °C 24 ± 2 h.

Utför konfirmeringstester på renkulturerna. Använd stammen *S.aureus* EELA 6 som positiv kontroll.

12.2 Granskning av renodlingar

Studera renodlingen avseende hemolys och kolonimorfologi. Stafylokocker växer på blodagar i form av släta, ogenomskinliga och välvda gråvita eller svagt gulorangevärgade kolonier. Kolonierna är cirka 1–2 mm i diameter. De flesta koagulaspositiva stammarna är hemolytiska, men även icke-hemolytiska stammar förekommer.

12.3 Konfirmering av koagulaspositiva stafylokocker

Verifiera stammarnas fria produktion av koagulas med ett agglutinationstest i rör enligt arbetsbeskrivning LAB 2051.

Utöver *S. aureus* producerar endast *S. intermedius* och en del av stammarna *S. hyicus* subsp. *hyicus* fritt koagulas. I motsats till *S. aureus* och *S. intermedius*, är ändå koagulasreaktionen hos de flesta stammarna av *S. hyicus* subsp. *hyicus* sen och svag.

Livsmedels- och fodermikrobiologi

Bestämning av koagulaspositiva stafylokocker. Koloniräkningsteknik.

13 Resultat**13.1 Uträkning av resultaten**

Räkna ut resultatet enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703.

13.2 Rapportering av resultaten

Resultatet anges som antalet koagulaspositiva stafylokocker per cfu/g eller ml prov enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703.

14 Validering av metoden

Valideringsresultaten då det gäller bestämning av koagulaspositiva stafylokocker (De Buyser et al. 2003) presenteras i tilläggsblad 1 till referensmetoden (Amendment 1, 2003).

15 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input type="checkbox"/>
Officiell metod	<input checked="" type="checkbox"/>
Referensmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

16 Metoder för kvalitetssäkring

Jämförande undersökningar mellan laboratorierna	<input checked="" type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar inom livsmedelsmikrobiologin	<input checked="" type="checkbox"/>
Ympade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>

17 Referenser

ISO 6888-1 (1999) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

Amendment 1 (2003) Inclusion of precision data. Bilaga till den ursprungliga metodbeskrivningen i rum B214.

De Buyser, M.L., Lombard, B., Shulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, R., Lahellec, C. (2003) Validation of EN ISO standard methods 6888 part 1 and 2:1999, Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. Int. J. Food Microbiol., 83(2), 185-194.

Livsmedels- och fodermikrobiologi

Bestämning av koagulaspositiva stafylokocker. Koloniräkningsteknik.

18 Ändringar sedan föregående version

17.2.2014 Evira 3466/5. Bestämning av bakterien *Staphylococcus aureus* har tagits bort och i och med ändringen en annan kontrollstam *Staphylococcus epidermidis* EELA 40. Numret på verksamhetsbeskrivningen för arbetarskydd har ändrats. Andra ansvarig Hakkinen har ersatts med Annukka Markkula.
Anvisningen sammanställdes av: Satu Hakola och Annukka Markkula.