

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikka

Säde Lindell

**Patogeenisten *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerien esiintyminen keitetyissä
äyriäisissä ja nilviäisissä**

Insinöörityö 18.4.2010

Ohjaaja: tutkija Marjaana Hakkinen

Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vaheri

Tekijä	Säde Lindell
Otsikko	Patogeenisten <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bakteerien esiintyminen keitetyissä äyriäisissä ja nilviäisissä
Sivumäärä	38 sivua
Aika	18.4.2010
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja	tutkija Marjaana Hakkinen
Ohjaava opettaja	yliopettaja Marja Vaheri
<p>Projektissa tutkittiin <i>Vibrio parahaemolyticus</i> –bakteerin esiintymistä Suomeen tuoduista esikeitetyistä kalastustuotteista, äyriäisistä ja nilviäisistä. Riittävän kauan ja riittävässä lämpötilassa tehtynä esikeittämisen on todettu olevan tehokas keino tuhota vibrioita. Tarkastelun aiheena olikin kalastustuotteiden hygieeninen käsittely esikeittämisen jälkeen sekä jakeluketjun aikana.</p> <p>Työssä oli tarkoituksena tutkia myös bakteerien lukumäärää mahdollisten <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -positiivisten näytteiden kohdalla. Positiivisille näytteille haluttiin saada toimiva PCR-menetelmä, jolla todettaisiin bakteerin virulenssigeenit TDH ja TRH.</p> <p>Kevään 2003 aikana projektiin saatiin 25 näytettä, joista tutkittiin <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bakteerin esiintymistä EELAn menetelmällä 3504. Kyseinen menetelmä oli validoitu vuotta aiemmin ja tässä työssä päästiin käyttämään menetelmää oikeilla näytteillä. Menetelmän todettiin soveltuvan hyvin monenlaisille äyriäis- ja nilviäisnäytteille.</p> <p><i>Vibrio parahaemolyticus</i> -positiivisia näytteitä ei tullut sinä aikana jona tein insinööriyötäni, joten bakteerien lukumäärää ei laskettu. Erikseen tilattujen kontrollikantojen avulla saatiin pystytettyä toimiva PCR-menetelmä <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bakteerin virulenssigeenien todentamiseksi.</p> <p>Insinööriyön lopputuloksena todettiin, että Suomessa myytävissä äyriäisissä ja nilviäisissä ei ole vaaraa <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bakteerin osalta. Kalastustuotteita tulee kuitenkin valvoa, sillä <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bakteeri on yleinen ruokamyrkytyksiä aiheuttava bakteeri muualla maailmassa.</p>	
Hakusanat	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , ruokamyrkytys, kontaminaatio, virulenssigeeni, TRH, TDH, PCR

Author	Säde Lindell
Title	Occurrence of pathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bacteria in pre-cooked shellfish and mollusc
Number of Pages	38
Date	18. April 2010
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor	Marjaana Hakkinen, Research Scientist
Supervisor	Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>The purpose of this final year project was to examine the occurrence of pathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i>-bacteria in shellfishes and molluscs sold in Finland. It is known that pre-cooking destroys vibrios when the cooking is done at the right temperature for the right amount of time. All the examined samples were pre-cooked. Purpose of this project was to find out if the handling of the fish products had been hygienic throughout the supply chain.</p> <p>If there had been <i>Vibrio parahaemolyticus</i>-positive samples, the plan was to count the number of bacteria by the statistical method, most-probable-number. The plan was to have a working method for finding the virulence genes of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>. These genes are known as TDH and TRH.</p> <p>A total of 25 samples were examined during the project. The method used for finding the pathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i>-bacteria was EELA 3504. This method was validated one year ago, and it was the first time that this method was used to examine real samples. The method was proven to work well with different kinds of shellfishes and molluscs.</p> <p>During this project there were no <i>Vibrio parahaemolyticus</i>-positive samples. The statistical method was not used. By ordering control bacteria, it was possible to make a working method for detecting the virulence genes TDH and TRH of the <i>Vibrio parahaemolyticus</i> bacteria.</p> <p>The results of this thesis show that there is no danger of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>-bacteria in the shellfishes and molluscs sold in Finland. It is, however, justified to control the fish products because <i>Vibrio parahaemolyticus</i>-bacteria is the cause of food poisoning in numeral cases throughout the world.</p>	
Keywords	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , food poisoning, contamination, virulence gene, TDH, TRH, PCR

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

1 Johdanto	5
1.2 Esikeitetyt äyriäiset ja nilviäiset.....	7
1.2.1 Kontaminaatiot.....	8
1.3 Yleistä vibrioista.....	9
1.3.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12
1.3.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bakteerin virulenssigeenit.....	13
1.3.2.1 Virulenssigeeni TDH.....	14
1.3.2.2 Virulenssigeeni TRH.....	14
2 Tutkimuksen erityispiirteet	15
3 Materiaalit ja menetelmät	15
3.1 Materiaalit.....	15
3.1.1 Reagenssilista.....	17
3.1.2 Varmistuskannat.....	20
3.2 Menetelmät.....	21
3.2.1 <i>Vibrio</i> -suvun osoittaminen elintarvikkeista.....	21
3.2.2 Oksidaasikoe.....	23
3.2.3 Gram-värjäys.....	24
3.2.4 Liikkuvuuden tutkiminen.....	24
3.2.5 API 20 E.....	25
3.4 PCR-menetelmä.....	25
3.4.1 PCR-reagenssit.....	26
4 Tulokset	27
4.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -bakteerin tulokset.....	27
4.3 PCR-menetelmän tulokset.....	29
5 Yhteenveto	31
Lähteet	32
Liitteet	34
Liite 1: Näytteiden tiedot ja tulokset.....	34

1 Johdanto

Tämä insinööri työ tehtiin Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitoksessa (jatkossa EELA), ja se oli osa EELAn ja Elintarvikeviraston yhteistä tutkimusprojektia, joka kuului EU-maiden yhteen sovitettuun valvontaohjelmaan. Tutkimusprojektissa tutkittiin maahantuotujen esikeitettyjen äyriäisten ja nilviäisten mikrobiologista laatua. Vantaan kaupungin elintarvikelaboratorion elintarvikehygieenikko hankki näytteet ja toimitti ne EELAan. *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeriin liittyvät tutkimukset tehtiin EELAssa ja mikrobiologiseen laatuun liittyvät tutkimukset Vantaan kaupungin elintarvikelaboratoriossa.

Tässä työssä tutkimuksen kohteena oli *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeri, sen esiintyminen maahantuoduissa esikeitetyissä äyriäisissä ja nilviäisissä, sen virulenssigeenien osoittaminen sekä mahdollisten positiivisten näytteiden kohdalla bakteerien kvantitatiivinen määrittäminen. Mahdollisten positiivisten näytteiden bakteerien lukumäärää tutkittiin menetelmällä, jossa lasketaan tilastollisesti bakteerien todennäköisin lukumäärä most probable number -menetelmällä (jatkossa MPN-menetelmä). Työn tarkoituksena oli myös pystyttää toimiva ja luotettava PCR-menetelmä *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin virulenssigeenien löytämiseksi; lämmönkestävää hemolysiiniä tuottava (thermostable direct haemolysin) eli TDH-geeni sekä lämpöherkkää hemolysiiniä tuottava (TDH-related haemolysin), eli TRH-geeni. Tutkimuksen oletettuna tarkoituksena oli kartoittaa mahdolliset jälkikontaminaatiot sekä niiden riskit äyriäisten ja nilviäisten osalta.

Yleistä EELAsta

EELA eli Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos on maa- ja metsätalousministeriön alainen tutkimuslaitos, joka palvelee mm. eläinlääkäreitä, elintarviketeollisuutta, viranomaisia, kuluttajia ja maataloustuottajia sekä muita eläinten omistajia.

Taulukko 1. EELAn tehtävät [1, s.4]

eläintautien tutkimus ja seuranta
eläintautien diagnostiikka
eläimistä saatavien elintarvikkeiden laadun ja turvallisuuden tutkimus
elintarvikkeiden kemiallinen ja mikrobiologinen analytiikka
eläimistä ihmisiin tarttuvien tautien eli zoonoosien tutkimus ja seuranta
vertailulaboratoriotointa
neuvontapalvelut
eläinten terveydenhuoltoa tukeva työ
riskinarviointi
eläinrokotteiden myynti

1.2 Esikeitetyt äyriäiset ja nilviäiset

Tässä työssä äyriäisillä ja nilviäisillä tarkoitetaan vedessä eläviä selkärangattomia kiduksilla hengittäviä kalastustuotteita.

Taulukossa 2 on listattu muutamia äyriäisiä ja nilviäisiä.

Taulukko 2. Esimerkkejä äyriäisistä ja nilviäisistä [2]

Äyriäisiä	Nilviäisiä
hummeri	osteri
katkarapu	sinisimpukka
taskurapu	kampasimpukka

Esikeittämisellä tarkoitetaan ruoan nopeaa keittämistä runsaassa nesteessä. Esikeittämistä voidaan kutsua myös ryöppäämiseksi. Esikeittämisen pituus vaihtelee sekunneista muutamiin minuutteihin. Äyriäisiä ja nilviäisiä esikeitetään yleensä muutamia minuutteja, kuitenkin siten, ettei niiden liha pääse kypsymään.

Euroopan Yhteisöjen komissio on antanut säännöksen mm. Espanjasta tuotavien simpukoiden esikeittämiseen [9]. Tämän säännöksen tarkoituksena on vähentää paralyyttisen simpukkamyrkytys (PSP) määrää nilviäisissä. Esikeittämisen on todettu vähentävän tätä myrkyä nilviäisissä siinä määrin, että ruokamyrkytysten riski pienenee huomattavasti.

Esikeittäminen on tehokas tapa estää myös *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin aiheuttamia ruokamyrkytyksiä, sillä *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeri tuhoutuu 60 °C:ssa 15 minuutissa tai keitetessä 95 °C:ssa (± 5 °C) 1 minuutin ajan. [4, 5; s. 101]. *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeri ei tuota toksiineja, joten äyriäisten ja nilviäisten esikeittäminen on hyväksyttävä käsittely ruokamyrkytysten välttämiseksi.

1.2.1 Kontaminaatiot

Kalastustuotteilla voi kontaminaatio eli saastuminen tapahtua prosessoinnin, pakkaamisen, varastoinnin, kuljetuksen, vähittäismyynnin tai ruoan valmistuksen aikana. Tässä tapauksessa, kun tuotteina olivat esikeitetyt äyriäiset ja nilviäiset, prosessoinnin eli keittämisen aikana tapahtuva virhe olisi voinut johtaa siihen, että bakteeri ei olisi kuollut. Liian lyhyt keittoaika tai liian kylmä keittovesi olisi voinut olla yksi mahdollinen syy sille, että bakteeria olisi jäänyt tuotteeseen, jolloin sen lisääntyminen olisi voinut olla mahdollista kuljetuksen ja varastoinnin aikana.

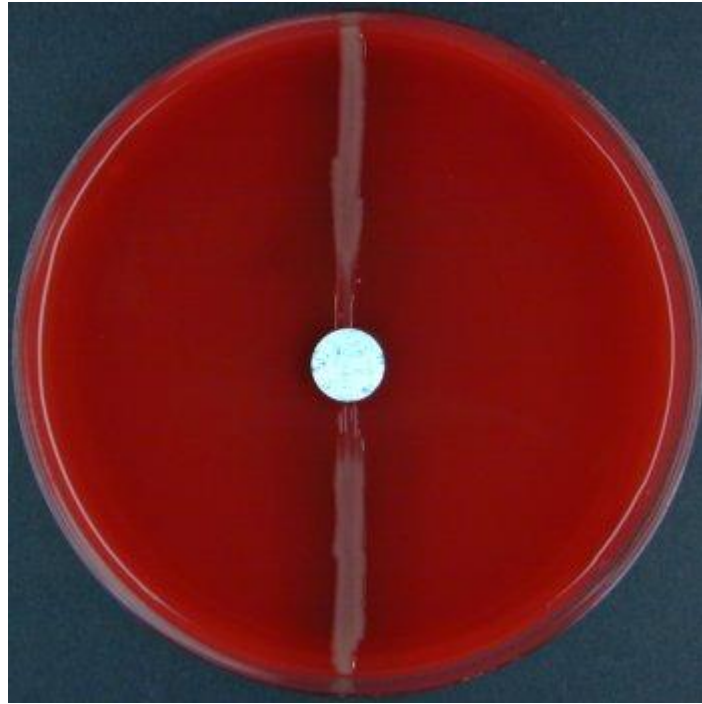
Saastuneiden äyriäisten tai nilviäisten säilytys yli 10 °C:ssa olisi voinut johtaa *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin lisääntymiseen nopeasti tuotteissa. Samoin ristisaastumisen mahdollisuus kalastustuotteita käsitellessä tai toisesta elintarvikkeesta olisi myös ollut mahdollista. Valmiiden tuotteiden ei tulisi olla kosketuksissa vielä käsittelemättömien tuotteiden kanssa. [4, 7]

Simpukoille ja ostereille joskus käytettävä puhdistustapa, jossa niitä seisotetaan puhtaassa vedessä, ei vähennä vibrioiden määrää tuotteissa. [5, s.101]

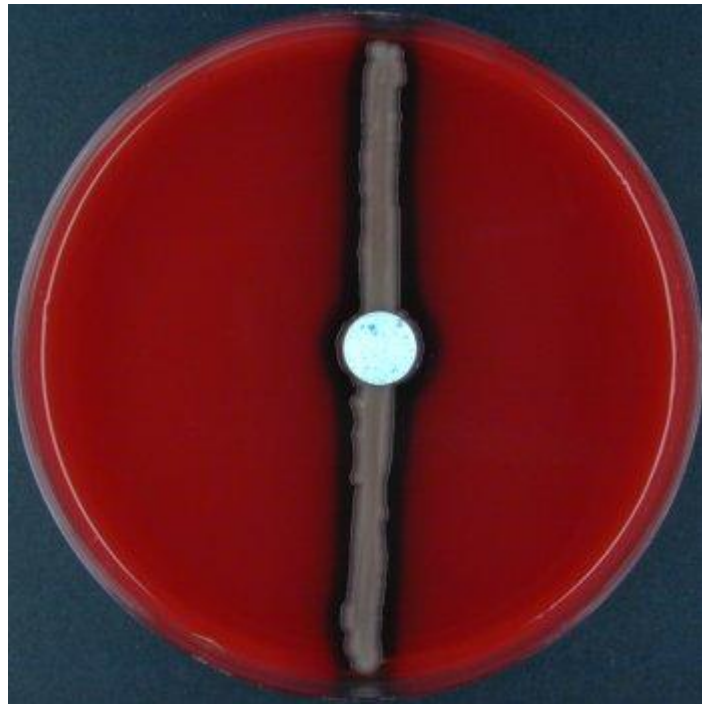
1.3 Yleistä vibrioista

Vibriot ovat fakultatiivisesti anaerobisia oksidaasipositiivisia suoria tai pilkunmuotoisia liikkuvia gram-negatiivisia sauvoja. Leveys on 0,5-0,8 µm, pituus 1,4-2,6 µm. Vibriot liikkuvat yhden tai useamman polaarisen flagellan avulla ja niillä on sekä respiratiivinen että fermentatiivinen metabolismi. Vibriot tuottavat D-glukoosista ja muista sokereista happoa, mutta eivät kaasua. Useimmat lajit fermentoivat maltoosia, D-mannoosia ja trehaloosia. Optimaalinen kasvulämpötila vaihtelee huomattavasti, kaikki kasvavat +20 °C:ssa, useimmat +30 °C:ssa. [11, s. 7, 25,75, 228, 229; 12, s. 13-14; 13, s. 192-193]

Natriumionit stimuloivat kaikkien lajien kasvua ja ovat ehdoton edellytys useimpien lajien selviytymiselle elinkykyisinä. Optimaalisin natriumin määrä on useimmilla lajeilla 3 %, mutta esimerkiksi *Vibrio cholerae* -bakteeri pystyy lisääntymään alhaisemmissakin natriumpitoisuuksissa. [13, s. 234-242] Useimmat lajit ovat herkkiä vibriostaattiselle agentille O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyli pteridiinille). Kuvissa 1–2 näkyy tämän vibriostaattisen agentin vaikutus sekä *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin kasvustoon että tälle agentille resistenssin *Aeromonas hydrophila* -bakteerin kasvustoon veriagarmaljoilla.



Kuva 1. Vibrio parahaemolyticus; herkkä vibriostaattiselle agentille O/129 [18]



Kuva 2. Aeromonas hydrophila; O/129 resistenti bakteeri [18]

Vibriot aiheuttavat maailmanlaajuisesti suurimman osan merenelävien välityksellä leviävistä sairauksista. Yleisesti tunnetuin vibrion aiheuttama yleisvaarallinen tartuntatauti, joka luokitellaan kansainväliseksi karanteenitaudiksi, on *Vibrio cholerae* -bakteerin aiheuttama kolera. Koleran voi saada saastuneesta juomavedestä tai ruoasta. Muita taudinaiheuttajina hyvin tunnettuja vibriolajeja ovat *Vibrio parahaemolyticus* sekä *Vibrio vulnificus*. Vibrio-sukuun kuuluvia bakteereita löydetään lähes kaikkialta maailmasta merenelävissä ja kaloissa.

Vibriot voivat esiintyä tilassa, jossa ne ovat elinkykyisiä, mutta niitä ei voida eristää normaaleilla mikrobiologisilla viljelymenetelmillä (Viable-non-culturable, VBNC). Vibriot voivat muuntua tällaiseen tilaan, jos niiden elinolosuhteet muuttuvat sellaisiksi, että lisääntyminen on vaarassa (esim. suolatasapainon tai lämpötilan vaihtelut). Tällöin bakteeri on elossa, mutta ei jakaudu tai lisäännä. Bakteerin metabolia on lähestulkoon pysähdyksissä, mutta tila on palautettavissa. Kun olosuhteet taas suosivat bakteerin lisääntymistä, palautuu bakteeri ennalleen ja se voidaan taas eristää normaaleilla viljelymenetelmillä. [17]

Vibrio-lajeja on löydetty yli 20, joista ainakin 12 aiheuttaa infektioita ihmisille. Näistä 12 patogeenisestä vibriosta kahdeksan on osoitettu olevan ruokamyrkytyksiä aiheuttavia. [11, s. 7, 25,75, 228, 229; 12, s. 13-14; 13, s. 192-193]

1.3.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus on Euroopassa ja USA:ssa harvinainen taudinaiheuttaja, mutta Japanissa se on tavallisin ruokamyrkytyksen aiheuttaja. Japanissa yli 70 % ruokamyrkytystapauksista on *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin aiheuttamia.

Vibrio parahaemolyticus -serotyyppejä tunnetaan yli 50. Kaikki serotyypit vaativat kasvaakseen suolaa. Bakterin optimisuolapitoisuus on 3 %, mutta kasvua on todettu 1-8 % suolapitoisuuksissa. Täysin suolattomassa vedessä bakteeri kuolee. Neutraali pH (pH 7) on *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerille optimaalisin vaihtoehto, mutta se pystyy lisääntymään melko laajalla pH-alueella. Happamissa olosuhteissa bakteeri kuolee, mutta emäksisyys ei vaikuta bakteerin lisääntymiskykyyn. pH-alue, jolla *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeri pystyy lisääntymään, vaihtelee pH 4,8:sta aina pH 11,00:een saakka. [13, s. 192-193]

Vibrio parahaemolyticus -bakteeria esiintyy merivesissä kaikkialla maailmassa, ja se on helposti eristettävissä rantavesistöistä, lietteestä, planktonista, useista kaloista ja äyriäisistä. *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeria esiintyy esimerkiksi kaikkialla USA:n rannikoilla. Suomessakin on löydetty kalastustuotteista *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeria, mutta sen aiheuttamia ruokamyrkytystapauksia ei aiemmin ollut todettu. Helmikuussa 2009 eristettiin intialaisista tuontikatkaravuista ruokamyrkytystapauksen aiheuttanut *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeri. Katkarapujen riittävä kuumentaminen olisi tappanut *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin, joten oletettavasti katkarapuja ei ollut kypsennetty riittävästi. [15, 16]

Vibrio parahaemolyticus -bakteerin aiheuttamat ruokamyrkytysoireet eivät yleensä vaadi hoitoa, ellei immuunivaste ole jostain syystä heikentynyt. Oireita ovat ripuli, vatsakivut, pahoinvointi, kuume, päänsärky ja vilunväristykset. Oireet ilmaantuvat yleensä 24 tunnin päästä kontaminoituneen elintarvikkeen nauttimisesta ja kestävät noin 3 päivää. [14, s. 13-14; 5, s. 98-101]

1.3.2 *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin virulenssigeenit

Viime vuosina on tutkittu *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin taudinaiheutusmekanismeja. Näissä tutkimuksissa on löydetty yhteys patogeenisuuden ja kahden virulenssigeenin välillä. Ruokamyrkytystapauksista eristetyillä kannoilla on löydetty molempia tai vain toista virulenssigeeniä, kun taas ympäristönäytteistä näitä hemolysiiniä tuottavia geenejä löydetään harvoin. [19]

Vain joko molempia tai jompaakumpaa virulenssigeeneistä sisältävät *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerikannat katsotaan patogeenisiksi. Park et al. vuonna 1998 tekemässä tutkimuksessa [19] tutkittiin 115:tä näytettä, joista suurimmassa osassa (81%) löytyi thermostable direct haemolysin -geeni eli TDH -geeni ja seitsemässä prosentissa molemmat hemolysiiniä tuottavat geenit.

1.3.2.1 Virulenssigeeni TDH

Vibrio parahaemolyticus -bakteerin taudinaiheutuskykyä tutkitaan Kanagawa (K) -reaktiolla. Kanagawa-positiiviset kannat tuottavat lämmönkestävää hemolysiiniä (thermostable direct haemolysin, TDH) tietyllä korkean suolapitoisuuden omaavalla alustalla, Wagatsuma agarilla. TDH-virulenssigeenin on oletettu aikaisemmin olevan primääristi yhteydessä ihmiselle patogeenisuuden kanssa. [19, 20]

1.3.2.2 Virulenssigeeni TRH

Kanagawa-negatiiviset kannat tuottavat lämpöherkkää hemolysiiniä (TDH-related haemolysin, TRH). Uusien tutkimusten myötä on todettu, että myös tällä virulenssigeenillä on yhteys patogeenisuuden kanssa.

Yhteistä näille molemmille virulenssigeeneille on ureaasin tuotto. Vain jommankumman tai molempien näiden geenien sisältämien *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerikantojen on todettu tuottavan ureaasia. Monissa tutkimuksissa on todettu tämän johtuvan siitä, että nämä hemolysiiniä tuottavat geenit (tdh tai trh) sijaitsevat hyvin lähellä *ure*-geeniä, joka koodaa ureaasia. [20]

2 Tutkimuksen erityispiirteet

Tässä tutkimuksessa mukana olleet näytteet olivat joko esikeitetyjä tai puolisäilykkeeksi luettavia äyriäisiä ja nilviäisiä. Tällä tavoin käsitellyiden tuotteiden kuuluisi olla melko riskittömiä ja vapaana epäpuhtauksista. Tämän tutkimuksen tarkoituksena olikin etsiä mahdollisia kontaminaatioita, joihin kalastustuotteiden vääränlainen käsittely voi johtaa. [8]

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Materiaalit

Sinä aikana, jona tein insinööriyötäni, toimitti Vantaan elintarvikelaboratorion laboratoriohygieenikko yhteensä 25 äyriäis- ja nilviäisnäytettä EELAan.

Tässä työssä tutkitut näytteet koostuivat pakastetuista ja tuoreista katkaravuista, simpukoista, jokiravuista, mustekaloista sekä äyriäissekoituksesta. Tässä työssä käsiteltyjen näytteiden tarkemmat tiedot ovat liitteenä 1 ja alla olevassa taulukossa 3 kerrottu näytteet.

Taulukko 3. Näytteet

Näyte	Pakastettuna (kpl)	Tuoreena (kpl)
Jokirapu	1	0
Katkarapu	14	1
Mustekala	0	1
Simpukka	5	2
Muu (äyriäissekoitus)	1	0

Vantaan kaupungin elintarvikelaboratorion laboratoriohygieenikko osti näytteet ensisaapumispaikoilta tai markkinoilta. Vantaan kaupungin elintarvikelaboratoriossa tehtyjä muita mikrobiologisia tutkimuksia varten laboratoriohygieenikko otti ensin aseptisesti osan näytteestä ja toimitti loput näytteestä EELAan. Pakastetut tuotteet toimitettiin pakastettuina -20 °C :n lämpötilassa, tuoreet tuotteet jääkaappilämpötilassa ($+7 - +10\text{ °C}$). Tuoreiden näytteiden käsittely aloitettiin viipymättä niiden saavuttua, pakastetuista näytteistä punnittiin aseptisesti tutkimukseen riittävä määrä ja sulatettiin jääkaapissa enintään 18 tunnin ajan ennen käsittelyn aloittamista. Näytteet kirjattiin lähetteen tietojen mukaisesti EELAn LIMS-tietojärjestelmään.

Yli jääneitä näytteitä säilytettiin, kunnes tulokset *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin osalta olivat valmiit. Tuoreita näytteitä säilytettiin jääkaapissa lämpötilaltaan $+7 - +10\text{ °C}$ ja pakastettuja näytteitä pakastimessa, jonka lämpötila oli -20 °C .

PCR-menetelmää varten tilattiin kahdesta eri laboratoriosta *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerikannat, joiden tiedettiin sisältävän virulenssigeenejä. Toinen kanta tilattiin ACC-laboratoriosta Ruotsista, toinen Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas) -laboratoriosta Englannista.

3.1.1 Reagenssilista

Elatusaineet

Alkalinen peptonivesi, suolapitoisuus 2 %

Hiivauute	3 g
Peptoni	10 g
Natriumkloridi	20 g
Tislattu vesi tilavuuteen	1000 ml

Autoklavoinnin jälkeen pH $8,6 \pm 0,2$ lämpötilassa $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pullotettiin ennen autoklavointia, autoklaavissa 15 min $+121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Suola – polimyksiini liemi, suolapitoisuus 2 %

Hiivauute	3 g
Tryptoni	10 g
Natriumkloridi	20 g
Tislattu vesi tilavuuteen	1000 ml

Liuetettiin ainesosat kuumentaen. Säädettiin pH niin, että lopullinen pH steriloinnin jälkeen on

$8,6 \pm 0,2$ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Autoklavoitiin 15 min $121\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.

Polimyksiini B lisättiin ennen käyttöä. Säilytys alle $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.

Suolaravintoagar

Käyttötarkoitus: patogeenisten vibrioiden eristys

Gelysate peptoni	5,0 g
Lihaekstrakti	3,0 g
NaCl	30,0 g
Agar	12,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Liuotettiin aineet 1 litraan tislattua vettä. Säädettiin pH.

Autoklavoitiin 121 °C:ssa 15 min. Jäähdytettiin n. 50 °C:ksi.

Tarkistettiin pH. Valetaan maljoiksi.

Naudan veriagar

Koostumus:

Kaseiinipeptoni	15,0 g
Soijapeptoni	5,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Agar	15,0 g
Tislattu vesi	1000 ml
Naudan sitraattiveri	50 ml

Valmistus: Liuotettiin 40 g kuivaelatusainetta 1 litraan tislattua vettä. Sekoitettiin huolellisesti. Autoklavoitiin 121 °C:ssa /15 min. Jäähdytettiin 45-50 °C:ksi. Lisättiin aseptisesti 50 ml naudan sitraattiveriä.

TCBS-tiosulfaatti-sitraatti-suola-sakkaroosi-agar

(Saa kaupallisena valmisteena)

Peptoni	10 g
Hiivauute	5 g
Natriumsitraatti	10 g
Natriumsulfaatti	10 g
Naudan sappi, kuivattu	5 g
Natriumdeoksikolaatti	3 g
Sakkaroosi	20 g
Natriumkloridi	10 g
Ferrisitraatti	1 g
Tynolinsininen	0,04 g
Bromtymolisininen	0,04 g
Agar	14 g
Tislattu vesi tilavuuteen	1000 ml

Liuetettiin kuumentaen. Säädettiin pH 8,6+-0,2 25 C:ssa.

Steriloitiin keittäen (ei autoklavoiden) 15 min.

Varmistuskokeiden reagenssit

Oksidaasireagenssi

N,N,N',N',-tetrametyyli-1,4-fenyleenidiamiini

(TMPD) 0,6 g

Askorbiinihappo 30 g

Vesi 70 ml

Suolavesi API 20 E -testiä, gram-värjäystä sekä liikkuvuutta varten

Natriumkloridi	20 g
Tislattu vesi	1000 ml

3.1.2 Varmistuskannat

Jokaisen näyte-erän yhteydessä viljelyiden rinnalla käytettiin EELAn omia neljää bakteerikantaa (taulukko 4). Näillä kontrollikannoilla varmistettiin kaikkien elatusaineiden sekä varmistustestien toimivuus vibrio-bakteereiden osalta.

Taulukko 4. EELAn kontrollikannat

Bakteeri	Numero
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	EELA 77
<i>Vibrio alginolyticus</i>	EELA 468
<i>Vibrio vulnificus</i>	EELA 473
<i>Vibrio cholerae</i>	EELA 471

Kuvassa 3 näkyy kontrollikantoina olleiden eri vibriolajien eroavaisuuksia selektiiviagarilla.



Kuva 3. Kontrollikannat TCBS-selektiiviagarilla. Ylhäältä vasemmalta: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* ja *Vibrio vulnificus*

3.2 Menetelmät

3.2.1 *Vibrio*-suvun osoittaminen elintarvikkeista

Tässä työssä käytettiin EELAn menetelmäohjetta 3504: Patogeenisten *vibrio*-suvun bakteerien osoittaminen elintarvikkeista. Tämä menetelmäohje on muunnos NMKL:n menetelmästä 156:1997: Patogeeniset *vibrio*-lajit. Osoittaminen ja lukumäärän määrittäminen elintarvikkeista.

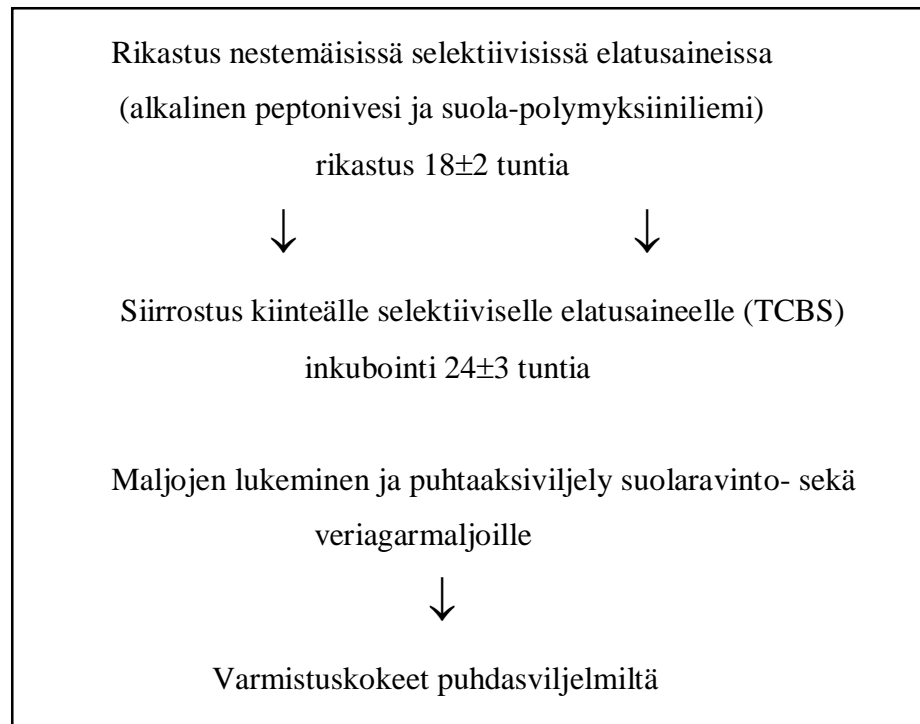
NMKL:n menetelmä 156:1997 patogeenisten *vibrio*-lajien osoittamiseksi elintarvikkeista soveltuu *Vibrio*

parahaemolyticus-, *Vibrio cholerae*-, *Vibrio vulnificus*- ja *Vibrio alginolyticus* -lajien osoittamiseen ja lukumäärän määrittämiseen elintarvikkeista. Molemmissa menetelmissä kvalitatiivinen osoittaminen tehtiin siirrostamalla 20 tai 25 g elintarviketta 250 ml:aan nestemäistä selektiivistä elatusainetta, inkuboinnin jälkeen viljeltiin nestemäiseltä elatusaineelta kiinteälle selektiiviselle elatusaineelle, epäilyttävät pesäkkeet jatkoviljeltiin ja tehtiin varmistustestit.

Rikastuslieminä tässä työssä käytettiin alkalista peptonivettä sekä suola-polymyksiiniliettä. Molempien rikastusliemien suolapitoisuus oli 2 %. Kiinteänä selektiivisenä elatusaineena käytettiin TCBS-agaria.

Tyypillisen näköisistä pesäkkeistä viljelyä jatkettiin suolaravintoagarille ja naudan veriagarille. Näin saaduista puhtasviljelmistä voitiin tehdä varmistustestit.

Kuvassa 4 on vielä selkeytetty työn kulkua.



Kuva 4. Työn kulku

3.2.2 Oksidaasikoe

Oksidaasireagenssia tiputettiin muutama tippa puhtaalla pipetillä puhtaalle suodatinpaperille. Kun reagenssi oli n. 15 sekuntia imeytynyt suodatinpaperiin, otettiin puhtasviljelmästä bakteerimassaa muoviseen siirrostussilmukkaan. Tätä bakteerimassaa levitettiin oksidaasireagenssin päälle, minkä jälkeen odotettiin muutama minuutti. Oksidaasiposiitiviset *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerit olisivat värjänneet oksidaasireagenssin violetiksi. Oksidaasinegatiivisilla bakteereilla tätä värinmuodostusta ei tapahdu.

3.2.3 Gram-värijäys

Reagenssit

Kristallivioletti

Puhdasta heksametyylipararosaniliinikloridia ($C_{25}H_{30}N_3Cl$)

Kaupallinen valmiste, maahantuoja IS-VET Oy

Safraniini

Tummanpunaista jauhetta (O: $C_{20}H_{19}ClN$)

Kaupallinen valmiste, maahantuoja Oriola Oy

Gram-värijäystä varten tehtiin bakteerisuspensio 2-prosenttiseen suolaveteen. *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin olisi kuulunut olla gram-negatiivinen. Bakteerisuspensio kiinnitettiin lasilevyyn kuumentamalla bunsenliekissä muutaman sekunnin ajan, kunnes kaikki vesi oli haihtunut. Tämän jälkeen värjättiin lasilevyllä oleva kuivatettu bakteerisuspensio kristallivioletilla, kiinnitettiin jodilla, poistettiin väri alkoholilla ja värjättiin safraniinilla. Varovaisen kuivauksen jälkeen nähtiin, oliko bakteeri gram-negatiivinen värin perusteella. Gram-negatiiviset bakteerit värjäytyvät vaaleanpunaisiksi.

3.2.4 Liikkuvuuden tutkiminen

Liikkuvuus tutkittiin tiputtamalla objektilasille muutama tippa 2-prosenttista suolavettä ja sekoittamalla suolavesitippaan siirrostussilmukalla bakteerimassaa puhtasviljelmästä. Objektilasi peitettiin peitinlasilla ja mikroskopoitettiin vaihevastakohtavalaistuksella. *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin olisi pitänyt olla liikkuva ja suoran sauvan muotoinen.

3.2.5 API 20 E

Testin tiedot :

Kaupallinen valmiste, valmistaja bioMerieux, Inc.

Biokemiallinen varmistus tyypillisiin pesäkkeisiin tehtiin kaupallisella valmiilla API 20 E –testillä. API 20 E –testi on identifioiva varmistustesti gram-negatiivisille sauvanmuotoisille bakteereille. Jokaisessa API 20 E –testiliuskassa on 20 mikrotestiä, joilla saadaan identifioitua vibrio-laji.

API 20 E -testiä varten tehtiin puhdasviljelmistä bakteerisuspensio 2-prosenttiseen suolaliuokseen siten, että suolaliuosta mitattiin 5 ml koeputkeen ja puhdasviljelmästä otettiin siirrostussilmukalla yksi erillinen pesäke, joka sekoitettiin suolaliuokseen. Pipetoitiin mikrotetit API 20 E –ohjeen mukaisesti ja inkuboitiin 35 – 37 °C:ssa 18 – 24 tuntia. Inkuboinnin jälkeen mikrotestien tulokset luettiin värireaktioista. Värireaktioiden perusteella API 20 E -tietokoneohjelmaan syötetyt tulokset antoivat tuloksen, joka kertoi, mikä vibrio-laji oli kyseessä.

3.4 PCR-menetelmä

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (Polymerase Chain Reaction) on menetelmä, jossa monistetaan DNA:ta keinotekoisesti koeputkessa. Tässä työssä PCR-menetelmää käytettiin *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin virulenssigeenien todentamiseksi.

Tässä työssä tehtiin kahdella eri esivalmistelulla PCR-ajoja. Toisessa esivalmistelussa soluja käsiteltiin suoraan

puhtaaksiviljelyiltä suolaravintoagareilta, toisessa soluja käsiteltiin kasvatusliemestä.

3.4.1 PCR-reagenssit

Kasvatusliemenä käytettiin alkalista peptonivettä, josta resepti sivulla 17.

Taulukossa 5 on resepti PCR Mastermixille. Vibrio Mastermix - pohja oli sama kaikille näytteille, näytteen tilalla oli joko ATCC - kanta, Cefas kanta tai EELAn kontrollikannat. Nollanäytteissä Mastermix pipetoitiin ilman näytettä PCR-geeliin.

PCR-vesi oli erityispuhdasta, steriiliä vettä, joka oli steriloitu ionivaihdetusta vedestä EELAssa. Alukkeet tilattiin Cefas laboratorion. 10X-puskuri, 4dNTP mix sekä DNA-polymeraasi olivat kaupallisia valmisteita, maahantuojana VWR International Oy.

Taulukko 5. Vibrio Mastermix -resepti

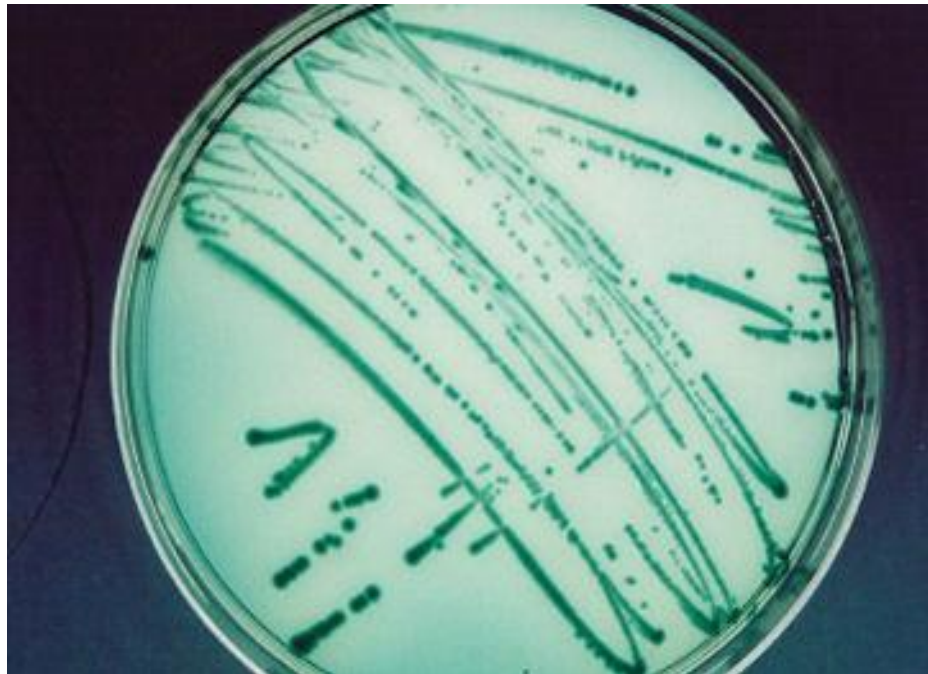
Vibrio Mastermix	määrä (ml)
PCR vesi	584 ml
10X puskuri	80 ml
100 µM aluke/primeri L-tdh	8 ml
100 µM aluke/primeri R-tdh	8 ml
100 µM aluke/primeri L-trh	8 ml
100 µM aluke/primeri R-trh	8 ml
10 mM 4dNTP mix	16 ml
2U/µl DNA polymeraasi	8 ml
näyte/DNA templaatti	5 ml

4 Tulokset

4.1 *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerin tulokset

Tutkituista 25 näytteestä yhdestäkään ei löytynyt *Vibrio parahaemolyticus* -bakteeria eikä muitakaan vibrio-suvun bakteereita.

Kuvassa 5 näkyy tyypillisiä *Vibrio parahaemolyticus* -pesäkkeitä TCBS-maljalla. Tyypillisen näköiset pesäkkeet olisivat olleet TCBS-maljalla sinivihreitä, läpimitaltaan 3-5 mm.



Kuva 5. *Vibrio parahaemolyticus* -bakteerikasvustoa selektiivisellä TCBS-agarmaljalla.

Tulokset ilmoitettiin seuraavasti: *Vibrio parahaemolyticus* ei todettu / 25 g näytettä. Taulukossa 6 on esitetty tulokset siten, kuin ne merkittiin työn kuluessa. Varmistuskannoille tehtiin jatkoviljelyt suolaravinto- sekä naudanveriagarille, joka näytererän yhteydessä. Näiltä puhtasviljelmiltä tehtiin varmistustestit

eli liikkuvuuden tutkiminen, gram-värjäys, oksidaasikoe sekä API 20 e –testi.

Taulukossa oleva ”jatkot 1-5” tarkoittaa siis pesäkkeitä, jotka viljeltiin puhtaksi suolaravinto -sekä naudanveriagarille, esimerkiksi EELA 77 T, jatkot 1-5. Tästä varmistuskannasta, joka oli viljelty alkalisesta peptonivedestä sekä suola-polymyksiiniliemestä selektiiviagarille, jatkettiin viidestä pesäkkeestä viljelyä suolaravintoagarille ja viidestä pesäkkeestä naudanveriagarille. Näistä puhdasviljelmistä tehtiin varmistustestit.

Taulukko 6. Tulosten esittäminen

	alkalinen peptonivesi	suola- polymyksiiniliemi
näyte nro	TCBS	
1	Et, ei jatkoja	Et, ei jatkoja
2	Et, ei jatkoja	Ek
3	Et, ei jatkoja	Ek
4	Et, ei jatkoja	Et, ei jatkoja
EELA 77	T, jatkot 1-5	T, jatkot 1-5
EELA 468	T, jatkot 1-5	T, jatkot 1-5
EELA 473	T, jatkot 1-5	T, jatkot 1-5
EELA 471	T, jatkot 1-5	T, jatkot 1-5

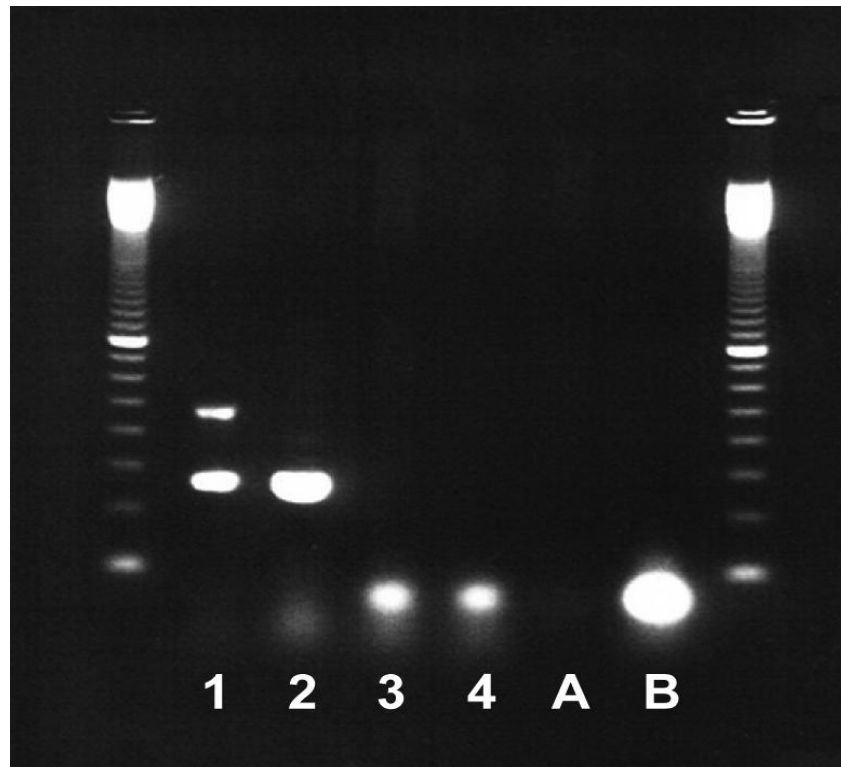
Et = epätyypillinen pesäke

Ek = ei kasvustoa

T = tyypillisen näköinen pesäke

4.3 PCR-menetelmän tulokset

PCR-menetelmä pystytettiin käyttäen erikseen tilattuja kontrollikantoja, joilla tiedettiin olevan virulenssigeenejä. ATCC kanta sisälsi molemmat virulenssigeenit ja Cefas kanta vain toisen virulenssigeeneistä. Menetelmällä saatiin hyvin näkymään molemmat geenit PCR-menetelmällä. Kannoista ei tiedetty, kumpaa virulenssigeeniä ne sisälsivät, eikä todettu tarpeelliseksi eritellä niitä. Kuvassa 6 näkyy, kuinka selkeästi geenit erottuvat kuvatulta PCR-geeliltä. Kontrollikantoina käytettiin EELAn vibriokantoja, joista tiedettiin, etteivät ne sisällä virulenssigeenejä.



Kuva 6. PCR-geeli kuvattuna. 1 = ATCC kanta 2 = Cefas kanta 3 = EELA 77 (*Vibrio parahaemolyticus*) 4 = EELA 468 (*Vibrio alginolyticus*) A = 1. nollanäyte B = 2. nollanäyte

Kuopassa 1 on ATCC kanta, jolla molemmat virulenssigeenit TDH ja TRH. Kuopassa 2 on Cefas kanta, jolla vain toinen virulenssigeeneistä. Kuopassa 3 on kontrollikanta EELA 77,

Vibrio parahaemolyticus, jolla ei ollut kumpaakaan virulenssigeeniä. Kuopassa 4 on kontrollikanta EELA 468, *Vibrio alginolyticus*, jolla ei myöskään kumpaakaan virulenssigeeniä. Kuopassa A on ensimmäinen nollanäyte. Tämä kuoppa jätettiin täysin tyhjäksi eli tähän ei pipetoitu mitään näytettä. Kuopassa B on toinen nollanäyte. Tähän kuoppaan pipetoitiin pelkkää *Vibrio Mastermix* -sekoitusta ilman näytetemplaattia.

5 Yhteenveto

Vibrio parahaemolyticus -bakteerin osalta selektiiviagarille olisi pitänyt kasvaa sakkaroosinegatiivisia helposti tunnistettavissa olevia, litteitä sinivihreitä pesäkkeitä. Varmistustesteistä olisi pitänyt tulla seuraava tulos: oksidaasiposiivisia, gram-negatiivisia suoria liikkuvia sauvoja. Pesäkkeiden viljelyä ei jatkettu, koska yhdestäkään tutkituista 25 näytteestä ei saatu tämän kaltaista tulosta.

Tutkimustuloksen perusteella voidaan sanoa, että kalastustuotteiden käsittely esikypsennyksen jälkeen oli ollut riittävän huolellista. *Vibrio*-bakteerit eivät olleet päässeet kasvamaan ja lisääntymään kalastustuotteissa.

PCR-menetelmä pystytettiin käyttäen erikseen tilattuja TDH- ja TRH-positiivisia kontrollikantoja. Negatiivisina kontrollikantoina käytettiin EELAlla jo valmiina olleita kantoja, joilla ei näitä genejä ollut.

Lähteet

1. Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos, esite. 2002
2. Äyriäiset ja nilviäiset. (WWW-dokumentti.) Evira.
<[- 8. Hakkinen, Marjaana, tutkija, Evira. Keskustelu huhtikuussa 2003
- 9. Komission päätös 1996. \(WWW-dokumentti.\) <\[- 11. Doyle, Michael; Beuchat, Larry; Montville, Thomas: *Food Microbiology , Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington D.C.,1997\]\(http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?mode=dbl&lang=fi&ihmlang=fi&lng1=fi,mt&lng2=bg,cs,da,de,el,en,es,et,fi,fr,hu,it,lt,lv,mt,nl,pl,pt,ro,sk,sl,sv,&val=343793:cs&page=>. Luettu 23.3.2010
10. Komission suositus virallista elintarvikkeiden tarkastusta koskevasta yhteen sovitetusta ohjelmasta vuodeksi 2003. Keitettyjen äyriäisten ja nilviäisten mikrobiologinen laatu. \(WWW-dokumentti.\) Evira.
<. Luettu 23.3.2010.
3. Hakkinen, Marjaana: <i>Vibrio parahaemolyticus</i> –tutkimus keitetyistä äyriäisistä ja nilviäisistä, EELAn sisäinen ohje, Helsinki 25.3.2003.
4. EELA Vuosikertomus 2001: Helsinki 2002
5. Opas elintarvikkeiden ja talousveden mikrobiologisista vaaroista: EVI-EELA julkaisu, Helsinki, 2003
6. ISO 8914:1990E: Microbiology – General guidance for the detection of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, International standard, 1990
7. Elintarvikkeiden saastuminen (kontaminaatio) ja pilaantuminen. (WWW-dokumentti.) Evira.
<<a href=)

12. Nester, Eugene; Roberts, C. Evans; Pearsall, Nancy; Anderson, Denise; Nester, Martha: Microbiology, A Human Perspective, 2nd Edition, WCB/McGraw-Hill, USA, 1998
13. Holt, John; Krieg, Noel; Sneath, Peter; Staley, James; Williams, Stanley: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition, Williams & Wilkins, USA, 1994
14. Rahkio, Marjatta; Korkeala, Hannu; Siitonen, Anja; Hatakka, Maija; Niemi, Veli-Mikko; Pakkala, Pekka: Ruokamyrkytys-epidemioiden selvitysoapas, Vammalan kirjapaino, 2000
15. Jättikatkaravut aiheuttivat ruokamyrkytyksen: YLE Uutiset, Kotimaa. 5.2.2009
16. Tiikerikatkaravuista löytyi vaarallista bakteeria. (WWW-dokumentti.) <<http://www.iltasanomat.fi/uutiset/kotimaa/uutinen.asp?id=1640951>> 5.2.2009
17. "Viable but Nonculturable Bacteria." World of Microbiology and Immunology. 2003. (WWW-dokumentti) <<http://www.encyclopedia.com>>. Luettu 13.4.2010
18. Sensitivity to O/129. (WWW-dokumentti.) <<http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showbio.asp?articleid=plade12>>. Luettu 13.4.2010
19. Lee, Chiayin, Pan, Shwu-Fen: Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction. Journal of General Microbiology, 1993. Vol. 139, s. 3225-3231.
20. Kaufman, G.E., Myers, M.L., Pass, C.L., Bej, A.K., Kaysner, C.A.; Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks. Letters in Applied Microbiology, 2002. Vol. 34, s. 155-161

Liitteet

Liite 1: Näytteiden tiedot ja tulokset



**ELÄINLÄÄKINTÄ- JA
ELINTARVIKETUTKIMUSLAITOS**

Bakteriologian tutkimusyksikkö
PL 45 (Hämeentie 57), 00581 Helsinki
Puh: 09 393 101 Fax: 09 393 1811

Sisäinen vastaus

1(1)

TUTKIMUSSELOSTE

HELSINKI
DN:o 27.3.2003/83, 1
E1 946-950



EELA/Bakteriologian
tutkimusyksikkö
MMM Hakkinen Marjaana
PL 45 (Hämeentie 57)
00581 HELSINKI

T014 (EN ISO/IEC 17025)

Tilaaaja: EELA/Bakteriologian tutkimusyksikkö, MMM Hakkinen Marjaana,
00581 HELSINKI

Omistaja: Vantaan kaupunkielintarvike- ja ympäristölab.,
Laboratoriohygieenikko E. Klemettilä-Kirjavainen, 01510 VANTAA

Näytteet: jokirapu, pakastettuna, 1 kpl
katkarapu, 1 kpl
mustekala, tuoreena, 1 kpl
simpukka, pakastettuna, 2 kpl

Saapumispvm: 27.3.2003
Tutk.aloituspvm: 27.3.2003

Tutkimuksen syy: EELA-EVI Vibrioprojekti 2003 / projekti nro 677

Tutkittu/menetelmä: Vibrioiden osoittaminen / NMKL 156:1997, muunnos (EELA 3504)

Tutkimustulos:

E1 946, mustekala, tuoreena, 2003-1056-1
Vibriot: ei todettu

E1 947, simpukka, pakastettuna, 2003-1056-2
Vibriot: ei todettu

E1 948, katkarapu, 2003-1056-3
Vibriot: ei todettu

E1 949, simpukka, pakastettuna, 2003-1056-4
Vibriot: ei todettu

E1 950, pakastettuna, jokirapu, 2003-1056-5
Vibriot: ei todettu

Edellä esitetyt tutkimustulokset pätevät ainoastaan tutkituille näytteille. Tutkimusselosteen saa kopioida vain kokonaan. Tutkimustuloksia tai muita tutkimusselosteen osia ei saa kopioida ja/tai julkaista ilman Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitoksen ja asianomaisen tutkijan kirjallista lupaa.

TUTKIMUSSELOSTE

HELSINKI
DN:o 31.3.2003/35, 1
E1 981-985



EELA/Bakteriologian
tutkimusyksikkö
MMM Hakkinen Marjaana
PL 45 (Hämeentie 57)
00581 HELSINKI

T014 (EN ISO/IEC 17025)

Tilaaaja: EELA/Bakteriologian tutkimusyksikkö, MMM Hakkinen Marjaana,
00581 HELSINKI
Omistaja: vantaan kaupunkielintarvike- ja ympäristölab., 01510 VANTAA
Näytteet: katkarapu, pakastettuna, 5 kpl
Saapumispvm: 31.3.2003
Tutk.aloituspvm: 31.3.2003
Tutkimuksen syy: EELA-EVI Vibrioprojekti 2003 / projekti nro 677
Tutkittu/menetelmä: vibrioiden osoittaminen / NMKL 156:1997, muunnos (EELA 3504)

Tutkimustulos:

E1 981, 1163-1(2), Eldorado isoja katkarapuja, vähittäismyyntipakkaus, parasta ennen 25.11.2003, valmistaja T-253 Norge
Vibriot: ei todettu

E1 982, 1164-2, Eldorado kuorittuja katkarapuja, parasta ennen 12.3.2004, valmistaja T-253 Norge
Vibriot: ei todettu

E1 983, 1168-1(2), Grönlantilaisia kuorellisia katkarapuja, merellä keitetty, pakkauspäivä 22.1.2003, parasta ennen 19.10.2003, valmistaja DK 60 EF
Vibriot: ei todettu

E1 984, 1172-2, Stella Polaris AS, pakkauspäivä, parasta ennen 11.2.2004, valmistaja T-299 Norge
Vibriot: ei todettu

E1 985, 1173-1(2), Rainbow kuorittu katkarapu, pakkauspäivä, parasta ennen 20.2.2004, valmistaja T-299 Norge
Vibriot: ei todettu

Edellä esitetyt tutkimustulokset pätevät ainoastaan tutkituille näytteille. Tutkimusselosteen saa kopioida vain kokonaan. Tutkimustuloksia tai muita tutkimusselosteen osia ei saa kopioida ja/tai julkaista ilman Eläinlääkintä- ja elintarvike tutkimuslaitoksen ja asianomaisen tutkijan kirjallista lupaa.

Bakteriologian tutkimusyksikkö
 PL 45 (Hämeentie 57), 00581 Helsinki
 Puh: 09 393 101 Fax: 09 393 1811

TUTKIMUSSELOSTE

HELSINKI
 DN:o 1.4.2003/80, 1
 E1 1002-1004



EELA/Bakteriologian
 tutkimusyksikkö
 MMM Hakkinen Marjaana
 PL 45 (Hämeentie 57)
 00581 HELSINKI

T014 (EN ISO/IEC 17025)

Tilaaaja: EELA/Bakteriologian tutkimusyksikkö, MMM Hakkinen Marjaana,
 00581 HELSINKI
 Omistaja: Vantaan kaupunki elintarvike- ja ympäristölaboratorio, 01510
 VANTAA
 Näytteet: katkarapu, pakastettuna, 3 kpl
 Saapumispvm: 1.4.2003
 Tutk.aloituspvm: 1.4.2003
 Tutkimuksen syy: EELA-EVI Vibrioprojekti 2003 / projekti nro 677
 Tutkittu/menetelmä: Vibrioiden osoittaminen / NMKL 156:1997, muunnos (EELA 3504)

Tutkimustulos:

E1 1002, 1164-1, Eldorado kuorittuja katkarapuja, parasta ennen 12.3.2004,
 valmistaja T-253 Norge
 Vibriot: ei todettu

E1 1003, 1168-1, Grönlantilaisia kuorellisia katkarapuja, pakkauspäivä 22.1.2003,
 parasta ennen 19.10.2003, valmistaja DK 60 EF
 Vibriot: ei todettu

E1 1004, 1172-1, Stella Polaris katkarapuja, pakkauspäivä, parasta ennen
 11.2.2004, valmistaja T-299 Norge
 Vibriot: ei todettu

Edeillä esitetyt tutkimustulokset pätevät ainoastaan tutkituille näytteille. Tutkimuslauseen saa kopioida vain kokonaan. Tutkimustuloksia tai muita tutkimuslauseen osia ei saa kopioida ja/tai julkaista ilman Eläinlääkintä- ja elintarvike tutkimuslaitoksen ja asianomaisen tutkijan kirjallista lupaa.

Bakteriologian tutkimusyksikkö
PL 45 (Hämeentie 57), 00581 Helsinki
Puh: 09 393 101 Fax: 09 393 1811

TUTKIMUSSELOSTE

HELSINKI
DN:o 15.4.2003/75, 1
E1 1291-1302



EELA/Bakteriologian
tutkimusyksikkö
MMM Hakkinen Marjaana
PL 45 (Hämeentie 57)
00581 HELSINKI

T014 (EN ISO/IEC 17025)

Tilaaaja: EELA/Bakteriologian tutkimusyksikkö, MMM Hakkinen Marjaana,
00581 HELSINKI
Omistaja: Vantaan elintarvike- ja ympäristölaboratorio, 01510 VANTAA
Näytteet: katkarapu, pakastettuna, 5 kpl
katkarapu, tuoreena, 1 kpl
simpukka, pakastettuna, 3 kpl
simpukka, tuoreena, 2 kpl
pakastettuna, 1 kpl
Saapumispvm: 15.4.2003
Tutk.aloituspvm: 15.4.2003
Tutkimuksen syy: EELA-EVI Vibrioprojekti 2003 / projekti nro 677
Tutkittu/menetelmä: Vibrioiden osoittaminen / NMKL 156:1997, muunnos (EELA 3504)

Tutkimustulos:

E1 1291, 1392-1, Keitetty kuorittu simpukka, parasta ennen 30.5.2004, valmistaja D
SH-EFB-031 CE
Vibriot: ei todettu

E1 1292, 1393-1, Kuorittu katkarapu, parasta ennen 7.2.2004, valmistaja FI F68052
EY
Vibriot: ei todettu

E1 1293, 1398-1, Scampin pyrstöt suolaliemessä puolissäilyke, parasta ennen
3.5.2003, valmistaja DK 4126 EF
Vibriot: ei todettu

E1 1294, 1401-1, Sinisimpukat suolaliemessä puolissäilyke, parasta ennen 3.5.2003,
valmistaja DK 4126 EF
Vibriot: ei todettu

E1 1295, 1402-1, Savustettuja sinisimpukoita suolaliemessä puolissäilyke, parasta
ennen 4.5.2003, valmistaja F09251EU
Vibriot: ei todettu

E1 1296, 1403-1, Jäämeren katkarapuja, keitetty, pakastettu, parasta ennen
21.8.2004, valmistaja T-181
Vibriot: ei todettu

E1 1297, 1404-1, Äyriäissekoitus (muskal, katkar, sinisimpu, venussimpu),
valmistuspäivä 22.8.2002, parasta ennen 22.8.2004, valmistaja TH 1007
Vibriot: ei todettu

Edellä esitetyt tutkimustulokset pätevät ainoastaan tutkituille näytteille. Tutkimusselosteen saa
kopioida vain kokonaan. Tutkimustuloksia tai muita tutkimusselosteen osia ei saa kopioida ja/tai
julkaista ilman Eläinlääkintä- ja elintarvike-tutkimuslaitoksen ja asianomaisen tutkijan
kirjallista lupaa.

E1 1298, 1405-1, vihersimpukka puolikuorella, keitetty, pakast., valmistuspäivä
30.10.2002, parasta ennen 30.10.2004, valmistaja PH 177
Vibriot: ei todettu

E1 1299, 1406-1, Kuorittu, pakastettu, keitetty katkaravut, valmistuspäivä, parasta
ennen 6.12.2003, valmistaja Norway T-299 EFTA
Vibriot: ei todettu

E1 1300, 1407-1, Keitetty, pakastettu sinisimpukka, valmistuspäivä, parasta ennen
12.3.2004, valmistaja SE 2059 Ey
Vibriot: ei todettu

E1 1301, 1408-1, Kuorittu, keitetty, pakastettu, suolattu katkar., valmistuspäivä,
parasta ennen 18.9.2004, valmistaja IS-05606
Vibriot: ei todettu

E1 1302, 1408-2, Kuorittu, keitetty, pakastettu, suolattu katkar., valmistuspäivä,
parasta ennen 18.9.2004, valmistaja IS-05606
Vibriot: ei todettu