M-36

MIKROBIOLÓGIA POTRAVÍN

Metóda pre dôkaz baktérií rodu Brucella v mlieku a v mliečnych výrobkoch

1. Predmet a oblasť použitia

Táto metodika určuje všeobecné pokyny pre metódu na dôkaz baktérií rodu Brucella v surovom kravskom, ovčom a kozom mlieku a v syroch zo surového kravského, ovčieho a kozieho mlieka. Metóda je založená na technike získania charakteristických kolónií narastených na selektívnom médiu po inkubácii pri teplote 37°C. Bola vypracovaná na základe publikácií: KLEER,J.: Untersuchungen zum Brucellose-Infektionsrisiko durch Weiβkäse - Kultureller Erregernachweis - Erhitzungsnachweis, Technologische Aspekte. Dizertačná práca, Berlín 1988 a KLEER,J.,P.TEUFEL,P.,H-J.SINELL: Kultureller Nachweis von Brucella spp.in Salzlake-Weiβkäsen. Zborník z odborného seminára, Garmisch-Partenkirchen,29.9.-1.10.1999.

2. Odkazy na normy

STN ISO 7218 Mikrobiológia potravín a krmív. Všeobecné pokyny na mikrobiologické skúšanie.

3. Termíny a definícia

Pre účely tejto metodiky sa používajú tieto definície:

3.1 suspektná brucella - sú baktérie, ktoré vytvárajú na selektívnom tuhom médiu charakteristické kolónie a ktoré vykazujú pri osvetlení charakteristické zafarbenie a popísané biochemické a sérologické vlastnosti, ak sú testy vykonané podľa tejto metódy.
3.2 Brucella – suspektná brucella, ktorá bola biochemicky a sérologicky identifikovaná referenčným laboratóriom.
3.3 dôkaz rodu Brucella – určenie prítomnosti alebo neprítomnosti týchto baktérií v definovanom množstve výrobku, ak sú testy vykonané podľa tejto metódy.

4. Podstata skúšania

Dôkaz baktérií rodu Brucella vyžaduje 5 po sebe nasledujúcich fáz (pozri aj tabuľku č.1).

4.1 Selektívne množenie v tekutom médiu

Skúšaná vzorka sa očkuje do bujónu pre množenie brucel a inkubuje sa v mikroaeróbnom prostredí (5 až 10 % CO_2) pri 37 ^{o}C po dobu 3 až 5 dní

4.2. Izolácia - Vyočkovanie na tuhé selektívne médium pre zisťovanie prítomnosti suspektných kolónií

Každá z kultúr získaných podľa 4.1 sa vyočkuje na predpísané tuhé selektívne médium, t.j. na agar podľa FARRELLa. Po inkubácii pri 37 ^{o}C po dobu 3 až 5 dní v mikroaeróbnom prostredí (5 až 10 % CO_2) sa zisťuje prítomnosť kolónií suspektných ako kolónie brucel.

4.3 Skríning na základe morfologických znakov a potvrdenie suspektných brucel

4.3.1 Skríning na základe morfologických znakov
4.3.2 Skríning na základe osvetlenia

4.4 Subkultivácia suspektných kolónií získaných podľa 4.3 na selektívne tuhé médium, Brucella agar pri 37°C po dobu 3 dní na potvrdenie príslušnosti k brucelám
4.4.1 Katalázový test
4.4.2 Farbenie podľa Grama
4.4.3 Mikroskopické vyšetrenie
4.4.4 Sklíčková aglutinácia s monošpecifickými A a M –antisérami
4.4.5 Aglutinácia s 0,1 % vodným roztokom akriflavínu

4.5 Odovzdanie na identifikáciu do referenčného laboratória

Kultúru, ktorá vykazuje znaky svedčiace pre rod Brucella označí laboratórium ako suspektnú brucelu a odovzdá na ďalšiu identifikáciu referenčnému laboratóriu, napr. laboratóriu klinickej mikrobiológie.

5. Kultivačné médiá a činidlá

5.1 Všeobecne

Bežnú laboratórnu prax pozri v STN ISO 7218 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny pre mikrobiologické skúšanie.

5. 2 Médium pre selektívne množenie – Bujón podľa Farrella pre množenie brucel

5.2.1 Základ média: Bacto Brucella bouillon (DIFCO), alebo Brucella bujón
5.2.1.1 Zloženie:

tryptón	10,0 g
mäsový peptón získaný peptickým trávením	10,0 g
glukóza	1,0 g
kvasničný extrakt	2,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
hydrosiričitan sodný ($NaHSO_3$)	0,1 g
voda	1 000 ml

5.2.1.2 Príprava

Zložky média alebo kompletné dehydrované médium sa rozpustí vo vode, ak je to potrebné varom. Hodnota pH sa upraví tak, aby po sterilizácií bola 7,0 ± 0,2.
Sterilizuje sa v autokláve pri teplote 121 ^{0}C 15 minút.

5.2.2 Výživné prídavky:

konské sérum 5 % v/v - suplement OXOID SR 35
roztok antibiotík – suplement OXOID SR 83

cycloheximid	100(mg/l)
nystatin	100 000 IU/l
bacitracin	25 000 IU/l
polymyxin B	5 000 IU/l
vancomycin	20 mg/l
kyselina nalidixinová	5 mg/l

5.3 Selektívne tuhé médium podľa Farrella

5.3.1 Základ média:
Brucella-agar –basis - OXOID CM 169
Pozn.: Firma OXOID ponúka aj Blod agar base č.2 (CM 271), alebo Columbia agar base (CM 331) alebo Brucella Base (CM 691)
Príprava médií podľa návodu výrobcu.

výživné prídavky:
konské sérum 5 % v/v - OXOID SR 35
roztok antibiotík - suplement - OXOID SR 83

cycloheximid	100(mg/l)
nystatin	100 000 IU/l
bacitracin	25 000 IU/l
polymyxin B	5 000 IU/l
vancomycin	20 mg/l
kyselina nalidixinová	5 mg/l

Obsah flaštičky so suplementom treba riediť s 10 ml zmesi vody a etanolu 1:1.

5.3.2 Príprava roztokov pre suplement:

<u>cycloheximid</u> (Sigma)
1,0 g rozpustiť v 5 ml acetónu, zriediť destilovanou vodou v pomere 1:20,
10 ml=100 mg

<u>nystatin</u> (Sigma, 4.800 IU/mg)
208,3 mg sa rozpustí v 2 ml dimetylformamidu, pred použitím zriediť s destilovanou vodou v pomere 1:10
1 ml=5 000 IU

<u>bacitracin</u> (Serva, 55 000-65 000 IU/g)

4,167 g sa rozpustí v 50 ml destilovanej vody
1 ml=5 000 IU (4584-5417 IU)

polymyxín B (polymyxin B-sulfat, Sigma)
6,3 mg sa rozpustí v 10 ml destilovanej vody,
1 ml=5 000 IU

vankomycín (Vancomycin-hydrochlorid, Sigma)
50 mg sa rozpustí v 10 ml destilovanej vody
1 ml= 5 mg

kyselina nalidixinová (Sigma)
500 mg sa rozpustí v 10 ml 0,5 N NaOH
bezprostredne pred použitím sa zriedi s destilovanou vodou v pomere 1:10
1 ml pracovného roztoku = 5 mg

Poznámka - Agar a bujón podľa Farella veľmi dobre potláčajú rast stafylokokov, aeromonád, streptokokov, baktérie z čelade Enterobacteriaceae a ostatných gram-negatívnych tyčiniek.

6. Prístroje a pomôcky

Poznámka - Jednorázové pomôcky, pokiaľ majú vhodnú špecifikáciu, sú prijateľnými náhradami za pomôcky sklenené.

Základné vybavenie mikrobiologického laboratória (pozri STN ISO 7218)

6.1 Prístroj na sterilizáciu horúcim vzduchom (sušiareň) alebo parou (autokláv)
6.2 Termostat s možnosťou udržiavania teploty na 37 ^{o}C ± 1 ^{o}C
6.3 Vodný kúpeľ alebo termostat s možnosťou udržiavania teploty na 40 ^{o}C ± 1 ^{o}C
6.4 pH meter s presnosťou merania ± 0,1 jednotky pH pri teplote 25 ^{o}C
6.5 Anaerostat vybavený katalyzátorom a vyvíjačom plynov (Gaspak) pre vytvorenie prostredia s 5-10 % CO_2
6.6 Banky, skúmavky alebo fľaše s vhodným objemom
6.7 Odmerné valce
6.8 Delené pipety s objemom 10 ml s delením 0,5 ml a s objemom 1 ml s delením 0,1 ml
6.9 Bakteriologické kľučky vyrobené zo zliatiny platiny a irídia alebo zo zliatiny chrómu a niklu s priemerom približne 3 mm
6.10 Petriho misky s priemerom od 90 mm do 100 mm

7. Odber vzoriek

Je dôležité, aby laboratórium dostalo vzorku, ktorá je skutočne reprezentatívna a nebola počas prepravy a uskladnenia poškodená alebo zamenená.
Odber vzoriek nie je súčasťou metódy špecifikovanej v tomto metodickom pokyne. Ak neexistuje špecifická medzinárodná norma na odber vzoriek skúšaného výrobku, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

8. Príjem a uchovávanie vzoriek

Príprava analytickej vzorky sa vykonáva podľa špecifickej normy vhodnej pre skúšaný výrobok. Ak takáto špecifická medzinárodná norma neexistuje, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

9. Postup skúšania

(Pozri schému v tabuľke)

9.1 Skúšobná vzorka
Pozri STN ISO 6887 a niektorú špecifickú medzinárodnú normu vhodnú pre skúšaný výrobok

9.2 Selektívne množenie

Vzorka o hmotnosti 25 g sa zhomogenizuje s 225 ml bujónu podľa Farrella o teplote 40° C po dobu 2 minút. Potom sa suspenzia inkubuje 3 až 5 dní pri 37° C.
Odporúča sa používať 1,5 l Erlenmayerove banky, ktoré umožňujú veľkou povrchovou plochou výmenu plynov a tým zabraňujú disociácii brucel. Ďalej sa odporúča aeróbna inkubácia a paralelne s mikroaeróbnou s pridaním 5 až 10% CO_2, najmä pri prvej izolácii a pre druh B.abortus.

9.3 Očkovanie na tuhé selektívne médium a zisťovanie prítomnosti suspektných kolónií

Po ukončení stupňa množenia v selektívnej tekutej pôde sa kultúra premieša (obsahom banky sa pomaly zakrúži), z hladiny sa odoberie plná očkovacia kľučka a inokulum sa prenesie na povrch tuhého média podľa Farrella. Inkubuje sa 3-5 dní pri 37° C. Ďalej sa odporúča aeróbna inkubácia a paralelne s mikroaeróbnou s pridaním 5 až 10% CO_2, najmä pri prvej izolácii a pre druh B.abortus.

Poznámka - Odporúčame používať na prenesie inokula namiesto kľučky pipety pre jednorázové použitie alebo nedelené 1 ml pipety a odoberať po jednej kvapke (obvyklý objem je jedna dvadsatina ml).

Inokulum sa rozočkuje tak, aby sa vytvorili dobre izolované kolónie.

9.4. Skríning suspektných kolónií

Suspektné kolónie: priemer 2 – 4 mm, drobné, hladké, lesklé, ploché, okrúhlej kontúry, mierne zakalené, niekedy medovej farby, neskoršie majú svetlohnedé sfarbenie. Rast v primokultúre je pomalší, viditeľný na 3-4 deň, niekedy až 5.deň. Pri pozorovaní proti svetlu sú priehľadné, svetlomedovej farby. Pri pozorovaní v odrazenom svetle sú belasej až modrasto-sivej farby, slabo nepriehľadné.

9.4.1 Subkultivácia suspektných kolónií

Pre potvrdenie sa z každej Petriho misky vyberie najmenej po piatich kolóniách, ktoré sa považujú podľa 9.4 za suspektné.

Pokiaľ je na jednej miske menej suspektných kolónií ako päť, vyberú sa na potvrdenie všetky suspektné kolónie.
Každá z vybraných kolónií sa rozočkuje na povrch misiek s predsušeným živným agarom, Brucella agar, tak, aby sa umožnil rast dobre izolovaných kolónií.
Inkubuje sa 3 dni pri 37°C. Po 3 dňoch sa testujú na príslušnosť k brucelám.

9.4.2 Potvrdenie príslušnosti k rodu Brucella

9.4.2.1 Katalázová reakcia

Typická kolónia sa suspenduje na sklíčku v 3% roztoku peroxidu vodíka (roztok peroxidu vodíka, 3 % obj.). Katalázopozitívne kmene sa vyznačujú tvorbou bubliniek plynu.

9.4.2.2 Farbenie podľa Grama

S typickou kolóniou sa vykoná farbenie podľa Grama. Brucella sp. sú gramnegatívne často kokovité, krátke (často bipolárne sa farbiace) pleomorfné tyčinky, veľkosti 0,2 x 0,8 μm.

9.4.2.3 Sklíčková aglutinácia s monošpecifickými A a M –antisérami

Na dôkaz prítomnosti antigénu A a M baktérií rodu Brucella sa použije aglutinácia kolónie čistej kultúry s vhodnými sérami na podložnom skle po vylúčení spontánne aglutinujúcich baktérií v 0,1 % roztoku akriflavínu.

9.4.2.4 Aglutinácia s čerstvým roztokom akriflavínu

Pre vylúčenie spontánne aglutinujúcich kmeňov sa použije 0,1 % vodný roztok akriflavínu

9.5 Odovzdanie na identifikáciu do referenčného laboratória

Kultúru, ktorá vykazuje skríningové znaky podľa 9.4 a podľa 9.4.2 označí laboratótrium mikrobiológie potravín ako suspektnú brucelu a odovzdá ju na druhovú identifikáciu do referenčného laboratória, napr. laboratóriu klinickej mikrobiológie. Súčasne s kmeňmi odovzdá laboratórium mikrobiológie potravín sprievodnú správu, ktorá musí obsahovať zistené vlastnosti podľa 9.4. a podľa 9.4.2 a všetky ostatné informácie potrebné pre úplnú identifikáciu vzorky.

10. Vyjadrenie výsledku

V súlade s výsledkami referenčného laboratória sa vyjadrí prítomnosť alebo neprítomnosť baktérií rodu Brucella v skúšobnej vzorke s hmotnosťou 25 g alebo 25 ml skúšaného výrobku.

11. Protokol o skúške

V protokole o skúške sa musí uviesť použitá metóda skúšania, doba inkubácie a získané výsledky a použitý spôsob ich vyjadrenia. Protokol musí obsahovať aj všetky podrobnosti pracovného postupu, ktoré nie sú uvedené v tomto pokyne, alebo sú považované za voliteľné a ďalej všetky podrobnosti o okolnostiach, ktoré by mohli mať vplyv na výsledky skúšania.
Protokol o skúške musí obsahovať všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

Schéma postupu skúšky

Selektívne pomnoženie

25 ml mlieka/homogenizácia 25 g syra s 225 ml bujónu odľa Farrella pri 40 ^{o}C
Inkubácia: 3 až 5 dní 37 ^{o}C, mikroaeróbne (5 až 10 % CO_2)

Izolácia

frakciované rozočkovanie kľučkou na agar podľa Farrella
Inkubácia: 3 až 5 dní 37° C, mikroaeróbne (5 až 10 % CO_2)

Preskúšanie suspektných kolónií

morfológia kolónií (po 4-dňovej inkubácii):
ø 2-4 mm, okrúhle, hladké okraje, povrch hladký, lesklý
pozorovanie proti svetlu: priesvitné, svetlomedová farba
v odrazenom svetle: belavé až svetlosivé, slabo priesvitné

Subkultivácia suspektných kolónií na brucelovom agare (37 ^{o}C, 3 dni)

Katalázový test (pozitívny)
Farbenie podľa Grama (gramnegatívne krátke tyčinky)
Mikroskopické vyšetrenie stereomikroskopom: (6-20x zväčšenie), dôležitá paralelná pozitívna kontrola
Sklíčková aglutinácia s monošpecifickými A a M –antisérami
Aglutinácia s 0,1 % vodným roztokom akriflavínu