

Salmonellan osoittaminen, VIDAS-menetelmä

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

Laite- ja reagenssitoimittaja BioMérieux'n materiaaliin pohjautuva menetelmä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmää käytetään salmonellan osoittamiseen rehuista, orgaanisista lannoitevalmisteista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä.

3 Määritelmä(t)

Salmonella-suku koostuu kahdesta lajista *Salmonella entericasta* ja *S. bongorista*. Näistä *S. enterica* jaetaan kuuteen alalajiin. *S. enterica*-serotyyppejä tunnetaan nykyisin yli 2500.

4 Periaate

Salmonellan osoittaminen Vidas-menetelmällä perustuu entsyymaattiseen immunotestiin, jonka avulla on mahdollista saada negatiivinen salmonellatulokset kolmessa päivässä. Vidas-menetelmässä esirikastus ja rikastus suoritetaan ISO 6579 -standardin mukaisesti MKTTn-liemen korkeampaa inkubointilämpötilaa lukuun ottamatta. Vidas Salmonella Assayssa (SLM) käytetään antiseerumiseosta, joka koostuu spesifisistä monoklonaalisista vasta-aineista, jotka kiinnittyvät salmonellan O- ja H-antigeeneihin. Menetelmällä voidaan todeta sekä liikkuvat salmonellat, joilla on flagelloja, että liikukumattomat salmonellat.

Vidas SLM perustuu ELFA-menetelmään (entsyymiin yhdistetty fluoresenssiin perustuva testi), joka suoritetaan Vidas-analysointilaitteella. Kiinteän faasin säiliö (SPR) toimii sekä kiinteänä alustana että pipetointivälineenä. SPR on päällystetty anti-salmonella vasta-aineilla. Tarvittavat reagenssit on annosteltu valmiiksi reagenssiliuskoille. Vidas-laitteisto suorittaa kaikki vaiheet, jotka tarvitaan salmonellan toteamiseen kolme rikastusvaihetta läpikäyneestä näytteestä. Kuumennettua jälkirikastetta pipetoidaan reagenssiliuskalle ja laite kierrättää sen SPR-säiliöön ja sieltä pois. Näytteessä olevat salmonella-antigeenit sitoutuvat SPR-säiliön sisäosaan. Sitoutumattomat komponentit poistuvat pesuvaiheiden aikana. Alkaaliseen fosfataasientsyymiin kiinnitetyt vasta-aineet kierrätetään SPR-säiliöön, jossa ne sitoutuvat säiliöön kiinnittyneisiin salmonella-antigeeneihin (salmonellasoluihin). Viimeinen pesu poistaa sitoutumattoman konjugaatin (merkityt vasta-aineet). Viimeisen vaiheen aikana substraatti (4-metyyliumbelliferyylifosfaatti) kierrätetään SPR-säiliöön. Konjugaatin entsyymi hajottaa substraatin fluoresoivaksi yhdisteeksi (4-metyyliumbelliferyylifosfaatti), jonka fluoresenssin laite mittaa 450 nm:n aallonpituudella. Vidas SLM -testin suorittamisen jälkeen laite

Salmonellan osoittaminen, VIDAS-menetelmä

analysoi tulokset vertaamalla niitä standardeihin ja tulkitsee näytteen positiiviseksi tai negatiiviseksi. Lopuksi laite tulostaa tiedot.

5 Mahdolliset virhelähteet

Eri reagenssieriä ei saa sekoittaa keskenään. Reagenssien mahdollisesta käytöstä viimeisen käyttöpäivän jälkeen pitää neuvotella vastuuhenkilön kanssa. Reagenssien tulee antaa temperoitua huoneenlämpöön vähintään 30 min ennen niiden laittoa VIDAS-laitteeseen.

Standardi, kontrollit ja kuumennetut näytteet tulee sekoittaa hyvin. Kalibroinnissa on tärkeää pipetoida tarkalleen 500 µl mittauksen tarkkuuden varmistamiseksi.

Näytteen huolimaton käsittely tai varastointi saattaa aiheuttaa vääriä tuloksia.

Näytteessä esiintyvät *Citrobacter*- ja *Hafnia*-kannat aiheuttavat virhepositiivisia tuloksia.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

Kitin reagenssit sisältävät 1 g/l Na-atsidia, joka voi reagoida lyijy- tai kupariputkistojen kanssa muodostaen räjähtäviä metalliatsideja. Jos liuoksia kaadetaan viemäriin, ne pitää huuhdella vedellä.

Käsittele kaikkea kitin sisältämää materiaalia biovaarallisena jätteenä. Puhdista ja dekontaminoi VIDAS-laitteisto säännöllisesti (katso VIDAS-käyttäjän ohjekirja).

7 Laitteet ja välineet

1. Mikrobiologinen perusvälineistö
2. Lämpökaappi 37,0 ± 1,0 °C
3. Vesihaude 41,5 ± 1,0 °C
4. Vesihaude 95 – 100 °C tai vastaava

8 Elatusaineet ja reagenssit

1. Puskuroitu peptonivesi, BPW
2. Rappaport-Vassiliadis-rikastusliemi, RVS
3. Müller-Kauffman-tetrationsaatti-novobiosiini-liemi, MKTTn
4. M-liemi (BioMérieux ref. 42077 tai vastaava itse valmistettu)
5. Yksi tai useampi kiinteä alusta: Rambach-, XLD-agar
6. SPR
SPR-kärki on päällystetty monoklonalisilla anti-salmonella vasta-aineilla. Ota käyttöön vain tarvittava määrä SPR-kärkiä suojapussista. Sulje pussi huolellisesti käytön jälkeen.
7. SLM-reagenssiliuska

Salmonellan osoittaminen, VIDAS-menetelmä

SLM-liuskalla on 10 foliolla sinetöityä kaivoa. Nimilapun viivakoodi ilmaisee testityypin, kitin eränumeron ja viimeisen käyttöpäivän. Ensimmäisen kaivon foliokansi on rei'itetty näytteen pipetointia varten ja liuskan viimeisenä kaivona on kyveti fluorimetriselle määrittelykselle. Muut kaivot sisältävät testissä tarvittavat reagenssit.

Säilytä Vidas SLM -kitti 2 – 8 °C:ssa.

9 Kontrollikannat

Vidas SLM -kitti sisältää positiivisen ja negatiivisen kontrollin. Kontrollikantoja ei käytetä.

10 Näytteen esikäsittely

Esikäsittele näyte tarvittaessa salmonellamenetelmän Evira 3543 ja toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

11 Suoritus

11.1 Rikastukset

Näytteen esirikastus ja rikastus tehdään salmonellamenetelmän Evira 3543 mukaisesti. Lyhyesti:

Esirikastus

Lisää puskuroitua peptonivettä (225 ml 25 g:aan tai 25 ml:aan) näytettä. Huomioi poikkeukset, esimerkiksi rehuseokset. Inkuboi 20±4 h tai 27±3 h 37 ± 1°C.

Rikastus

Siirrosta 1,0 ml esirikastetta 10 ml:aan MKTTn-lientä. Siirrosta vastaavasti 0,1 ml esirikastetta 10 ml:aan RVS-lientä. Inkuboi molempia rikasteita 18 – 24 h 41,5 ± 0,5°C.

Jälkirikastus

Anna M-liemien lämmitä huoneenlämpöiseksi. Siirrosta 0,1 ml MKTTn-lientä 10 ml:aan M-lientä, samoin 0,1 ml RVS-lientä toiseen putkeen M-lientä. Inkuboi M-liemiä 6 h 41,5 ± 0,5°C.

Säilytä MKTTn- ja RVS-liemet 2 – 8°C:ssa mahdollisia varmistustestejä varten.

Yhdistä jälkirikastuksen jälkeen saman näytteen M-liemet Vidas-ajoa varten seuraavasti: Sekoita M-liemiputket ja pipetoi kummastakin M-liemestä 1,0 ml samaan tyhjään putkeen. Sulje putken korkki ja kuumenna 15 min kiehuvaan vesihauteeseen. Suorita Vidas-ajo heti kuumennuksen jälkeen. Kuumennettu liemi on testauskelppoisia vielä tunnin ajan kuumennuksen jälkeen. Säilytä loppu (kuumentamaton) M-liemi 2 – 8°C:ssa mahdollisia varmistustestejä varten.

11.2 Vidas-laitteen kalibrointi ja kontrolliajot

Erätietojen syöttö, standardien ja kontrollien ajo on kuvattu vaiheittain laitteen ohjeessa (BioMérieux Suomi Oy).

Erätietojen luku MLE-koodista

Aja ennen uuden SLM-reagenssierän käyttöönottoa laitteelle erän tekniset tiedot (tiedot valmistajan alkuperäistä kalibrointisuorasta) kitin MLE-koodista. Testi ei käynnisty, ellei näitä tietoja ole päivitetty.

Valitse **Kalibrointi**, **Read MLE card** ja edelleen **Scan MLE card**. Skanna koodi viivakoodinlukijalla, laite piippaa, kun luku on onnistunut.

Vidas tulostaa päivitettyt tiedot, tallenna tiedot.

Standardin sekä positiivisen ja negatiivisen kontrollin ajot

Uudelle **SLM-kittierälle** tehdään MLE-koodin luvun jälkeen sekä **standardiajo** että **positiivisen ja negatiivisen kontrollin** ajot. Ajot **uusitaan 14 päivän välein**. (MLE-koodin lukua ei tarvitse uusia.)

Standardiajolla saadaan laitekohtainen kalibraatiosuora ja se poistaa testisignaalin mahdolliset pienet variaatiot, jotka johtuvat kitin vanhenemisesta. Standardi (S1) ajetaan rinnakkaisena. Sille saadun lukeman tulee olla asetetulla RFV-välillä. Jos näin ei ole, suorita kalibrointi uudestaan. Standardeja testattaessa näytteen tunniste on S1.

Negatiivisen kontrollin (tunniste testattaessa C1) tulee antaa negatiivinen tulos, **positiivisen kontrollin** (tunniste testattaessa C2) positiivinen tulos.

QCV-testi

QCV (Quality Control Vidas) -testin avulla seurataan laitteen pipetointitoimintoja (mm. pumppujen toimintaa). QCV-testiliuskat ajetaan laitteen jokaisessa osassa noin **2 kuukauden välein** tai epäiltäessä virheellistä annostelua. Tarkista hyväksyttävät arvot testin pakkauksesta.

11.3 Näytteen ajo

Ota Vidas SLM -kitistä tarvittavat komponentit ja anna niiden temperoitua huoneenlämmössä vähintään 30 min. Laita loput käyttämättömistä kitistä takaisin jääkaappiin. Tee laitteelle työlista (koodi SLM) tallentamalla testin ja näytteen tiedot. Pipetoi 500 µl kuumennettua näytettä (esikäsittely ja rikastukset, kohta 11.1) SLM-liuskan ensimmäiseen kaivoon.

Laita Vidas SLM SPR:t ja liuskat laitteen näytön osoittamalle paikalle. Tarkista, että SPR:n ja reagenssi-liuskojen värikoodit vastaavat toisiaan. Aloita testi Vidasin käyttäjän käsikirjan ohjeiden mukaisesti. Testaus kestää noin 45 min.

Hävitä käytetyt SPR:t ja liuskat muun biovaarallisen jätteen tavoin.

12 Varmistusmenettelyt

Varmista positiivinen tulos (testiarvo $\geq 0,23$).

Kohdan 11.1 RVS- ja MKTTn-rikastusliemet sekä keittämättömät M-liemiputket temperoidaan vähintään 30 min 41,5 °C tai 1 h 37 °C. Liemet viljellään selektiivisille alustoille ja jatkovarmistetaan menetelmäohjeen Evira 3543 ”Salmonella. Osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, komposteista...” mukaisesti.

Salmonellan osoittaminen, VIDAS-menetelmä

13 Tulokset

Laite mittaa jokaisen näytteen fluoresenssin reagenssiliuskan kyvetistä kahdesti. Ensimmäinen lukema on substraattia sisältävän kyvetin taustalukema, toinen otetaan sen jälkeen, kun substraattia on inkuboitu SPR:n seinään kiinnittyneen entsyymin kanssa. RFV (suhteellinen fluoresenssi-arvo) lasketaan vähentämällä taustalukema lopullisesta tuloksesta. Vidas tulkitsee RFV:n jokaiselle näytteelle seuraavasti:

saatu testiarvo = näytteen RFV / standardin RFV

Taulukossa esitetään testiarvoille annettu raja ja tulosten tulkinta.

Testiarvon raja	Tulkinta
< 0,23	negatiivinen
≥ 0,23	positiivinen

Laiteen tuloste sisältää testin suorituksessa tallennetut tiedot, päivämäärän ja ajan, näytteen tunnistenumeron, testin nimen, RFV-arvon, tuloksen ja sen tulkinnan. Tulokset, joiden arvo on pienempi kuin rajaksi asetettu 0,23, ovat negatiivisia. Tällaisissa näytteissä ei ole todettavissa salmonella-antigeeniä. Näytteet, jotka antavat testissä 0,23:a suuremman tai yhtä suuren arvon, ovat positiivisia.

14 Menetelmän validointi

S. Marmo & M.T. Lescure. 2002. A comparison of the Vidas Salmonella reagent with conventional culture for the detection of *Salmonella* in feed samples. International symposium on salmonella and salmonellosis. Proceedings May 29 – 31, 2002.

15 Menetelmän status

Standardimenetelmä	<input type="checkbox"/>
Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input type="checkbox"/>
Virallinen menetelmä	<input type="checkbox"/>
Sisäinen menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>

16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen / kontrollikantojen käyttö tarvittaessa	<input type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet perehdytysten yhteydessä	<input checked="" type="checkbox"/>
Rinnakkaismäärittelyt	<input type="checkbox"/>

17 Viitteet

BioMérieux'n ohjeet :

- BioMérieux Suomi Oy, laitteen käyttöohje
- Vidas Salmonella (SLM) Ref. 30702
- Vidas Procedures Manual 99035 - B, rev 02.94,
- User Manual Supplement Ref. 11647269 ja
- Addendum Ref. 4501-665/666 EN

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Salmonellan osoittaminen, VIDAS-menetelmä

18 Muutokset edelliseen versioon

7.1.2016 Evira 3526/5. Korvattu MLE-kortin luku MLE-koodin skannauksella valmistajan poistettua MLE-kortit. Muutama vähäinen tekstin muokkaus, joista ei muutosta suoritukseen.

Ohjeen laatija: Satu Hakola.