

Leena Manner, Maria Fredriksson-Ahomaa, Hannu Korkeala

***Yersinia enterocolitica* -bakteerin eristämisessä käytettyjen viljelymenetelmien toimivuuden vertailu**

Evaluation of some culture methods for recovery of *Yersinia enterocolitica*

YHTEENVETO

Tutkimuksessa vertailtiin viiden viljelymenetelmän tehokkuutta *Yersinia enterocolitica* -bakteerin serotyyppien O:3 ja O:9 eristämisessä jauhelibasta. Serotyyppit O:3 ja O:9 löytyivät ainoastaan irgasan-tikarsilliini-kaliumkloraatti (ITC) rikastuksen jälkeen. ITC-rikastus on osa ISO (International Organization for Standardization) -menetelmää. Muut tutkitut rikasteliemet olivat modifioitu Rappaport-liemi (MRB), peptoni-sorbitoli-sappisuola (PSB)-liemi, sappisuola-oksalaatti-sorboosi (BOS)-liemi, muunneltu tryptikaasi-soija-liemi (MTSB) sekä OSSMER-liemi. Eristysalustana käytettiin selektiivistä kefsulodiini-irgasan-novobiosiini (CIN) -alustaa, koska se osoittautui parhaaksi verrattuna salmonella-shigella-desoksikolaatti-kalsiumkloriitti (SSDC) ja MacConkey-alustoihin. Selektiivinen rikastus ITC-liemessä ja sen jälkeen eristys CIN-alustalla osoittautui parhaaksi menetelmäksi serotyypin O:3 osoittamisessa jauhelibasta.

SUMMARY

Five different culture methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* strains belonging to serotypes O:3 and O:9 were evaluated. These serotypes were found from minced pork only after selective enrichment in irgasan ticarcillin chlorate (ITC) broth, which is a part of the ISO (International Organization for Standardization) method. The other enrichment broths studied were peptone sorbitol bile salts (PSB) broth, modified Rappaport broth (MRB), bile oxalate sorbose (BOS) broth, modified trypticase soya broth (MTSB) and OSSMER broth. However, no yersinia was found using these enrichment broths. Cefsulodin irgasan novobiocin (CIN) plates were used for yersinia isolation because this agar was shown to be the best, compared to salmonella shigella deoxycholate calcium chloride (SSDC) and MacConkey agars. Selective enrichment in ITC broth and isolation on CIN plates was shown to be an useful method to recover *Y. enterocolitica* O:3 from minced pork.

JOHDANTO

Yersinia enterocolitica -bakteeri aiheuttaa Suomessa vuosittain useita satoja ihmisten sairastumisia (Kansanterveyslaitos 2002). Tärkeimpänä serotyyppien O:3 ja O:9 tartuntalähteenä pidetään sianlihaa (Kapperud 1991). Bakteeri on vaikeampi eristää viljelymenetelmillä elintarvikkeista kuin sairastuneiden ulosteesta, sillä bakteerien lukumäärä on elintarvikkeissa yleensä pienempi ja taustafloora on monipuolisempi (Doyle ja Hugdahl 1983). *Yersinia* pystyy lisääntymään lähellä 0 °C (Kapperud 1991). *Yersinia* ovat huonoja kilpailijoita, mutta kilpailukyky paranee hieman matalissa lämpötiloissa (Schiemann 1982).

Y. enterocolitica on bakteeriryhmä, joka sisältää useita erilaisia biotyypppejä. Bakteeri voidaan jakaa myös serotyypppeihin O-antigeenin perusteella. Vain osa serotyypeistä ja biotyypeistä on patogeenisia. Tärkeimmät ihmiselle tautia aiheuttavat yhdistelmät ovat serotyyppi O:3 / biotyyppi 4, serotyyppi O:3 / biotyyppi 3, serotyyppi O:9 / biotyyppi 2, serotyyppi O:8 / biotyyppi 1 B ja serotyyppi O:5,27 / biotyyppi 2 (Bottone 1999).

Euroopassa yersinioosia aiheuttaa lähes yksinomaan serotyyppit O:3 ja O:9. Pohjois-Amerikassa

esiintyy lähinnä serotyyppinä O:3, O:8 ja O:5,27 (Bottone 1999). Japanissa serotyyppiä O:3 esiintyy yleisesti (Kapperud 1991). Eri serotyypit sietävät eri tavalla selektiivisiä aineita, joita käytetään hyväksi bakteerin eristyksessä.

Suomessa on perinteisesti käytetty yersinian eristämiseen Pohjoismaisen elintarvikkeiden metodiikkakomitean menetelmää No 117 (1996), jota pidetään sopivana O:3- ja O:9-serotyyppien eristämiseen, mutta joka inhiboi voimakkaasti O:8- ja O:5,27-serotyyppien (Schiemann 1983b).

Kirjallisuudessa on esitetty useita muitakin menetelmiä, kuten selektiivirikastus irgasan-tikarsilliini-kaliumkloraatti (ITC) -liemessä (Wauters ym. 1988) tai sappisuola-oksalaatti-sorboosi (BOS) -liemessä (Schiemann 1982). Näistä kumpikaan ei sovellu kaikkien patogeenisten serotyyppien eristämiseen (de Boer 1992). Tämän työn tarkoituksena oli verrata viiden erilaisen menetelmän toimivuutta *Y. enterocolitica* -serotyyppien O:3 ja O:9 eristämässä. Lisäksi vertailtiin kolmea erilaista *Y. enterocolitican* eristämiseen tarkoitettua kasvualustaa keskenään.

AINEISTO JA MENETELMÄT

Bakteerikannat ja matriisi

Tutkimuksessa käytettiin seuraavia yersinia-kantoja: *Y. enterocolitica* -kannat J51B, serotyyppi O:3 ja ATCC 55075, serotyyppi O:9. Yhdeksän muuta gramnegatiivista bakteerikantaa olivat *Citrobacter freundii* 173, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterobacter agglomerans* EELA 180, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 46, *Proteus mirabilis* 82, *Serratia marcescens* 37, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 ja *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Matriisina oli vähittäiskaupasta hankittu sianjauheliha, jonka ko-

konaispesäkeluku oli $7,4 \times 10^5$ pmy/g.

MENETELMÄT

Selektiivisten kasvualustojen vertailu (koe 1)

Y. enterocolitica -kannat (serotyyppi O:3 ja O:9) ja yhdeksän muuta gramnegatiivista bakteerikantaa viljeltiin selektiivisille kefsulodiini-irgasan-novobiosiini (CIN), salmonella-shigella-desoksikolaatti-kalsiumkloriitti (SSDC) ja MacConkey-alustoille hajotusviljelynä. Kaikkia alustoja inkuboitui vuorokausi 30°C:ssa. CIN-alustan selektiiviset aineet ovat sappisuolat, kefsulodiini, irgasan ja novobiosiini. SSDC:n selektiiviset aineet ovat briljanttivihreä, natriumsitraatti, kalsiumkloriitti ja desoksikolaatti. Kummankin alustan selektiiviset aineet estävät tehokkaasti grampositiivisten bakteerien kasvun ja osin myös gramnegatiivisten bakteerien kasvun. MacConkey-alustan selektiiviset aineet ovat sappisuolat ja kristallivioletti, jotka inhiboivat lähinnä grampositiivisten bakteerien kasvua.

Testatut eristysmenetelmät

Vertailussa oli viisi erilaista *Y. enterocolitica* -eristysmenetelmää, joista kaksi on kansainvälisistä menetelmäkokoelmista ja kolme kirjallisuudesta (taulukko 1). Kaikissa menetelmissä jatkoviljely tehtiin CIN-agarmaljoille, joita inkuboitui vuorokausi 30°C:ssa. Maljoilta varmistettiin vain tyypilliset häränsilmäpesäkkeet.

Pohjoismaisen elintarvikkeiden metodiikkakomitean menetelmä NMKL No 117 (Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea, 1996) perustuu kylmärikastukseen fosfaattipuskuroidussa suolavedessä, johon on lisätty sorbitolia ja sappisuoloja (PSB) sekä selektiiviseen rikastukseen modifioidussa Rappaport-liemessä (MRB), jossa selektiivisinä aineina on malakiittivihreä ja magnesiumkloridi. Jatkoviljely maljalle tehdään kolmessa eri vaiheessa, ja pisimmillään rikastusaika on yli kolme viikkoa. Ensimmäinen siirrostus maljalle tehdään PSB-liemestä, jota on inkuboitu kolme

TAULUKKO 1 TABLE

Yersinia enterocolitican eristämässä käytetyt viljelymenetelmät.
Culture methods used for *Yersinia enterocolitica* isolation.

Menetelmä Method	Laimennos Dilution	Esirikastus Pre-enrichment	Rikastus Enrichment
ISO	1:100		ITC: 2 d, 25°C
	1:10		PSB: 5 d, 25°C
	1:10		PSB: 5 d, 25°C + 0,25% KOH: 20 s
NMKL	1:10		PSB: 3 h, 25°C
No 117	1:10	PSB: 8 d, 4°C	MRB: 4 d, 25°C
	1:10		PSB: 22 d, 4°C
	1:10	TSB: 1 d, 12°C	TSB+Irgasan: 1 d, 12°C
MTSB ^a	1:10	PSB: 14 d, 4°C	BOS: 5 d, 22°C
BOS ^b	1:10		OSSMER: 1 d, 30°C
OSSMER ^c	1:100		

^a Muunneltu tryptikaasisojaliemi. Modified Trypticase Soy Broth

^b Sappisuola-oksalaatti-sorboosiliemi. Bile Oxalate Sorbose Broth

^c *Yersinia* Selective Enrichment Broth acc. to OSSMER

tuntia huoneenlämmössä. PSB-lientä inkuboidaan edelleen kahdeksan vuorokautta 4 °C:ssa, jonka jälkeen siitä siirrostetaan MRB-liemeen, jota inkuboidaan neljä vuorokautta huoneenlämmössä ennen siirrostusta maljalle. PSB-lientä inkuboidaan vielä 14 vuorokautta 4 °C:ssa ja siitä tehdään viljely maljalle. Menetelmä antaa mahdollisuuden käyttää joko CIN- tai SSDC-maljaa. Tässä tutkimuksessa käytettiin ainoastaan CIN-maljaa.

Kansainvälisen standardisointijärjestön menetelmä ISO/DIS 10273, 1994 (International Organization for Standardization 1994) on Keski-Euroopassa käytetty menetelmä, jossa on kaksi rinnakkaisa rikastusta. Selektiivinen rikastus tehdään ITC- eli irgasan-tikarsilliini-kaliumkloraatti-liemessä (Wauters ym. 1988) 25 °C:ssa kahden vuorokauden ajan. Irgasanin määrä ITC-liemessä on 1 mg/l. Viljely tehdään SSDC-maljalle. Rikastus peptoni-sorbitoli-sappisuola- eli PSB-liemessä kestää kolme vuorokautta 25 °C:ssa. PSB-liemestä viljellään CIN-maljalle sekä suoraan että emäksisellä kaliumhydroksidiliuoksella käsittelyn jälkeen (0,5 ml PSB-lientä sekoitetaan 4,5 ml:aan 0,25 % KOH-liuosta ja liuoksesta viljellään 20 sekunnin kuluttua CIN-maljalle). Tässä tutkimuksessa poikettiin alkuperäisestä menetelmästä siten, että myös ITC-liemestä viljely tehtiin ainoastaan CIN-maljalle.

Selektiivinen rikastus BOS- eli sappisuola-oksalaatti-sorboosiliemessä (Schiemann 1982) on kehitetty erityisesti serotyypin O:8 eristämiseen. Selektiivisinä aineina on natriumoksalaatti, sappisuolat, irgasan ja nitrofurantoiini. Liemen pohjan muodostaa dinatriumvetyfosfaatti, natriumoksaalaatti, sappisuolat, natriumkloridi ja magnesiumsulfaatti, (pH 7,6). Autoklavoinnin jälkeen lisättiin sterilisuoatettuina liuoksina sorboosi, asparagiini, metioniini, hiiuvauute, natriumpyruvaatti ja meta-

niilikeltainen. Käyttöpäivänä lisättiin vielä dimetyylformamidiin liuotettu nitrofurantoiini ja etanoliin liuotettu irgasan, jonka pitoisuus valmiissa liemessä on 4 mg/l. Näytettä inkuboititiin ISO-menetelmän mukaisessa PSB-liemessä 14 vuorokautta 4 °C:ssa, jonka jälkeen tehtiin siirrostus BOS-liemeen, jota inkuboititiin viisi vuorokautta 22 °C:ssa.

Muunneltu tryptikaasi-soija-liemi eli MTSB-liemi perustuu tryptonisoijaliemeen (trypticase soy broth, Difco), johon lisättiin hiiva-uutetta, sappisuoloja ja irgasania (Toora ym. 1994b). Bhadurin ym. (1997) kehittämässä ja tässä tutkimuksessa käytetyssä menetelmässä näytettä inkuboititiin TSB-liemessä vuorokausi 12 °C:na, jonka jälkeen liemeen lisättiin irgasania neljä mg/l. Inkubointia jatkettiin vielä vuorokausi 12 °C:ssa.

OSSMER-liemi (Yersinia Selective Enrichment Broth acc. to OSSMER, 1996) oli ainoa kaupallisena elatusaineena saatava rikastusliemi, valmistajana MERCK. Jauhe-mainen kuivaelatusaine liuotetaan tislattuun veteen ja autoklavoidaan. Selektiivisenä aineina ovat irgasan (10 mg/l) ja basitrasiiini. Lientä inkuboititiin vuorokausi 30 °C:ssa. Valmis liemi säilyy käyttökelpoisena kylmässä noin kuusi kuukautta ja kuivaelatusaine huoneenlämmössä useita vuosia.

Yersinia eristysmenetelmien vertailu puhdasviljelmillä (koe 2)

Eristysmenetelmiä (taulukko 1) verrattiin keskenään siten, että niillä viljeltiin 10² yersiniasolua (serotyypit O:3 ja O:9 erikseen) ja 10⁶ muuta bakteerisolua käyttäen viittä eri gramnegatiivista bakteerikantaa, jotka olivat *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ja *P. fluorescens*. Mikään näistä kannoista ei muodosta yersinialle tyypillisiä häränsilmä-pesäkkeitä CIN-alustalla, toisin kuin esimerkiksi *E. agglomerans* (taulukko 2). ITC- ja OSSMER-liemien

tilavuus oli 100 ml ja muiden liemien 10 ml (taulukko 1).

Yersinia eristysmenetelmien vertailu jauhelihaa käyttäen (koe 3)

Viittä eristysmenetelmää (taulukko 1) verrattiin keskenään viljelmällä sianjauhelihaa, johon oli inokuloitu yersinia 10 tai 100 pesäkettä muodostavaa yksikköä (pmy) grammaa kohti. Jauhelihan kokonaispesäkeluku oli 7,4 x 10⁵ pmy / g (PCA kolme vuorokautta 30 °C). Koe tehtiin rinnakkaisena O:3- ja O:9-serotyypeillä. Viljelyalustana oli CIN-agar, jota inkuboititiin 24 tuntia 30 °C:ssa. Lisäksi kaikilla menetelmillä tehtiin rinnakkaiset viljelyt siten, että näytettä laitettiin rikastusliemeen sekä 1:10 että 1:100. Negatiivisena kontrollina tehtiin viljely inokulomattomasta jauhelihanäytteestä kaikkiin viiteen rikastusliemeen.

OSSMER-liemen tutkiminen (koe 4)

Kaupallisena kuivaelatusaineena saatavan OSSMER-liemen tehoa tutkittiin siten, että 100 ml:aan lientä lisättiin yksi gramma sianjauhelihaa ja 10², 10³, 10⁴ tai 10⁶ pmy O:3- tai O:9-serotyyppejä, jonka jälkeen liemiä inkuboititiin elatusaineen valmistajan ohjeen mukaisesti vuorokausi 30 °C:ssa. Tämän jälkeen liemistä viljeltiin silmukallinen hajotusviljelynä CIN-agarimaljoille, joita inkuboititiin 24 h 30 °C:ssa.

TULOKSET

Kasvualustojen vertailussa (koe 1) CIN-agar osoittautui kaikkein tehokkaammaksi estäen *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ja *P. mirabilis* -bakteerien kasvun kokonaan (taulukko 2). Yersinialle tyypillisinä häränsilmä-pesäkkeinä kasvoi *E. agglomerans*. SSDC-alustalla estyi tutkituista bakteereista vain *E. coli* -bakteerin kasvu. Kellertävinä pesäkkeinä kasvoivat

TAULUKKO 2 TABLE

Eri bakteerikantojen pesäkkeiden ulkonäkö CIN^b-, SSDC^c- ja MacConkey-alustoilla.
Colony morphology of different bacterial strains on CIN^b-, SSDC^c- and MacConkey -plates.

Bakteerikanta Bacterial strain	CIN	SSDC	MacConkey
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	Punainen "häränsilmä" Red "bull's eye"	Kellertävä Yellowish	Vaaleankeltainen Pale yellow
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	Punainen "häränsilmä" Red "bull's eye"	Kellertävä Yellowish	Vaaleankeltainen Pale yellow
<i>C. freundii</i>	Vaaleanpunainen Pale red	Vaaleanpunainen Pale red	Vaaleanpunainen Pale red
<i>E. aerogenes</i>	EB ^a	Kellertävä Yellowish	Vaaleanpunainen Pale red
<i>E. agglomerans</i>	Punainen "häränsilmä" Red "bull's eye"	Kellertävä Yellowish	Vaaleankeltainen Pale yellow
<i>E. coli</i>	EB	–	Vaaleanpunainen Pale red
<i>K. pneumoniae</i>	EB	Kellertävä Yellowish	Vaaleanpunainen Pale red
<i>P. mirabilis</i>	EB	Kellertävä Yellowish	Vaaleanharmaa Pale grey
<i>S. marcescens</i>	Vaaleanpunaisia Pale red	Vaaleanpunertava Pale reddish	Tummanpunainen Dark red
<i>P. aeruginosa</i>	Vaaleanpunaisia Pale red	Kellertävä Yellowish	Vaaleankeltainen Pale yellow
<i>P. fluorescens</i>	Keltainen Yellow	Kellertävä Yellowish	Vaaleankeltainen Pale yellow

^a Ei bakteerikasvua. No bacterial growth

^b Kefsulodiini-irgasan-novobiosiini agar. Cefsulodin Irgasan Novobiocin agar

^c Salmonella-shigella-desoksikolaatti-kalsiumkloriitti-agar. Salmonella Shigella Deoxycholate Calcium Chloride agar

yersinian lisäksi *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* ja *P. fluorescens*, ja näistä yersinian näköisinä läpikuultavina pesäkkeinä kasvoivat *E. aerogenes*, *E. agglomerans* ja *P. fluorescens*. Kaikki tutkitut bakteerikannat kasvoivat MacConkey-alustalla. Yersinian näköisinä vaaleankeltaisina pesäkkeinä kasvoivat *E. agglomerans*, *P. aeruginosa* ja *P. fluorescens*.

Eristysmenetelmiä vertailtaessa puhdasviljelmiä käyttäen (koe 2) ITC-liemi osoittautui kaikkein tehokkaimmaksi serotyypin O:3 eristämiseksi (taulukko 3). Serotyyppi O:9 rikastui ITC-liemessä selvästi heikommin. MRB-liemessä

rikastuivat kummatkin serotyypit yhtä hyvin. Muilla menetelmillä ei yersinia pystytty eristämään lainkaan.

Y. enterocolitica O:3 ja O:9 pystyttiin osoittamaan jauhelihas- ta ainoastaan ITC-rikastuksen jälkeen (taulukko 4). Serotyyppi O:3 löytyi yhtä hyvin riippumatta bakteerin määrästä jauhelihanäytteessä. Serotyyppi O:9 löytyi myös ITC-rikastuksen jälkeen, mutta ainoastaan suurinta ympäriä käyttäen, kun näytettä oli rikasteessa 1:100. Muilla menetelmillä ei yersinia jauhelihas- ta löytynyt edes suurimmalla ympäriä. Kontrollinäyttestä ei löytynyt yersinia.

Kokeessa 4 testattiin kaupalli-

sen OSSMER-liemen tehokkuutta. Serotyypit O:3 ja O:9 löytyivät vasta, kun niitä oli lisätty jauhelihaan vähintään 10⁴ pmy/g. Kaikilla maljoilla kasvoi erittäin paljon suurehkoja, punaisia ja vaaleanpunaisia pesäkkeitä, jotka vaikeuttivat yersianiapesäkkeiden löytämistä.

POHDINTA

Vertailtaessa eri bakteerikantojen kasvua eri selektiivilustoilla CIN-alusta inhiboi useamman kontaminanttibakteerin kasvua kuin SSDC ja MacConkey. Tällöin yersianiapesäkkeillä on pienempi todennäköisyys jäädä muun kasvuston alle. Tutkituista kannoista *E. agg-*

TAULUKKO 3 TABLE

Yersinia enterocolitica -pesäkkeiden määrät CIN-maljoilla eri rikastusmenetelmien jälkeen käytettäessä kontaminantteina viittä gramnegatiivista bakteerikantaa.

Number of *Yersinia enterocolitica* colonies on CIN plates after different enrichment methods and using five gram negative bacterial strains.

Menetelmä Method		pmy/malja cfu/plate	
		O:3	O:9
ISO	ITC	>150	4
	PSB	0	0
	PSB-KOH	0	0
NMKL	PSB-3h	0	0
	PSB + MRB	~100	~100
	PSB-22d	0	0
MTSB ^a		0	0
BOS ^b		0	0
OSSMER ^c		0	0

^a Muunneltu tryptikaasisoijaliemi. Modified Trypticase Soy Broth

^b Sappisuola-oksalaatti-sorboosiliemi. Bile Oxalate Sorbose Broth

^c *Yersinia* Selective Enrichment Broth acc. to OSSMER

lomerans oli ainoa joka muistutti CIN-maljoilla erehdyttävästi yersiniapesäkkeitä. SSDC-maljoilla monet kannat kasvoivat yersinian lailla kellertävinä. Erityisesti *P. fluorescens*- ja *E. aerogenes*-pesäkkeitä oli vaikea erottaa yersiniapesäkkeistä. SSDC-alustan käyttö vaatii enemmän kokemusta kuin CIN-alustan, koska tyypilliset pesäkkeet eivät erotu yhtä helposti kuin CIN-maljoilla. SSDC-agarilla on kuitenkin saatu enemmän yersinia O:3 serotyypin löydöksiä ITC-liemessä rikastuksen jälkeen kuin CIN-agarilla (Wauters ym. 1988). Koska varmistettavien pesäkkeiden tunnistaminen oli helppointa CIN-levyillä, sitä käytettiin eristysmaljana vertailtaessa eri rikastusmenetelmiä keskenään.

Vertailluista eristysmenetelmistä ainoastaan ISO-menetelmän selektiivinen rikastus ITC-liemessä osoittautui tehokkaaksi *Y. enterocolitica* -bakteerin eristämisessä.

TAULUKKO 4 TABLE

Yersinia enterocolitica -pesäkkeiden lukumäärä CIN-maljoilla käytettäessä viittä eri rikastusmenetelmää ja kahda eri laimennussubdetta jaubelibamatriisissa.

Number of *Yersinia enterocolitica* colonies on CIN plates after different enrichment methods using two different inoculum levels in minced pork.

Menetelmä Method		O:9				O:3			
		10 pmy/g 10 cfu/g		100 pmy/g 100 cfu/g		10 pmy/g 10 cfu/g		100 pmy/g 100 cfu/g	
		1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
ISO/DIS 10723 (1994)	ITC	0	0	0	8	~100	>150	~100	>150
	PSB	0	0	0	0	0	0	0	0
	PSB-KOH	0	0	0	0	0	0	0	0
NMKL 117 (1996)	PSB-MRB	0	0	0	0	0	0	0	0
	PSB-22 d	0	0	0	0	0	0	0	0
	PSB-22 d	0	0	0	0	0	0	0	0
MTSB ^a		0	0	0	0	0	0	0	0
BOS ^b		0	0	0	0	0	0	0	0
OSSMER ^c		0	0	0	0	0	0	0	0

^a Muunneltu tryptikaasisoijaliemi. Modified Trypticase Soy Broth

^b Sappisuola-oksalaatti-sorboosiliemi. Bile Oxalate Sorbose Broth

^c *Yersinia* Selective Enrichment Broth acc. to OSSMER

TAULUKKO 5 TABLE

Yersinia enterocolitica -pesäkkeiden määrä CIN-maljalla OSSMER-liemessä rikastuksen jälkeen.

Number of *Yersinia enterocolitica* colonies on CIN plates after selective enrichment in OSSMER broth.

Serotyyppi Serotype	Ympin suuruus (pmy) Inoculum level (cfu)			
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁶
O:3	0	0	2	5
O:9	0	0	2	2

Erityisesti O:3-serotyyppi rikastui hyvin, vaikka yersinia oli vain 10 pmy/g jauhelihaa. Serotyyppi O:9 löytyi, kun ympä oli 100 pmy/g jauhelihaa, mutta yersiniapesäkkeiden määrä oli oleellisesti pienempi kuin käytettäessä O:3-serotyyppiä. ITC-liemen on todettu soveltuvan huonosti O:9-serotyypin eristämiseen ympätystä jauhelihasta, koska kaliumkloraaatin pitoisuus liemessä (1g/l) on suurempi kuin kyseisen aineen MIC (minimal inhibitory concentration) serotyyppille O:9. Jättämällä kaliumkloraaatti pois liemestä serotyyppi O:9 kasvoi paremmin (de Zutter ym. 1994). Erään tutkimuksen mukaan kaliumkloraaatti ja tikarsilliini eivät lisää ITC-liemen selektiivisyyttä lainkaan vaan irgasan toimii paremmin ilman niitä (Toora ym. 1994a). Kaliumkloraaatin inhiboiva vaikutus perustuu siihen, että monilla enterobakteereilla esiintyvä A-nitrataasi hajottaa kloraaattia, joka tällöin muuttuu toksiseksi kyseisille bakteerikannoille. Yersinioilla esiintyvällä B-nitrataasilla ei ole vaikutusta kloraaattiin (Wauters ym. 1988). ITC-rikastuksen jälkeen CIN-maljoilla kasvoi kuitenkin tuskin ollenkaan muuta kuin yersinia-pesäkkeitä, vaikka irgasanin määrä ITC-liemessä oli pienempi kuin BOS-, OSSMER- ja MTSB-liemissä. Ilmeisesti irgasanin lisäksi tarvitaan myös muita selektiivisiä aineita inhiboimaan muiden gramnegatiivisten baktee-

rien kasvua. Tätä tukevat myös tässä tutkimuksessa MTSB- ja OSSMER-liemillä saadut tulokset. Irgasanin määrän lisääminen ei pelkää johda yersinian parempaan löytymiseen. ITC-liemen etuihin kuuluu myös lyhyt rikastusaika. Liemi on kohtuullisen helppo valmistaa, ja se löytyy nyt myös kaupallisena jauheena (www.merck.de).

ISO-menetelmän ei-selektiivisessä rikastuksessa PSB-liemestä yersinia ei pystytty eristämään. Tulos oli sama KOH-käsittelystä riippumatta. Kaliumhydroksidikäsittely perustuu siihen, että *Y. enterocolitica* sietää emäksisiä olosuhteita paremmin kuin muut gramnegatiiviset bakteerit (Aulisio ym. 1980). On kuitenkin osoitettu, että monet muut tekijät, kuten elatusaine, lämpötila ja bakteerien kasvuvaihe, vaikuttavat emäksen sietokykyyn ja vähentävät emäksittelyn tehoa (Schiemann 1983a).

Pohjoismaisen elintarvikkeiden metodiikkakomitean menetelmällä yersinia löytyi käytettäessä bakteeripuhdasviljelmiä ja silloinkin vain selektiivirikastuksen jälkeen. Menetelmällä ei pystytty eristämään jauhelihaan lisättyä yersinia. Menetelmän mukaan valmiiseen elatusaineeseen voidaan lisätä karbenisilliiniä 2,5 mg/l. Tässä tutkimuksessa karbenisilliiniä ei käytetty. Aineen on todettu inhiboivan tiettyjä serotyypin O:3 kantoja (Schiemann 1982). Karbe-

nisilliinilla ja tikarsilliinilla on samanlainen selektoiva vaikutus ja aineiden jättäminen pois rikastusliemistä vähentää liemien selektiivisyyttä (Wauters ym. 1988).

BOS-liemirikasteesta ei tässä tutkimuksessa pystytty eristämään yersinia. BOS-liemen on todettu sopivan erittäin hyvin serotyypin O:8, mutta myös serotyypin O:3 rikastamiseen (Schiemann 1982). Kuitenkaan toisessa tutkimuksessa ei 29 sian kielinäytteestä yksikään ollut positiivinen BOS-liemellä tutkittuna, mutta ITC-liemellä 19 näytteestä eristettiin serotyyppi O:3 (Wauters ym. 1988). Menetelmä on melko hidas, rikastus kestää yhteensä 19 vuorokautta. BOS-liemi on monimutkainen ja hidas valmistaa ja siksi se ei sovelu hyvin rutiinivälitöskentelyyn. Peruselatusaine on hyvin emäksinen ja tarvitsee pH:n säätämisen suolahapolla. Elatusaineeseen lisätään yhteensä kuutta steriilisuodatettua liuosta ja kahta selektiivistä ainetta. Nitrofurantoiini liukenee vain dimetylformamidiin, joka on haitallista hengitettynä ja iholle joutuaan.

MTSB-liemi on todettu tehokaksi muun muassa serotyyppien O:8, O:5,27 ja O:8 eristämässä (Toora ym. 1994b, Bhaduri ym. 1997). Liemi on helppo valmistaa ja sopii siksi hyvin myös rutiinikäyttöön. Kokonaisinkubointiaika on vain kolme vuorokautta. Tällä menetelmällä yersinia ei kuitenkaan pystytty eristämään tässä tutkimuksessa. Ilmeisesti irgasan ei yksin riitä eristämään riittävästi muiden bakteerien kasvua.

Selektiivinen rikastus OSSMER-liemessä on testatuista menetelmistä ylivoimaisesti yksinkertaisin ja nopein. Näistä eduista huolimatta sitä ei voi suositella ainoaksi menetelmäksi eristettäessä yersinia elintarvikkeista. Menetelmää voi käyttää rinnakkain jonkin hitaamman ja selektiivisemmän menetelmän kanssa. Alustava positiivinen tulos (tyypilliset pesäkkeet CIN-maljalla) on mahdollista

saada kahdessa vuorokaudessa, jos yersinia on näytteessä enemmän kuin 10^4 pmy/g ja taustakasvuston määrä on kohtuullinen. Tosin ISO-menetelmän selektiivirikastus kestää vain vuorokauden pitempään ja menetelmä on selvästi herkempi.

Jos etsitään sekä O:3 että O:9-serotyyppejä, on varmintä käyttää rinnan ISO- ja Pohjoismaisen elintarvikkeiden metodiikkakokoelman (PEMK) menetelmiä. Rikastusta PSB-liemessä oli käytetty kahdessa menetelmässä ennen selektiivirikastusta (PEMK ja BOS) ja kahdessa menetelmässä ainoana rikastustapana (PEMK ja ISO). Ei-selektiivinen rikastus ei kuitenkaan näytä olevan riittävän tehokas yersinian eristyksessä, vaikka käytettäisiin pitkää kylmärikastusaikaa. Kylmärikastuksella on pystytty eristämään ei-patogeenisiä kantoja, mutta O:3-serotyypin löytyvyys on huono (Wauters ym. 1988). Pitkä rikastusaika on sinänsä epäkäytännöllinen esimerkiksi tutkittaessa ruokamyrkytyspäilyyn liittyviä näytteitä. Esirikastus voi kuitenkin olla eduksi silloin, jos bakteerisolut ovat vaurioituneita tai rasittuneita.

KIRJALLISUUS

- Aulisio, C. C. G., Mehlman, I. J. ja Sanders, C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1980: 135-140.
- Bhaduri, S., Cottrell, B. ja Pickard A. R. Use of a single procedure for selective enrichment, isolation, and identification of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* of various serotypes from pork samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1997: 1657-1660.
- Bottone, E. J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb. Infect.* 1, 1999: 323-333.
- De Boer, E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 1992: 75-84.
- De Zutter, L., Le Mort, L., Janssens, M. ja Wauters, G. Short-comings of irgasan tetracycline chlorate broth for the enrichment of *Yersinia enterocolitica* biotype 2, serotype 9 from meat. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 1994: 231-237.
- Doyle, M. P. ja Hugdahl, M. B. Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1983: 127-135.
- International Organization for Standardization. Microbiology-General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. ISO/DIS 10273, 1994.
- Kansanterveyslaitos. Tartuntataudit Suomessa 2001. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja KTL B7/2002.
- Kapperud, G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 1991: 53-66.
- Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea. *Yersinia enterocolitica*. Osoittaminen elintarvikkeista. No. 117, 3. painos, 1996.
- Schiemann, D. A. Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1982: 14-27.
- Schiemann, D. A. Alkalotolerance of *Yersinia enterocolitica* as a basis for selective isolation from food enrichments. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1983a: 22-27.
- Schiemann, D. A. Comparison of enrichment and plating media for recovery of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* from inoculated beef stew. *J. Food Prot.* 46, 1983b: 957-964.
- Toora, S., Budu-Amoako, E., Ablett, R. F. ja Smith, J. Evaluation of different antimicrobial agents used as selective supplements for isolation and recovery of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 1994a: 67-72.
- Toora, S., Budu-Amoako, E., Ablett, R. F. ja Smith, J. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from ready-to-eat foods and pork by a simple two step procedure. *Food Microbiol.* 11, 1994b: 369-374.
- Wauters, G., Goossens, V., Janssens, M. ja Vandepitte, J. New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from Pork. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1988: 851-854.
- Yersinia Selective Enrichment Broth* acc. to Ossmer. Teoksessa: MERCK Microbiology Manual, Culture Media, 1996: 307.

KIRJOITTAJIEN OSOITTEET

ELL Leena Manner
Mönninkatu 56
81700 LIEKSA
p. 013-689 4501
s-posti leena.manner@lieksa.fi

Maria Fredriksson-Abomaa, ELT
Hannu Korkeala, ELT, VTM
professori
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Elintarvike- ja ympäristöhygienian laitos
Helsingin yliopisto
PL 57
00014 Helsingin yliopisto