Príloha
k zoznamu úradných metód
laboratórnej diagnostiky potravín a krmív - časť Mikrobiológia

M – 52

Bakteriologické vyšetrovanie mäsa jatočných zvierat vrátane hydiny, zajacovitých a/alebo drobnej zveri z farmových chovov odobratého v rámci prehliadky post mortem

1. Účel a oblasť použitia

1.1 Účel

Metodické pokyny pre veterinárnych inšpektorov I. Čerstvé mäso kopytníkov, 3.časť – prehliadka *post mortem* (vydané ŠVPS SR č.1406/2006-230, príloha č. ČM PM 004) vyžadujú doplňujúce laboratórne vyšetrenie pozastavených tiel zvierat, napr. bakteriologické vyšetrenie alebo na prítomnosť rezíduí, ak je dané podozrenie na chorobné zmeny alebo použitie liečiv. Bakteriologické vyšetrenie slúži na to, aby sa zaslané vzorky vyšetrili najmä na zoonózy a pôvodcov zoonóz podľa predpísanej metódy.

1.2. Vyšetrované parametre

Arcanobacterium pyogenes, Bacillus anthracis, Clostridium botulinum, Clostridium chauvoei, Clostridium perfringens, Erysipelothrix rhusiopathie, Listeria monocytogenes, mykobaktérie, salmonely, koagulázapozitívne stafylokoky, hemolytické streptokoky, verotoxíntvoriace Escherichia coli a ďalšie mikróby prítomné v prípade septikémie.

1.3 Druh vzorky

Svaly, lymfatické uzliny, orgány, prípadne zmenené tkanivá, pri hydine, zajacovitých a/alebo drobnej zveri z farmových chovov celé telá, najmenej prsia, stehná a prípadne aj pečeň.

2. Princíp

Dôkaz mikroorganizmov z častí zvierat (svaly, lymfatické uzliny, orgány) pomocou bakteriologickej kultivácie.

3. Prístroje a pomôcky

Základné vybavenie mikrobiologického laboratória (pozri STN ISO 7218) a tieto prístroje a pomôcky:
3.1 Chladnička

3.2 Termostat (termobox) s teplotou udržiavanou na 37°C ± 1°C
3.3 Termostat (termobox) s teplotou udržiavanou na 41,5°C ± 1°C
3.4 Mikroskop
3.5 Očkovacie kľučky
3.6 Skúmavky a banky vhodného objemu, Petriho misky
3.7 Nožničky, pinzety a skalpely
3.8 Plynový kahan
3.9 Podložné a krycie sklíčka
3.10 Anaerostat
3.11 Plynový kahan

4. Kultivačné médiá, roztoky a referenčné kmene

4.1 Kultivačné médiá

4.1.1 Krvný agar (KA)– zloženie a príprava podľa STN 56 0100
4.1.2 Deoxycholátové médium so xylózou a lyzínom (médium XLD) - zloženie a príprava podľa STN EN ISO 6579
4.1.3 MacConkey agar so sorbitolom - zloženie a príprava podľa STN EN ISO 16654
4.1.4 Rappaportovo-Vassiliadisovo médium so sójou (RVS)- zloženie a príprava podľa STN EN ISO 6579
4.1.5 Müllerovo-Kauffmannovo médium s tetrationátom a novobiocínom (MKTTn) - zloženie a príprava podľa STN EN ISO 6579
4.1.6 Tlmivá peptónová voda - zloženie a príprava podľa STN EN ISO 6579
4.1.7 Modifikované polotuhé Rappaportovo-Vassiliadisovo médium (MSRV) - zloženie a príprava podľa STN EN ISO 6579, príloha A

Poznámka: Ďalšie médiá podľa indikácie v žiadanke na vyšetrenie, ktorých zloženie a príprava sa riadi podľa príslušných návodov výrobcov resp. metodík OIE a ISO.

4.2 Roztoky

4.3.1 Alkohol 96 %
4.3.2 Roztoky - na farbenie podľa Grama
4.3.3 Roztoky na iné farbenia (Giemsa, Ziehl Neelsen, Tan-Thiam-Hok)

4.3 Referenčné kmene

4.4.1 Staphylococcus aureus
4.4.2 Clostridium perfringens
4.4.3 Salmonella enteritidis a ďalšie

4.4 Chemikálie/činidlá

4.5.1 biochemické identifikačné systémy napr. API systém, BBL Crystal
4.5.2 sérologické identifikačné systémy – séra na sklíčkovú aglutináciu

5. Príprava vzorky

Povrch vzoriek svalov a orgánov sa opáli plameňom v takom rozsahu, aby sa materiál odoberaný z hĺbky neinfikoval povrchovou sekundárnou mikroflórou. Malé uzliny sa dvakrát na krátky čas ponoria do 96 % alkoholu a po každom ponorení sa alkohol odparí v plameni. Zo stredu každej časti svalov, a orgánov a uzlín sterilnými nástrojmi odoberie časť tkaniva veľkosti bôbu. Kultivácia na množenie salmonel (alebo iných baktérií

z čeľade Enterobacteriaceae) sa môže vykonávať aj postupom za použitia niektorého z uvedených živných tekutých médií (4.1.4, 4.1.5 a 4.1.6), do ktorých sa vložia kúsky svalov a orgánov. Média sa inkubujú 18-24 hod pri 37 ^{o}C alebo 41,5 ^{o}C (pozri bod 6.3).

6. Postup skúšky

6.1 Priama kultivácia

Malé časti tkanív sa očkujú priamo rozterom na Petriho misky, a to svaly: na dve Petriho misky s krvným agarom (jedna sa kultivuje anaeróbne, druhá aeróbne) a na selektívne médium, napr. XLD (4.1.2) alebo MacConkey agar so sorbitolom (4.1.3), orgány a uzliny: rozterom na krvný agar a na selektívne médium (4.1.2 alebo 4.1.3). Vzorky sa ďalej, ak to bolo v žiadanke uvedené, vyšetrujú na prítomnosť rezíduí inhibičných látok podľa úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív (Doplnok 1, časť Chémia 12.18 a 12.19). Podľa potreby sa oddelene kultivujú časti zo zmeneného tkaniva, ak je také súčasťou zaslanej vzorky. Pri podozrení na prítomnosť mykobaktérií alebo pôvodcov červienky alebo septikémie sa spraví odtlačkový preparát, ktorý sa príslušne zafarbí (Gram, Giemsa, Ziehl Neelsen, Tan-Thiam-Hok) a pozrie mikroskopom. Okrem toho sa pri podozrení na červienku odoberie časť obličky, ktorá sa vloží do živného bujónu so sérom (5%) alebo glukózou (1-2%) na množenie.
Naočkované Petriho misky sa inkubujú obrátené hore dnom v termostate 24 h ± 3 h pri teplote 37 ^{o}C aeróbne aj anaeróbne (svaly).

6.2 Neselektívne množenie

Naočkovaná tlmivá peptónová voda (4.1.6) sa kultivuje 18-24 hod pri 37 ^{o}C. Z nej sa vyočkováva na polotuhé médium (4.1.7) alebo do tekutého selektívneho média (4.1.4, 4.1.5) prípadne na niektoré pevné selektívne médium (napr. 4.1.2).

6.3 Selektívne množenie

Naočkované modifikované polotuhé Rappaportovo-Vassiliadisovo médium (MSRV) sa kultivuje 24 a 48 hod pri . 41,5 ^{o}C ± 1 ^{o}C.
Naočkované Rappaportovo-Vassiliadisovo médium so sójou (4.1.4) sa inkubuje pri teplote 41,5 ^{o}C ± 1 ^{o}C 24 h ± 3 h. Müllerovo-Kauffmannovo médium s tetrationátom a novobiocínom (4.1.5). MKTTn sa inkubuje pri teplote 37 ^{o}C ± 1 ^{o}C 24 h ± 3 h. Je potrebné zabezpečiť, aby sa neprekročilo povolené maximum inkubačnej teploty pre RVS médium(42,5 ^{o}C).

6.4 Izolácia kolónií z tekutých médií

Z kultúr získaných selektívnym a neselektívnym množením sa naočkuje bakteriologickou kľučkou na povrch pevného selektívneho média (4.1.7, 4.1.2/4.1.3). Kľučkou sa nanáša tak, aby sa umožnil rast dobre izolovaných kolónií.

7. Odčítanie a potvrdenie

Po predpísanej dobe inkubácie sa hodnotí rast kolónií z priamej kultivácie a po množení v tekutých médiách na pevných živných médiách. Ak ide o nešpecifické kmene, tak sa hodnotia aj kvantitatívne – mierny stupeň (menej ako 10 kolónií), stredný stupeň (od 10 do 30), silný stupeň (viac ako 30 kolónií).
Ak sa podľa rastových vlastností na pevných médiách zistí, že ide o špecifické patogénne kmene, tak sa ďalej postupuje v identifikácii. Niektoré druhy mikroorganizmov majú typické vlastnosti napr. na krvnom agare a nie je potrebná ďalšia diagnostika. Vo väčšine

prípadov sa musí pokračovať v mikroskopickom, kultivačnom, biochemickom alebo sérologickom potvrdzovaní.

Arcanobacterium pyogenes: spôsobuje hnisanie, rastie na krvnom agare, lepšie pod CO_2, tvorí jemné kolónie so slabou hemolýzou, je to grampozitívna tyčinka, rovná alebo zahnutá, často gramlabilná. Ak je makroskopická a mikroskopická identifikácia nedostatočná, treba pokračovať v biochemickej identifikácii.

Clostridium botulinum: rastie na krvnom agare anaeróbne, väčšinou v priehľadných kolóniách s betahemolýzou, sivobielym povrchom, matným alebo slabo lesklým s nepravidelnými okrajmi.

Clostridium chauvoei/septicum: rastie na krvnom agare v anaeróbnom prostredí ako slabo opaleskujúce ostro ohraničené sivé kolónie s krátkymi výbežkami alebo vláknami na okraji. Môže sa vyskytovať slabá hemolýza. Sú to grampozitívne tyčinky, tvoriace spóry môžu tvoriť bizarné tvary napr. vretienka.

Clostridium perfringens: rastie anaeróbne pomerne charakteristicky na krvnom agare väčšinou s betahemolýzou ako hladké, ploché kolónie. Sú to grampozitívne tyčinky, tvoriace spóry.

Erysipelothrix rhusiopathie: rastie aeróbne na krvnom agare, najmä v roztere z obličiek, ako jemné drobné kolónie, ktoré majú vzhľad kapiek rosy (S-forma) alebo s zrnitým povrchom a nerovnomerným okrajom (R-forma), pomaly rastúce, môže byť slabo viridujúce.Sú to grampozitívne tyčinky, krátke rovné alebo mierne zahnuté, v R-forme so sklonom k tvorbe retiazok. Z prídavného živného bujónu so sérom (5%) alebo glukózou (1-2%) sa pripravuje mikroskopický preparát a v pozitívnom alebo v podozrivom prípade sa vyočkováva na krvný agar.

Listeria monocytogenes: tvorí na krvnom agare malé kolónie so slabou hemolýzou, v preparáte sú to grampozitívne kokoidné až tyčinkovité malé baktérie. Na ďalšiu diagnostiku je potrebné použiť selektívne médiá napr. Palcam agar a príslušné biochemické identifikačné testy.

Mykobaktérie: Dôkaz mykobaktérií je obmedzený na farbenie preparátu z rozteru podozrivých orgánov podľa Tan-Thiam-Hok a k ďalšej diferenciácii sa posiela do NRL mykobaktérií ŠVPÚ Bratislava.

Salmonely: postupuje sa podľa úradných laboratórnych metód prenosných ochorení zvierat, príloha 1, č.10.4.

Koagulázapozitívne stafylokoky: sleduje sa tvorba plazmakoagulázy, podozrivé kolónie sú bielosivé, ale aj žltasté – slabožlté až žlté a väčšinou betahemolytické. Na ďalšiu diagnostiku je potrebné použiť príslušné biochemické identifikačné testy resp. iné testy.

Hemolytické streptokoky: kolónie sú zväčša bielosivé, drobné s výraznou ß-hemolýzou. Sú grampozitívne, niekedy aj gramlabilné, malé a okrúhle, event. v krátkych retiazkach.

Verotoxíntvoriace kmene Escherichia coli (VTEC): na identifikáciu E.coli O 157 slúži MacConkey agar so sorbitolom (4.1.3), kolónie sú bezfarebné. K ďalšej identifikácii je potrebné použiť oxidázový test - test oxidázy a aglutináciu so špecifickým O 157 antisérom O 157.

8. Vyhodnotenie

Na podklade bakteriologického vyšetrenia sa vydáva nález:
- či boli vyšetrením vzorky zistené špecifické patogénne mikroorganizmy (napr. salmonely, S. aureus) a či ide o lokálny výskyt alebo sepsu
- či bola vyšetrením vzorky zistená iba prítomnosť nešpecifickej (saprofytickej mikroflóry) a v ktorých častiach a v akom rozsahu (mierneho stupňa až silného stupňa)
- nebola zistená bakteriálna mikroflóra

Poznámka: V prípade prítomnosti antibakteriálnych látok vo vzorke môže byť výsledok bakteriologického vyšetrenia skreslený.

9. Protokol o skúške

Protokol musí obsahovať:
- druh a pôvod vzorky
- dátum odobratia vzorky
- dátum príjmu a skúšania vzorky
- použitá metóda
- výsledok skúšania

Protokol o skúške musí obsahovať všetky informácie zo žiadanky potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

Dôležité:
Výsledok bakteriologického vyšetrenia sa oznamuje ihneď po ukončení vyšetrenia telefonicky, faxom alebo elektronicky a následne sa príslušnej RVPS zasiela písomne.