

Salmonella. Osoittaminen elintarvikkeista.

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

NMKL 71:1999

(Puskuroitu 1 % peptonivesi / steriloitu tislattu vesi + brilljanttivihreä / kuorittu maito -ravintoliemi / puskuroidu 1 % peptonivesi + Triton X-100 / 37 °C / 16-24h, RVS 41,5 °C / 21-27 h XLD-agar 37 °C / 21-27 h ja Rambach- agar 37 °C / 24-48 h; L-lysiinidekarboksilaasiliemi, Urea- ja TSI-agarit, Brolacin-- agar 37 °C / 21-27 h, API 20E; vaihtoehtoisena varmistuksena Maldi-tof, serotyypitys)

- 1) Siipikarjanlihaa tutkittaessa esirikastusliemen määrä on 1000 ml:n sijasta 225 ml.
- 2) Siirrostettaessa RVS- ja MKTTn –rikasteita XLD- ja Rambach- agareille viljellään ”perämaljat”, mikäli matriisi/käsiala on sellainen, ettei erillispesäkkeitä saada.
- 3) Tyypillisiä pesäkkeitä ei viljellä puhtasviljelmiksi ravintoagarille varmistuskokeita varten, vaan suoraan TSI- ja urea- agareille, L-lysiinidekabroksilaasiliemiliemeen ja Brolacin- agarille, mikäli pesäkkeet kasvavat erillisinä
- 4) Selektiivisiltä maljoilta poimitaan viiden tyypillisen tai epäiltävän pesäkkeen sijasta aluksi yksi tai useampi tyypillinen tai epäiltävä pesäke jatkotutkimuksia varten (ISO 6579:2002)
- 5) Lysiinidekarkosilaasiliemi, urea- ja TSI-agar sekä API-testisarja voidaan korvata Maldi-tof analyysillä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu salmonellojen osoittamiseen elintarvikkeista.

3 Määritelmä(t)

Salmonellat ovat *Enterobacteriaceae*-heimon kuuluvia, gramnegatiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia, liikkuvia sauvabakteereita. *Salmonella* –suku jaetaan nykyisin kahteen lajiin, *S. enterica* ja *S. bongori*, ja laji *S. enterica* kuuteen alalajiin (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ja *indica*). Salmonelloja tunnetaan yli 2500 serotyypillä.

Salmonellat nimetään perinteisesti serotyypin mukaan, esim. *S. Typhimurium*. Täsmällisempi nimi tälle tyypille on *S. enterica* subsp *enterica* serovar *Typhimurium*. Salmonellat aiheuttavat erilaisia suolisto- ja yleisinfektioita sekä ihmisessä että eläimissä.

4 Periaate

Salmonellojen osoittaminen on nelivaiheinen:

Esirikastus. Tunnettu määrä näytettä esirikastetaan ei-selektiivisessä elatusaineessa (BPW). Esirikastus on välttämätön, koska näytteissä esiintyvät salmonellasolut voivat olla stressaantuneita tai vaurioituneita esimerkiksi kuumennuskäsittelyn, kuivatuksen, pakastuksen, sulatuksen ja/tai osmoottisen shokin vuoksi. Lisäksi salmonellojen pitoisuus näytteessä on yleensä pieni.

Rikastus. Tunnetut määrät esirikastettua näytettä siirretään selektiivisen rikastusliemen (RVS). Selektiivinen rikastus on tarpeen, koska näytteet voivat sisältää runsaasti esim. muita enterobakteereita, jotka vaikeuttavat salmonellan osoittamista.

Maljaviljely. Pieni määrä selektiivistä rikastetta levitetään kiinteille, selektiivisille elatusaineille (XLD ja Rambach), joilla salmonella voidaan erottaa muusta kasvusta tyypillisten pesäkkeiden perusteella.

Varmistus. Salmonellaksi epäiltyjä pesäkkeitä varmistetaan

- Maldi-tofilla
- biokemiallisesti (urea- ja TSI-agar sekä valinnaisena L-lysiinidekarboksilaasiliemi).
Lisävarmistukset tehdään biokemiallisesti (kaupallinen tunnistustestisarja, API 20E) ja serologisesti (omnivalentti tai polyvalentit antiseerumit).

Salmonellaksi epäillyt varmistetut viljelmät lähetetään Eviran Eläintautibakteriologian tutkimusyksikköön Kuopioon serotyypitystä varten.

5 Mahdolliset virhelähteet

Salmonella voi olla vaikeasti osoitettavissa, mikäli näyte on ollut pitkään lämpimässä ennen tutkimusta (kuljetuslämpötila noussut) ja/tai viipynyt useita päiviä matkalla laboratorioon.

Ristikontaminaatio näytteiden välillä tai laboratorion kontrollikannan kanssa on mahdollinen. Virhepositiivinen tulos voi johtaa hyvin suuriin taloudellisiin seurauksiin, joten huolelliseen laboratoriotyöskentelyyn ja asianmukaisten välineiden käyttöön on kiinnitettävä erityistä huomiota.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan työturvallisuutta koskevaa toimintaohjetta LAB 223.

Työturvallisuuden kannalta on otettava huomioon, että menetelmällä on mahdollista osoittaa osa *Salmonella* Typhi ja Paratyphi –kannoista. Tosin niitä esiintyy elintarvikkeissa erittäin harvoin.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) 37 ± 1 °C lämpökaappi
- 3) $41,5 \pm 0,5$ °C lämpökaappi
- 4) Maldi-tof Biotyper, Bruker

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Puskuroitu 1 % peptonivesi (BPW/PPV), yleensä 225 ml (+ Triton X)
Kuurittu maito-ravintoliemi, 225 ml
- 2) Rappaport-Vassiliadis-soijapeptoni (RVS)- rikastusliemi, yleensä 10 ml
- 3) Ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti-agar (XLD)
- 4) Rambach-agar
- 5) Brolacin-agar
- 6) Triple sugar iron-agar (TSI)
- 7) Urea-agar
- 8) L-lysiinidekarboksilaasiliemi
- 9) O-antiseerumi, omnivalentti, Mast Group
- 10) API 20E tai API Rapid 20E, BioMérieux
- 11) HCCA-annospakattu (syano-4-hydroksikanelihappo), Bruker Daltonik GmbH
- 12) Ultrapuhdas vesi
- 13) Deionisoitu, steriili vesi
- 14) Asetonitriili
- 15) Etanoli 99,6 %
- 16) 70% FA (muurahaishappo)
- 17) Standardi (Bruker Bacterial Test Standard, BTS)

9 Kontrollikannat

Kontrollikantana käytetään Suomessa harvinaista serotyyppiä *Salmonella* Abony 519 (NCTC 6017) mahdollisten ristisaastumisten havaitsemiseksi.

Ristisaastumismahdollisuuden vuoksi kontrollikantojen rutiininomaista käyttöä näytteiden rinnalla ei suositella.

10 Näytteen esikäsittely

Näytteet eivät tarvitse erityistä esikäsittelyä (ks. kohta näytteenotto esirikastusta varten).

11 Suoritus

Näytteiden tutkiminen aloitetaan niiden saapumispäivänä. Jos näytteitä ei pystytä tutkimaan heti tai tutkimus voidaan siirtää myöhempään ajankohtaan, näytteet säilytetään yksiköiden toimintaohjeiden mukaisesti. Hylkäyksestä päättää tällöin vastaava tutkija.

11.1 Näytteenotto esirikastusta varten

Puskuroidun peptoniveden on oltava huoneenlämpöistä ennen kuin siihen siirrostetaan näyte.

Tutkittava näytemäärä on yleensä 25 g ja esirikastusliemen (puskuroitu peptonivesi) tilavuus 225 ml (laimennussuhde 1:10).

Mikäli näytemäärä on jokin muu kuin edellä mainittu, on esirikastusliemen tilavuus valittava siten, että näytemäärän suhde esirikastusliemen tilavuuteen on 1:9 (eli näyte laimenee suhteessa 1:10 = yksi osa näytettä + yhdeksän osaa esirikastuslientä).

Näyte sekoitetaan hyvin ja siitä punnitaan 25 g:n näyte steriiliin astiaan, johon lisätään 225 ml puskuroitua peptonivettä (BPW). Näyte voidaan myös punnita suoraan astiaan, jossa on valmiiksi annosteltu esirikastusliemi.

Nestemäinen näyte sekoitetaan rikastusliemeen ravistelemalla, kiinteä näyte homogenoidaan.

11.1.1 Raaka siipikarjanliha

Jos tutkittavana on pakastettu ruho, poista se pakkauksestaan ja siirrä aseptisesti Stomacher 3500 -pussiin. Anna ruhon sulaa jääkaapissa enintään vuorokauden ajan. Jos tutkit tuoreita, paloiteltuja ruhonosia, punnitse niitä sovittu määrä (yleensä n. 500 g) Stomacher 3500 -pussiin. Lisää pussiin 225 ml puskuroitua peptonivettä. Ravistele voimakkaasti kolmen minuutin ajan niin, että peptonivesi huuhtelee koko ruhon tai paloitellut ruhonosat. Nosta näyte pois pussista. Inkuboi koko nestemäärä tai dekantoi steriiliin esi-inkubointiastiaan sopiva määrä (vähintään 100 ml).

11.1.2 Muu raaka kokoliha

Leikkaa lihan pinnasta useasta kohdasta yhteensä 25 g näytettä 225 ml:aan puskuroitua peptonivettä. Sekoita ravistamalla näyteastiaa tai Stomacher- pussia kevyesti. Jos tutkittavana on pakastettu näyte, sitä voidaan joko sulattaa jääkaapissa enintään vuorokausi tai siitä voidaan ottaa näyte jäisenä, mikäli tutkimus on kiireellinen.

11.1.3 Kuivamaitotuotteet

Punnitse 25 g näytettä 225 ml:aan puskuroitua peptonivettä. Älä sekoita, vaan annaastian seistä huoneenlämmössä 60 ± 10 min. Ravistele astiaa sen jälkeen niin, että näyte liukenee kokonaan.

11.1.4 Yrtit, mausteet ja elintarvikkeet, joissa on vahvasti turpoavia aineita

Normaalin laimennussuhteen 1:10 sijasta voidaan käyttää esim. laimennussuhdetta 1:100, jotta voidaan eliminoida kasvua estävien ainesosien vaikutusta ja pystytään homogenoimaan näyte hyvin.

11.1.5 Kaseiini, juusto

Punnitse 25 g näytettä Stomacher-pussiin. Lisää osa esilämmitetystä (noin 40 °C) puskuroidusta peptonivedestä (225 ml) pussiin. Sekoita Stomacher-homogenisaattorilla, kunnes näyte on liennut (1 - 3 minuuttia). Kaada seos takaisin esirikastusastiaan tai vaihtoehtoisesti lisää loput puskuroidusta peptonivedestä Stomacher-pussiin.

11.1.6 Voi, margariinit, öljyt, jäätelöt, jäädyykkeet

Punnitse 25 g:n näyte esilämmitettyyn puskuroituun peptoniveteen (noin 40 °C). Ravista. Siirrä lämpökaappiin (37 °C) ja ravista tunnin kuluttua.

11.1.7 Kaakaota sisältävät tuotteet

Sekoita 25 g:n näyte 225 ml:aan kuorittu maito-ravintolientä. Jos tutkit suklaata, esilämmitä liemi n. 40 °C:een lämpötilaan.

11.1.8 Kookos ja vastaavat hyvin rasvapitoiset tuotteet

Sekoita 25 g:n näyte 225 ml:aan puskuroitua peptonivettä. Lisää sen jälkeen 2-3 tippaa Triton X-100, joka vähentää rasvaisten tuotteiden esirikastusliemeen aiheuttamaa pintajännitystä.

11.1.9 Happamat tuotteet

Varmista, että pH ei laske esirikastuksen aikana alle 4,5:n.

11.2 Esirikastus

Inkuboi esirikastusliemiä 37 ± 1 °C / 16 – 24 h.

Esirikaste voidaan siirtää inkuboinnin jälkeen jääkaappiin (2-8 °C) enintään 72 tunniksi, mikäli rikastusta ei voida välittömästi jatkaa (Nilsson ja Peterz, 1992).

11.3 Rikastus

Lämmitä rikastusliemi (RVS) inkubointilämpötilaan ennen siirrostamista. Mikäli esirikaste on ollut jääkaapissa (esim. viikonloppu katkaisee työt), inkuboi sitä 37 ± 1 °C / 2 h ennen rikastusliemeen siirrostamista suuren lämpötilavaihtelun välttämiseksi.

Sekoita esirikaste kevyesti. Siirrosta siitä 0,1 ml 10 ml:aan RVS-lientä. Vaihtoehtoisesti siirrostus voidaan tehdä sekoittamatta esirikastetta, läheltä esirikasteen pintaa.

Sekoita RVS-liemi siirrostuksen jälkeen putkisekoittajalla. Inkuboi lämpökaapissa $41,5 \pm 0,5$ °C / 21 - 27 h.

RVS-rikaste voidaan siirtää inkuboinnin jälkeen jääkaappiin (2-8 °C) enintään 72 tunniksi, mikäli sitä ei voida välittömästi viljellä maljoille (D'Aoust et al., 1983, Nilsson ja Peterz, 1992).

11.4 Viljely agarmaljoille

Sekoita RVS-rikaste. Siirrosta siitä silmukallinen (10 µl) XLD ja Rambach- agareille hajotusviljelmäksi siten, että saadaan selvästi erillisiä pesäkkeitä. Vaihtoehtoisesti siirrostus voidaan tehdä sekoittamatta rikastetta, läheltä rikasteen pintaa.

Jotta saadaan selvästi erillisiä pesäkkeitä, voidaan RVS-rikasteesta viljellä kahdelle pienelle XLD- ja Rambach- maljalle peräkkäin. Jälkimmäinen malja on ns. perämalja, joka viljellään samalla silmukalla, jolla on viljelty ensimmäisen maljan viimeinen sektori, kastamatta silmukkaa uudelleen rikasteeseen. Perämaljan viljelyn tarpeellisuus arvioidaan matriisin ja siirrostajan käsialan mukaan.

Kylmäsäilytyksessä olleesta RVS-rikasteesta viljellään maljoille samoin kuin suoraan lämpökaapista otetusta rikasteesta.

Mikäli selektiiviset maljat osuvat viljeltäväksi viikonloppu- tai pyhäpäivää edeltävänä päivänä, ne voidaan siirtää viljeltyinä jääkaappiin (2-8 °C) enintään 48 tunniksi ja nostaa

sieltä lämpökaappiin, jos halutaan, että ne ovat tuoreina luettavissa seuraavana työpäivänä.

Inkuboi XLD- ja Rambach- maljoja 37 ± 1 °C / 21 - 27 h. Inkuboituja maljoja voidaan säilyttää jääkaapissa 1-3 vrk ennen niiden lukemista.

11.5 Maljojen lukeminen

11.5.1 XLD

Tyypillinen salmonellapesäke on punertava, läpinäkyvä ja sillä on musta keskusta. Lähes aina (erityisesti voimakkaan salmonellakasvun yhteydessä) on nähtävissä pesäkkeitä ympäröivässä elatusaineessa laajempi tai kapeampi vaaleanpunainen tai punainen vyöhyke. Rikkivetynegatiiviset salmonellat (esim. *S. Paratyphi A*) kasvavat punertavina / vaaleanpunaisina pesäkkeinä ja niillä on tummempi, vaaleanpunaisesta oranssiin vivahtava keskusta. Laktoosipositiiviset salmonellat ovat keltaisia ja niillä voi olla musta keskusta (rikkivetypositiiviset). Sekä rikkivetynegatiiviset että laktoosipositiiviset kannat ovat harvinaisia.

11.5.2 Rambach

97-99% salmonelloista kasvavaa Rambach-agarilla kirkkaanpunaisina pesäkkeinä. *S. Typhi* ja *S. Paratyphi* muodostavat kuitenkin värittömiä pesäkkeitä.

12 Varmistuskokeet

Tyypilliset/epäillyt pesäkkeet varmistetaan vaihtoehtoisesti:

Maldi-tofilla

- a) perinteisin biokemiallinen (TSI- ja urea- agar ja lysiinidekarboksylaasiliemi; sopiva kaupallinen tunnistustestisarja kuten API 20E) ja serologisin menetelmin (polyvalentit antiseerumit).

Lopullinen varmistus ja serotyypitys tehdään menetelmäohjeen Evira 6004 mukaisesti Eviran Kuopion toimipaikassa.

12.1 Maldi-tof -ajo

Varmista pesäkkeet Maldi-tof -ajolla suoralla siirrostuksella työhohjeen LAB 7085 mukaisesti kolmena rinnakkaisena näytespotina.

Tuloksen luotettavuutta arvioitaessa kiinnitetään huomiota score-arvoihin. Tuloksista tarkastellaan sekä parasta tunnistusta (best match) että toiseksi parasta (second best match). Kanta lähetetään Eviran Kuopion yksikköön serotyypitettäväksi mikäli jompikumpi tunnistus antaa tulokseksi "*Salmonella sp*" score-arvon ollessa vähintään 1,700 (vihreä tai keltainen värikoodi).

Mikäli ajon tulos on kannan **kaikilla** näytespoteilla "**no peaks found**", tee kannalle pikauutto Maldi-levyn spotilla: bakteerimassa + 1 ul 70% FA -> kuivaus + 1 ul matriisi. Mikäli tämänkin tulos on "no peaks found" kanta ei ole salmonella.

Maldi-tof ajo voi antaa tulokseksi "**not reliable identification**". Tähän voi olla kaksi syytä. Muodostettu spektri on lukukelpoinen, mutta vastaavuus kirjastoon ei ole ollut riittävä. Score-arvo jää tuolloin matalaksi välille 0,000 – 1,699 eikä tunnistus enää onnistu. Toinen vaihtoehto on, että spotti on teknisesti huonolaatuinen. Mikäli spotille saadaan "**not reliable identification**" –tulos **joko** best match- **tai** second best match-sarakkeeseen, katsotaan spottikohtainen 10 parhaimman ranking-listaus. Mikäli listalla on *Salmonella sp.*, tee kannalle pikauutto Maldi-levyn spotilla: bakteerimassa + 1 ul 70% FA -> kuivaus + 1 ul matriisi. Mikäli tulos on edelleen "**not reliable identification**", mutta 10 ranking-listalla ei ole salmonellaa, kanta ei ole salmonella. Mikäli listalla on edelleen salmonella, kanta tulkitaan salmonellaepäilyksi ja jatkovarmistetaan serotyypityksellä.

Tarvittaessa varmistusmenettelyä voidaan täydentää ennen serotyypitystä ISO 6579:n mukaisilla varmistuksilla, esimerkiksi Omnivalentilla tai OBIS-testillä.

Siirrosta Maldi-tof ajon salmonellaksi epäilty pesäke hajotusviljelmä selektiiviselle maljalle serotyypitykseen lähetettäväksi.

12.2 Perinteinen biokemiallinen varmistus ja jatkovarmistukset

12.2.1 Urea- ja TSI-agar, L-lysiinidekarboksilaasiliemi ja selektiivinen agar

Valitse sekä XLD- että Rambach-maljoilta yksi tyypillinen tai epäilty, erillään kasvava pesäke jatkotutkimuksiin.

Jos valitut pesäkkeet eivät osoittaudu salmonellaksi, ota neljä pesäkettä lisää jatkotutkimuksiin.

Mikäli maljalla on havaittavissa tyypillisiä tai epäiltyjä pesäkkeitä, mutta ne eivät kasva erillisinä, viljele pesäkkeistä selektiiviselle agarille jatkoviljelmät siten, että saat erillisiä pesäkkeitä. Tee varmistuskokeet erillispesäkkeistä.

Viljele samasta erillispesäkkeestä (esim. 1 µl:n silmukalla) ensin **urea**-agarille pintaviljelynä ja **TSI**-agarille pinta- sekä pistoviljelynä, sitten lysiinidekarboksylaasiliemeen ja lopuksi **Brolacin**-agarille tai **XLD**- tai **Rambach** –agarille hajotusviljelynä. Brolacin-agarin käyttö nopeuttaa serotyyppitystuloksen valmistumista. Lysiinidekabroksilaasiliemi peitetään viljelyn jälkeen steriilillä mineraali- tai paraffiiniöljyllä. Huom. pesäkettä kosketetaan vain kerran, ei jokaisen viljeltävän elatusaineen jälkeen. Inkuboi 37 ± 1 °C / 21-27 h.

Urea-agar

Salmonella ei hydrolysoi ureaa, joten elatusaineen väri säilyy keltaisena.

TSI-agar

Salmonella käyttää glukoosia, mutta ei laktoosia eikä sakkaroosia, sekä pelkistää sulfaattia sulfidiksi, joka saostuu alustassa mustana rautasulfidina. Tyypillinen TSI-agarviljelämä on alkaalinen (punainen) vinopintaosaltaan. Putken alaosa ja/tai keskiosa on hapan (keltainen) ja rautasulfidin muodostus näkyy mustuvana renkaana piston ympärillä (noin 90 % tapauksista). Voimakas rautasulfidin muodostus voi muuttaa putken koko alaosan mustaksi. Tällöinkin keltaisen värin voi yleensä erottaa putken pohjassa ja/tai keskiosassa valoa vasten katsottaessa. Putkessa on todettavissa kaasunmuodostusta, joka havaitaan agarin halkeilemisena tai ilmakuplina agarissa

Kannat, jotka eivät pelkistä sulfaattia sulfidiksi, eivät muodosta mustaa väriä TSI-agiin. Tällaiset kannat ovat harvinaisia (8%) ja ne on varmistettava biokemiallisesti tarkemmin esim. kaupallisesti saatavissa olevilla koesarjoilla, samoin kuin laktoosi- ja/tai sakkaroosi-positiiviset (1%) kannat, jotka muuttavat koko TSI-agarin värin keltaiseksi (esim. *S. Arizona*-kannoista 26-75% on laktoosipositivisia).

Lysiinidekarboksilaasiliemi

Salmonella dekarboksyloi lysiniä, joten sameus ja liemen purppuranpunaisen värin säilyminen lysiinidekarboksilaasiliemessä on osoitus positiivisesta reaktiosta. Liemen värin muuttuminen keltaiseksi on osoitus negatiivisesta tuloksesta (lysiiniä ei ole hajoitettu).

Brolacin agar

Tarkista viljelmien puhtaus. Salmonella kasvaa Brolacin-agarilla läpikuultavina, harmahtavina pesäkkeinä alustan värin muuttuessa sinivihreästä siniseksi (laktoosinegatiivinen). Laktoosipositiiviset salmonellat sekä muut laktoosipositiiviset bakteerit muuttavat alustan värin keltaiseksi. Mikäli viljelmät eivät ole puhtaita, mutta kasvavat tyypillisiä erillispesäkkeitä, valitse kultakin tyypillinen pesäke ja viljele siitä edelleen TSI- ja urea- agarille, L-lysiinidekarboksylaasiliemeen ja Brolacin-agarille.

12.2 Jatkovarmistukset

Tee jatkovarmistus tyypillisestä puhdasviljelmästä serologisesti ja biokemiallisesti esim. kaupallisella tunnistustestisarjalla.

Tee serologisena varmistuksena agglutinaatiokoe omnivalenttiantiseerumilla tai polyvalenteilla antiseerumeilla valmistajan ohjeen mukaisesti. Tarkasta, että tutkittava kanta ei autoagglutinoi (= sakkaa NaCl-liuoksessa). Jos kanta autoagglutinoi, antigeenin osoittaminen ei ole mahdollista.

Tee biokemiallinen varmistus API 20 E –testillä valmistajan ohjeiden mukaisesti.

12.3 Serotyypitys

Eristetyt, salmonellaksi epäillyt kannat lähetetään mieluiten Brolacin-agarilla serotyypitettäväksi Eviran Kuopion tutkimusyksikköön

Serotyypitys tehdään Kauffmann-White- järjestelmän mukaisesti (Menetelmäohje Evira 6004) Kuopion tutkimusyksikössä.

12.4 Tulokset

Kuopion tutkimusyksikkö vastaa serotyypitystuloksen sisäisenä vastauksena laboratoriotietojärjestelmään.
Kuopion tutkimusyksikkö vastaa faagityypitystulokset ulkoisena lisävastauksena.

Tutkimustulokset ilmoitetaan seuraavasti:
'Salmonelloja ei todettu/todettu/25g tai ml' näytettä tai tutkittu näytemäärä tai pinta-ala.
Ennen serotyypitystuloksen valmistumista laboratorio ilmoittaa tuloksen salmonellaepäilyinä.

Lisäksi ilmoitetaan näytteiden tutkimisesta yhteisnäytteenä. Lopullisessa tuloksessa, ilmoitetaan serotyyppi.

13 Menetelmän validointi

Menetelmä on validoitu kollaboratiivisella tutkimuksella, jossa näytemateriaalina oli jauheliha ja munajauhe, joihin oli lisätty salmonellabakteereita. Lisäksi tutkittavana oli salmonellapuhdasviljelmiä elintarvikkeista eristettyjen kilpailevien mikrobien joukossa (Wiberg, 1997). Tutkittujen näytteiden salmonellapitoisuudet vaihtelivat 30 –130 pmy / 25 g. Menetelmän sensitiivisyys oli 82,7 %. EELAn Bakteriologian tutkimusyksikkö/ Elintarvikemikrobiologia osallistui tutkimukseen.

Maldi-tof -ajo vaihtoehtoiseksi varmistusmenettelyksi käyttöönottovalidoitiin Rehu- ja lannoitejaostossa vuonna 2014. Rehuvalidoinnin tulosten perusteella voidaan katsoa Maldi-tof –laitteen soveltuvan myös elintarvikeperäisten salmonellojen tunnistamiseen (Johansson Tuula,08.05.2014).

14 Menetelmän status

Standardimenetelmä	<input type="checkbox"/>
Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Virallinen menetelmä (mikäli ei varmistusta Maldi-tofilla)	<input checked="" type="checkbox"/>
Referenssimenetelmä	<input type="checkbox"/>
Sisäinen menetelmä	<input type="checkbox"/>

15 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input checked="" type="checkbox"/>
Vertailukantojen/kontrollikantojen käyttö tarvittaessa	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet (perehdytyksessä)	<input checked="" type="checkbox"/>
Rinnakkaisanalyysit	<input type="checkbox"/>

16 Viitteet

*)NMKL 71:1999. *Salmonella*. Osoittaminen elintarvikkeista.

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

D'Aoust, J.-Y., Beckers, H.J., Boothroyd, M., Mates, A., McKee, C.R., Moran, A.B., Sado, P., Spain, G.E., Sperber, W.H., Vassiliadis, P., Wagner, D.E. and Wiberg, C. (1983) ICMSF Methods Studies. XIV. Comparative study on recovery of *Salmonella* from refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. J. Food Prot. 46:391-399.

Johansson Tuula (08.05.2014) *Salmonellan* tunnistaminen elintarvikkeista Bruker Maldi-tof - Biotyper –laitteella. Validointiraportti.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Salmonella. Osoittaminen elintarvikkeista.

Nilsson, A.-C. and Peterz, M. (1992) Collaborative study on recovery of *Salmonella* from refrigerated pre-enrichment and Rappaport-Vassiliadis broth cultures. Proceedings. Posters. Salmonella and salmonellosis. September 15-17, 1992. Ploufragan/Saint-Brieuc, France.

WHO Collaborative Centre for Reference and Research of *Salmonella* (Institut Pasteur-Paris): Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, Kauffmann-White Scheme supplemented by the formulae approved up to December 31, 2000.

Wiberg, C. (1997) Collaborative study of *Salmonella* methods: Revised NMKL no 71 and ISO 6579:1993. Biology Division, National Food Administration, Uppsala, Sweden.

*) Alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä

17 Muutokset edelliseen versioon

Laatija: Tuula Johansson
30.07.2014

Lisätty Maldi-tof vaihtoehtoiseksi varmistusmenettelyksi. Yhtenäistetty tekstiä menetelmäohjeen Evira 3543/8 kanssa varmistuskokeiden osalta.