

# Elatusaineiden toimivuuden varmistamiseen käytettävien mikrobisuspensioiden (SkimMilk) valmistus

## 1. Periaate

Työohjeen tarkoittamat mikrobi (bakteeri)suspensiot ovat rasvattoman (kuoritun) maidon ja bakteeriviljelmän seoksia, joissa bakteerien lukumäärä on määritetty. Niitä voidaan hyödyntää mm. elatusaineiden kvantitatiivisessa laadunvarmistuksessa tai validointikokeissa (tarkasti määritetty bakteerilisäys).

Valmistettaessa suspensioita, bakteerikanta viljellään ensin tuoreeksi pakastusputkesta (vertailukannan ”stokkiputki”) ja siirrostetaan ei-selektiiviseen rikastusliemeen. Viljellyn rikasteen mikrobipitoisuus määritetään laimennossarjan ja maljaviljelyn avulla rikasteen odottaessa jääkaappilämpötilassa.

Kun selvillä on suspension tekoa varten sopiva laimennostaso ja maitoon siirrostettava tilavuus, tehdään jääkaapissa säilytetystä rikasteesta uusi laimennossarja. Laimennossarjan viimeinen laimennos (haluttu pitoisuus maitoputkissa) tehdään rasvattomaan maitoon.

Maitosuspensio pipetoidaan pakastusputkiin ja säilytetään -80 °C:ssa. Näin valmistetut maitoampullit säilyvät stabiileina bakteerilajista riippuen yleensä vuoden (Schijven ym. 1994).

Kuvattu menettely ei sellaisenaan sovi tiettyjen pakastamisen kannalta herkkien bakteerilajien kuten *Campylobacter* ja *Clostridium* säilyttämiseen. *Campylobacter*suspensioiden valmistus ja pakastus on ohjeistettu tässä ohjeessa erikseen.

## 2. Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskennellessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

Valmistettaessa suspensioita STEC-kannoista noudatetaan lisäksi toimintaohjetta LAB 741.

### 3. Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Pakastin -80 °C
- 3) 4 ± 2 °C jääkaappi
- 4) Lämpökaapit 25 °C±1 °C, 30 °C±1 °C, 37 °C±1 °C, 44 °C±1 °C riippuen bakteerin kasvuvaatimuksista
- 5) DiluShaker

### 4. Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Veriagar tai TSA-agar
- 2) TSB-, BHI- tai BPW-liemi (bakteerin kasvuvaatimuksista riippuen voidaan korvata myös jollain muulla ei-selektiivisellä rikastusliemellä, esim. kampylobakteereille BRULIE)
- 3) 9 ml peptoni-suolaliuos (PEPSU) tai 9 ml Dilucup
- 4) rasvaton (kuorittu) maito (skim milk) 20 %, (Skim milk liuos, 20 %) 50/100 ml
- 5) 2,0 ml pakastusputket

### 5. Suoritus

Alla oleva ohje soveltuu suurimmalle osalle mikrobikantoja. Kampylobakteerisuspensioiden valmistus on kuvattu tämän työohjeen kohdassa 6.

#### Päivä 0

1. Tee pakkasstokista puhtasviljelmä verimaljalle tai TSA:lle ja inkuboi kannalle sopivassa, menetelmäohjeen mukaisessa lämpötilassa 18–24 h. Viljeltyjä maljoja saa käyttää vain mikrobisuspensioiden valmistukseen.

#### Päivä 1

2. Siirrosta bakteeripesäke 1 µl silmukalla 10 ml:aan ei-selektiivistä rikastuslientä (TSB, BHI tai BPW) ja inkuboi kuten edellä. Bakteerin kasvuvaatimuksista riippuen voidaan korvata myös jollain muulla valikoimattomalla rikastusliemellä, esim. kampylobakteereille BRULIE (kohta 6).

#### Päivä 2

3. Tee liemestä laimennossarja -8 asti (tai bakteerin tunnetun kasvun mukaan) ja viljele kolmesta suurimmasta peräkkäisestä laimennoksesta 0,1 ml, jolloin määrä maljoilla vastaa laimennoksia -7, -8 ja -9. Viljele laimennokset kahdelle rinnakkaiselle maljalle (TSA/veriagar). Säilytä liemiviljelmä 4 ± 2 °C:ssa siihen asti, kunnes viljelyn tulos on selvillä.

Inkuboi kannalle sopivassa, menetelmäohjeen mukaisessa, lämpötilassa bakteerista riippuen 24 tai 48 h.

### Päivä 3

1. Määritä rikastusliemen pitoisuus laimennossarjasta tehtyjen maljojen perusteella.
  2. Saadun tuloksen perusteella määritetään sopiva laimennos, jolla rikastusliemestä voidaan valmistaa halutun vahvuinen maitosuspensio.
- Elatusaineiden **tuottavuustestauksen testikannat**: 60–100 pmy/0,1 ml
  - Elatusaineiden **kvalitatiivinen, selektiivisyys- ja spesifisyystestaus**:  $10^4$  pmy/0,1 ml

Lisättävän rikasteen osuus saa olla maksimissaan 10 % maitosuspension kokonaistilavuudesta.

Laimennosten laskemiseen ja suspensioiden valmistamisen dokumentointiin käytetään lomaketta LAB 7497. Täytä lomake ja tulosta se työkirjaksi ja dokumentiksi.

4. Valmista maitosuspensio:

Tee rikastusliemestä uusi laimennossarja ja lisää edellä määritettyä laimennosta sopiva tilavuus. Pipetoitavan tilavuuden voi pyöristää lähimpään 10 µl:aan. Jos kannan tiedetään rikastuvan kylmäsäilytyksen aikana (esimerkiksi *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis*), tilavuuden voi pyöristää alaspäin lähimpään 100 µl:aan. Merkitse tekemäsi muutokset lomakkeelle LAB 7497.

5. Sekoita hyvin, ja jaa pakastettava maitosuspensioerä pakastusputkiin 1,5 ml:n eriin. Sekoita suspensioita pipetoinnin aikana silloin tällöin.
  6. Suspension pitoisuuden määrittämiseksi pipetoi TSA:lle/veriagarille
- Tuottavuustestaus (**60–100 pmy/0,1 ml**): viljele 0,1 ml suspensiota neljälle rinnakkaiselle maljalle.
  - Vahvat suspensiot ( **$10^4$  pmy/0,1 ml**): valmista suspensiosta laimennossarja  $10^4$  asti. Viljele laimennoksista -2, -3 ja -4 100 µl kahdelle rinnakkaiselle maljalle (maljalla -3, -4, -5).

Inkuboi kuten edellä (päivä 2).

7. Pakasta välittömästi  $-80\text{ °C}$ :een. Suspensio on pakastettava viimeistään 2 h kuluessa sen teon aloittamisesta, ja sitä on säilytettävä jääkaappilämpötilassa jos työ keskeytyy.

## Päivä 4

1. Laske valmistetusta mikrobisuspensiosta viljellyt maljat.

### Tulosten laskeminen

- - Tuottavuustestaus (**60–100 pmy/0,1 ml**): neljän maljan keskiarvo
  - 
  - Vahvat suspensiot (**10<sup>4</sup> pmy/0,1 ml**): laske suspension pitoisuus toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti. Huomaa, että laskemasi tuloksen yksikkö on pmy/1 ml. Muuta tulos pitoisuuteen pmy/100 µl jakamalla saamasi tulos 10:llä.
2. Merkitse maitosuspension toteutunut pitoisuus työpapereihin ja serverillä ylläpidettävään elatusainetestauksen mikrobisuspensioliistaan.

Kun tarvitset mikrobisuspensiota, sulata sitä huoneenlämmössä korkeintaan 30 minuuttia. Vaihtoehtoisesti sulata suspensiota yön yli jääkaapissa tai esim. +37 °C lämpökaapissa korkeintaan 30 minuuttia.

**Kvalitatiiviseen testaukseen** käytettäviä vahvoja suspensioita voi sulatuksen jälkeen säilyttää jääkaapissa ja käyttää samoja putkia työviikon ajan. Muihin tarkoituksiin käytettävät suspensiot sulatetaan ennen käyttöä kuten edellä.

## 6. Kamylobakteerisuspensioiden valmistus

### Päivä 1

Siirrosta bakteeripesäke 10 ml:aan brusella-lientä (BRULIE). Inkuboi 24 tuntia 37 °C:ssa mikroaerobisissa olosuhteissa.

### Päivä 2

Pipetoi 0,1 ml liemiviljelmää 30 ml:aan BHI-lientä. Lisää seokseen 3 ml steriiliä glyserolia (pitoisuuteen 10 %). Pakasta seos 1,5 ml:n erissä -80 °C:een. Kamylobakteerien määrä seoksessa vähenee pakastuksen yhteydessä huomattavasti. Tämän takia seoksen konsentraatio määritetään vasta pakastetusta suspensiosta.

### Päivä 3

Sulata kaksi putkea. Tee molemmista putkista laimennussarja 10<sup>-4</sup>:een ja viljele kaikki laimennokset kahdelle rinnakkaiselle verimaljalle viljelmän pitoisuuden määrittämiseksi. Odotettu pitoisuus on noin 10<sup>2</sup>–10<sup>3</sup> pmy/100 µl

Tulosten perusteella valitaan laimennustaso, johon sulatettu suspensio laimennetaan siten, että saadaan pitoisuudeksi 50–100 pmy /100 µl. Merkitse laimennosohje niihin työkirjoihin, joissa kamylobakteerisuspensioita tarvitaan.

Pakastetun seoksen konsentraatio pysyy muuttumattomana ainakin kuusi kuukautta.

## 7. Viitteet

**Schijven, J.F., Havelaar, A.H. ja Bahar, M.** 1994. A simple and widely applicable method for preparing homogenous and stable quality control samples in water microbiology. Applied and environmental microbiology: Nov. s. 4160-4162.

**SFS-EN ISO 11133:2014.** Elintarvike-, rehu- ja vesimikrobiologia. Kasvualustojen valmistus, tuotanto, säilytys ja toimivuuden testaus

**Niemelä, S.** HAMB1 220: Sisäisen vertailunäytteen valmistus. Pakastusmenetelmä. 18.10.1996.

## 8. Muutokset edelliseen versioon

- 11.9.2018 Poistettu maininta suspensioiden ELMO-kirjauksesta.
- 11.9.2018 Tarkennettu suspensioiden käyttökohteet ja muutettu Elatusaineiden kvalitatiivinen, selektiivisyys- ja spesifisyystestauksen konsentraatio  $10^5$  pmy/0,1 ml:sta  $10^4$  pmy/0,1 ml.
- 11.9.2018 Lisätty kampylobakteerisuspensioiden valmistusohje.
- 11.9.2018 Tarkennettu suspensioiden valmistusohjetta
- 15.11.2018 Tarkennettu ohjeen nimeä
- 15.11.2018 Tarkennettu pitoisuuksien laskemisen ohjeistusta
- 15.11.2018 Tarkennettu kampylobakteerisuspensioiden valmistusohjetta
- 15.11.2018 Pieniä korjauksia kieliasuun
- 4.11.2021 Lisätty mahdollisuus säilyttää kvalitatiiviseen testaukseen käytettäviä vahvoja suspensioita jääkaapissa ja käyttää työviikon ajan samoja putkia

14.12.2018 Ylätunniste päivitetty organisaatiomuutoksen (1.1.2019) mukaisesti. Tekninen päivitys.