

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Salmonella. Osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä.

Osa A. Elintarvikkeet

Osa B. Rehut, rehuvalmisteet, kompostit, orgaaniset lannoitevalmisteet, biologiset torjunta-aineet ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteet

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 6579:2002 (E) ja ISO 6579:2002/Cor.1:2004(E).

(Puskuroitu 1 % peptonivesi (BPW) tai steriloitu tislattu vesi + briljanttivihreä tai kuorittu maito -ravintoliemi tai puskuroitu 1 % peptonivesi (+ Triton X-100) / 37 °C / 16-30h, RVS 41,5 °C / 18-27 h ja MKTTn 37,0 °C / 18-27 h, XLD- ja Rambach- agarit 37 °C / 18-27 h, L-lysiinidekarboksilaasiliemi valinnaisena, Urea- ja TSI- agarit, Brolacin- agar valinnaisena 37 °C / 18-27 h, biokemialliset ja serologiset varmistustestit valinnaisena, Malditof valinnaisena, serotyypitys)

Elintarviketutkimusten osalta poikkeamat viitemenetelmästä on kuvattu **Osassa A**.

Rehujen, rehuvalmisteiden, kompostien, orgaanisten lannoitevalmisteiden, biologisten torjunta-aineiden ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteiden poikkeamat viitemenetelmästä on kuvattu **Osassa B**.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä on tarkoitettu salmonellojen osoittamiseen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä.

3 Määritelmä(t)

Salmonellat ovat *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvia, gramnegatiivisia, fakultatiivisesti anaerobisia 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 serotyyppiä. Salmonellat nimetään perinteisesti serotyypin mukaan, esim. *S. Typhimurium*. Täsmällisempi nimi tälle tyyppille on *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*.

Salmonellat aiheuttavat erilaisia suolisto- ja yleisinfektioita sekä ihmisessä että eläimissä.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

4 Periaate

Salmonellojen osoittamismenetelmä on nelivaiheinen:

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

Rikastus. Tunnetut määrät esirikastettua näytettä siirretään selektiivisiin rikastusliemiin (RVS ja MKTTn). 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 tyyppillisten pesäkkeiden perusteella.

Varmistus. Salmonellaksi epäiltyjä pesäkkeitä varmistetaan

a) Malditofilla

b) Biokemiallisesti (urea- ja TSI-agar sekä valinnaisena L-lysiinidekarboksilaasiliemi). Lisävarmistukset tehdään serologisesti (omnivalentti tai polyvalentit antiseerumit) ja/tai biokemiallisesti (kaupallinen tunnistustestisarja API ja lisäksi tarvittaessa OBIS).

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

5 Mahdolliset virhelähteet

Erityisesti orgaanisten lannoitevalmisteiden ja joidenkin rehuraaka-aineiden taustafloora saattaa vaikeuttaa salmonellapesäkkeiden tunnistamista ja eristämistä.

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

Ristisaastutus 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 laboratorioissa 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 ainakin elintarvikkeissa erittäin harvoin.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Fosfiinikäsitteltyjen rehunäytteiden kanssa käytetään raitisilmasuodattimella varustettua hengityssuojainta sekä käsineitä. Näytteitä käsitellään vetokaapissa. Näytteiden inkubointi on sallitua ainostaan fosfiinilaboratorion viljelykaapissa. Muiden pääsy tiloihin on estettävä varoituskyltillä ovessa.

Entsyyminenvalmisteiden punnituksessa käytetään hengityssuojainta sekä käsineitä, näytteet punnitaan työpäivän viimeisinä näytteinä.

Pilkottaessa puruluuta ja muita kovia näytteitä käytetään suojalaseja.

Maldi-tofin matriisi sisältää asetoniiriä, työskentely vetokaapissa.

7 Laitteet ja välineet

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

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Puskuroitu 1 % peptonivesi (BPW) (+ Triton X) tai steriili tislattu vesi + briljanttivihreä tai kuorittu maito-ravintoliemi
- 2) Rappaport-Vassiliadis-soijapeptoni (RVS)- rikastusliemi
- 3) Müller Kauffmann tetrationsaatti-novobiosiiniliemi (MKTTn)
- 4) Ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti-agar (XLD)
- 5) Rambach-agar
- 6) Brolacin-agar
- 7) Triple sugar iron-agar (TSI)
- 8) Urea-agar
- 9) L-lysiinidekarboksilaasiliemi
- 10) OBIS-testi, Oxoid
- 11) O-antiseerumi, omnivalentti, Mast Group
- 12) API 20E tai API Rapid 20E, BioMérieux
- 13) HCCA-annospakattu (syano-4-hydroksikanelihappo), Bruker Daltonik GmbH
- 14) Ultrapuhdas vesi
- 15) Deionisoitu, steriili vesi
- 16) Asetoniiri
- 17) Etanoli 99,6 %
- 18) 70% FA (muurahaishappo)
- 19) Standardi (Bruker Bacterial Test Standard, BTS)

9 Kontrollikannat

Kontrollikantana käytetään Suomessa harvinaista serotyyppiä *Salmonella* Abony EELA 519 (NCTC 6017) mahdollisten ristisaastumisten havaitsemiseksi. Ristisaastumismahdollisuuden vuoksi kontrollikantojen rutiininomaista käyttöä näytteiden rinnalla ei suositella.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä.
Osa A ja Osa B.

Osa A. Elintarvikkeet

Poikkeamat viitemenetelmästä

- 1) Tyypillisiä pesäkkeitä ei viljellä puhtasviljelmiksi ravintoagarille varmistuskokeita varten, vaan suoraan TSI- ja urea- agareille, L-lysiinidekabroksilaasiliemiliemeen ja Brolacin- agarille, mikäli pesäkkeet kasvavat erillisinä.
- 2) Siirrostettaessa RVS- ja MKTTn –rikasteita XLD- ja Rambach- agareille viljellään ”perämaljat” vain, mikäli matriisi/käsiala on sellainen, ettei erillispesäkkeitä saada.
- 3) Urea- ja TSI-putket sekä API-testisarja voidaan korvata Maldi-tof analyysillä.

10 Näytteen esikäsittely

Näytteet eivät yleensä tarvitse erityistä esikäsittelyä.

11 Suoritus

Elintarvikenäytteiden tutkiminen pyritään aloittamaan niiden saapumispäivänä. Jos näytteitä ei pystytä tutkimaan heti tai tutkimus voidaan siirtää myöhempään ajankohtaan, näytteet säilytetään yksikön toimintaohjeen mukaisesti. Jos näyte joudutaan hylkäämään, hylkäyspäätöksen tekee vastaava tutkija.

11.1 Näytteenotto esirikastusta varten

Puskuroidun peptoniveden (BPW) on oltava huoneenlämpöistä ennen kuin siihen siirrostetaan näyte.

Tutkittava näytemäärä on yleensä 25 g ja esirikastusliemen (yleensä 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, paloitetuja ruhonosia, punnitse niitä sovittu määrä (yleensä n. 500 g)

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Stomacher 3500 -pussiin. Lisää pussiin 225 ml puskuroitua peptonivettä. Ravistele voimakkaasti kolmen minuutin ajan niin, että peptonivesi huuhtelee koko ruhon tai paloittelut 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 anna astian 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 liuennut (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 2-3 tippaa Triton X-100, joka vähentää rasvaisten tuotteiden esirikastusliemeen aiheuttamaa pintajännitystä.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

11.1.9 Happamat tuotteet

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

11.2 Esirikastus

Inkuboi elintarvikkeiden esirikastusliemiä 37 ± 1 °C / 16 – 20 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

11.3.1 RVS

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.

Siirrosta 0,1 ml BPW-esirikasteesta, sekoittamatta esirikastetta, läheltä pintaa, 10 ml:aan RVS-lientä.

Sekoita RVS-liemi siirrostuksen jälkeen putkisekoittajalla. Inkuboi lämpökaapissa $41,5 \pm 0,5$ °C / 24 ± 3 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).

11.3.2 MTKKn

Lämmitä rikastusliemi (MKTn) inkubointilämpötilaan ennen siirrostamista. Siirrosta BPW-esirikasteesta 1 ml sekoittamatta esirikastetta, läheltä pintaa, 10 ml:aan MKTn-lientä.

Sekoita MKTn-liemi siirrostuksen jälkeen putkisekoittajalla. Inkuboi lämpökaapissa $37,0 \pm 1$ °C / 24 ± 3 h.

MKTn-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- ja MKTn- rikasteet. Siirrosta niistä 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 rikasteista viljellä kahdelle pienelle XLD- ja Rambach- maljalle peräkkäin. Jälkimmäinen malja on ns. perämalja, joka viljel-

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

lään samalla silmukalla, jolla on viljelty ensimmäisen maljan viimeinen sektori, kasta-matta silmukkaa uudelleen rikasteeseen. Perämaljan viljelyn tarpeellisuus arvioidaan matriisin ja siirrostajan käsialan mukaan.

Kylmäsäilytyksessä olleista RVS- ja MKTTn- rikasteista viljellään maljoille samoin kuin suoraan lämpökaapista otetuista rikasteista.

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

Tyypilliset/epäilyt pesäkkeet varmistetaan biokemiallisesti (TSI- ja urea- agarit ja L-lysiinidekarboksilaasiliemi). Jatkovarmistukset tehdään serologisesti (omnivalentti tai polyvalentit antiseerumit) tai kaupallisella tunnistustestisarjalla (esim. API 20 E tai API Rapid 20 E).

Edellä mainitut biokemialliset ja serologiset varmistukset voidaan korvata Maldi-tof varmistusmenettelyllä.

Lopullinen varmistus ja serotyyppitys tehdään menetelmäohjeen Evira 6004 mukaisesti Eviran Kuopion tutkimusyksikössä.

Tee varmistukset joko kohdan 12.1 tai 12.2 mukaisesti.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäyhteistä. Osa A ja Osa B.

12.1. Maldi-tof ajo

Varmista pesäkkeet Maldi-tof –ajolla suoralla siirrostuksella työohjeen LAB 7085 mukaisesti kolmena rinnakkaisena näytestottina.

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 serotyyppitettäväksi mikäli jompikumpi tunnistus antaa tulokseksi ”*Salmonella sp*” score-arvon ollessa vähintään 1,700 (vihreä tai keltainen värikoodi).

Mikäli ajon tulos on kannan **kaikilla** näytestoteilla ”**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**”. Score-arvo jää tuolloin matalaksi välille 0,000 – 1,699 eikä tunnistus enää onnistu. Tähän voi olla kaksi syytä. Muodostettu spektri on lukukelpoinen, mutta vastaavuus kirjastoon ei ole ollut riittävä. Toinen vaihtoehto on, että spotti on teknisesti huonolaatuinen.

Mikäli spotille saadaan ”**not reliable identification**” –tulos **joko** best match- tai second best match-sarakkeeseen, katsotaan spotti-kohtainen 10 parhaimman ranking-listaus. Mikäli listalla on *Salmonella sp.*, tee kannalle pikauutto (spotilla bakteerimassa + 1 ul 70% FA -> kuivaus + 1 ul matriisi) tai ISO 6579:n mukaiset varmistustestit.

Mikäli tulos on pikauuton jälkeen 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 serotyyppityksellä. Harkinnan mukaan varmistusmenettelyä voidaan ennen serotyyppitystä täydentää ISO 6579:n mukaisilla varmistuksilla, esimerkiksi Omnivalentilla tai OBIS-testillä.

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

12.2

Vaihtoehtona Maldi-tofille, varmista mahdolliset salmonellapesäkkeet testaamalla ne biokemiallisesti urea- ja TSI-agar-putkissa sekä L-lysiinidekarboksilaasileissä, vedä perämalja selektiiviselle agarille viljelmän puhtauden tarkistamiseksi. Tee sitten serologinen varmistus omnivalenttiantiseerumilla ja tarvittaessa biokemiallinen varmistus OBIS-testillä. Jos omnivalentti saostuu, tee pesäkkeestä API 20E.

Urea-, ja TSI-agar ja L-lysiinidekarboksilaasiliemi sekä selektiivinen malja

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.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

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 serotyyppitytuloksen valmistumista. Lysinidekabroksilaasiliemi peitetään viljelyn jälkeen steriilillä mineraali- tai paraffiiniöljyllä. Huom. pesäkettä kosketetaan vain kerran, ei jokaisen viljeltävän elatusaineen jälkeen. Inkuboi 37 ± 1 °C / 24 ± 3 h.

Urea-agar

Salmonella ei hydrolysoi ureaa, joten elatusaineen väri säilyy keltaisena.

TSI-agar

Salmonella tuottaa happoa (100%) ja kaasua (92%) glukoosista, mutta ei tuota happoa laktoosista (99%) eikä sakkaroosista (99%), ja pelkistää sulfaattia sulfidiksi (92%), joka saostuu alustassa mustana rautasulfidina. Siten se muuttaa TSI-agarin värin puna (pinta) –musta (keskiosa) -keltaiseksi (pohja) tai puna (pinta) mustaksi (pohja) (voimakas rautasulfidin muodostus). Tällöinkin keltaisen värin voi yleensä erottaa putken pohjassa ja/tai keskiosassa valoa vasten katsottaessa. Kaasun muodostus havaitaan agarin halkeilemisena tai ilmakuplina agarissa.

Kannat, jotka eivät pelkistä sulfaattia sulfidiksi, eivät muodosta mustaa väriä TSI-agarin. 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).

Reaktioiden tulkinta **TSI**-putkessa:

Pisto:

- keltainen glukoosipositivinen (käyttää glukoosia -> tuottaa happoa)
- punainen tai muuttumaton glukoosinegatiivinen (ei käytä glukoosia)
- musta rikkivedyn tuotto
- ilmakuplat tai halkeamat kaasun tuotto glukoosista

Vinopinta:

- keltainen laktoosi- ja/tai sakkaroosipositivinen (käyttää laktoosia ja/tai sakkaroosia -> tuottaa happoa)
- punainen tai muuttumaton laktoosi- ja sakkaroosinegatiivinen (ei käytä laktoosia eikä sakkaroosia)

Tyypillinen salmonellavinopinta on alkaalinen (punainen) vinopintaosaltaan. Putkessa on todettavissa kaasunmuodostusta. Putken alaosa on hapan (keltainen) ja rautasulfidin muodostus näkyy mustavana renkaana piston ympärillä (noin 90 % tapauksista). Voimakas rautasulfidin muodostus voi muuttaa putken koko alaosan mustaksi.

Lysinidekarboksilaasiliemi

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

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Selektiivinen malja

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.

Jatkovarmistukset

Tee jatkovarmistus tyypillisestä puhdasviljelmästä joko serologisesti tai biokemiallisesti 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, antigenien osoittaminen ei ole mahdollista.

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

12.3 Serotyypitys

Eristetyt, salmonellaksi epäillyt kannat lähetetään Brolacin- tai XLD- tai Rambach - agarilla serotyypitettäväksi Eviran Kuopion laboratoriojaosotoin.

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

13 Tulokset

Kuopion laboratoriojaosto vastaa serotyypitystuloksen sisäisenä vastauksena laboratoriotietojärjestelmään.

Kuopion laboratoriojaosto 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 salmonellaepäilynä.

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

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

14 Menetelmän validointi

ISO 6579-menetelmän käytöstä on vahva ja pitkäaikainen kokemus. Menetelmä on ollut käytössä jo 1980-luvulla. Viimeiset 15 vuotta on kuitenkin käytetty ensisijaisesti NMKL 71 –menetelmää, koska se on hyväksytty mm. kansallisen salmonellavalvontaohjelman näytteiden tutkimiseen. NMKL-menetelmässä on vain yksi selektiivinen rikastusliemi (RVS), mutta menetelmän sensitiivisyys vastaa ISO-menetelmän sensitiivisyyttä. ISO 6579:2002 on validoitu kollaboratiivisella tutkimuksella (Feldsine, P. et al., 2003). Validointitulokset on esitetty viitemenetelmässä.

Menetelmää on käytetty vertailumenetelmänä validoitaessa MSRV-menetelmää naudan jauhelihalle yhteisön salmonellavertailulaboratorion toimesta. Validointitulokset on esitetty valdointiraportissa Evira 6002 (Kuronen, H., 2007).

Maldi-tof ajo vaihtoehtoiseksi varmistusmenettelyksi käyttöönottovalidoitiin Rehu- ja lannoitejaostossa vuonna 2014.

15 Menetelmän status

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

16 Laadunvarmistusmenetelmät

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

17 Viitteet

*)ISO 6579:2002. Microbiology of food an animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.

*) ISO 6579:2002. Technical corricendum 1, published 2004-04-01

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

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

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä.
Osa A ja Osa B.

Feldsine, P., Lienau, A.H, Leun, S.C, Mui, L.A, Humbert, F, Bohnert, M, Mooijman, K, Schulten, S, Veld, P, Rollier, P, Leuschner, R, Capps, K. (2003) Recovery of *Salmonella* in selected foods by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC International Official Method of Analysis: Collaborative Study. J. AOAC Int. 86:275-294.

Kuronen, H. Validointiraportti 6002, 16.02.2007 MSRV–menetelmän (Evira 6002) toimivuus tutkittaessa salmonellaa uloste-, pöly- ja jauhelihanäytteistä.

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): Kauffmann-White Scheme supplemented by the formulae approved up to 31st dec. 1983.

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

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Osa B. Rehut, rehuvalmisteet, kompostit, orgaaniset lannoitevalmisteet, biologiset torjunta-aineet ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteet

Menetelmä soveltuu salmonellojen osoittamiseen rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä.

Tiettyjen näytetyyppien (kuumennus-, happokäsitellyt, kuivatut ym.) esirikastusaikaa pidentämällä menetelmä on muokattu soveltumaan erityisesti stressaantuneiden salmonellasolujen alhaisten pitoisuuksien toteamiseen. Näytteistä viljellään rinnakkaiset maljat menetelmän herkkyyden lisäämiseksi. Jatkovarmistukseen poimittavien pesäkkeiden määrää on nostettu ja jatkovarmistukseen valitaan myös epätyypillisiä pesäkkeitä harvinaisempien serotyypin toteamiseksi.

Poikkeamat viitemenetelmästä

- 1) Esirikastusaika 16-20 h sijaan 20-24 h tai 24-30 h (pelletöidyt, kuumennus- ja happokäsitellyt rehunäytteet, puruluut sekä kuivatut korvat tms.).
Rikastusaika 21-27 h sijaan 18-24 h.
Maljojen inkubointiaika 21-27 h sijaan 18-24 h.
- 2) Kuivan, turpoavan näytteen ja esirikasteen suhde 1:10 sijaan 1:15 tai enemmän. Näyte voidaan jakaa kahteen osaan (12,5 g + 175 ml/astia = 1:15). Tällöin toisesta siirrostetaan RVS-rikaste ja toisesta MKTTn-rikaste.
- 3) Puruluilla poiketaan 25 g näytemäärästä.
- 4) Jatkettaessa VIDAS-menetelmästä ISO-menetelmään myös MKTTn -rikastusliemi on viljelty $41,5 \pm 1$ °C.
- 5) RVS- ja MKTTn -rikasteista viljellään kaksi XLD- ja kaksi Rambach- maljaa rinnakkaisina.
- 6) Pesäkkeitä ei viljellä ravintoagarille puhtasviljelmiksi varmistuskokeita varten, vaan suoraan urea- ja TSI-putkiin, mikäli pesäkkeet kasvavat erillisinä.
- 7) Biokemiallisten erillistestien tilalla käytetään API-testisarjaa
- 8) OBIS-testin käyttö tarvittaessa lisätestinä.
- 9) Runsaasti positiivisia osanäytteitä sisältävät näytesarjat, poikkeusmenettely serotyypitettävien määrässä.
- 10) Urea- ja TSI-putket sekä API-testisarja voidaan korvata Maldi-tof analyysillä.

10 Suoritus

10.1 Näytteen esikäsittely ja esirikastus

Näyte sekoitetaan hyvin ja siitä punnitaan 25 g:n näyte steriiliin astiaan. Astiaan lisätään 225 ml huoneenlämpöistä puskuroitua peptonivettä (BPW) ja sekoitetaan hyvin (laimennussuhde 1:10).

Kuivalle ja voimakkaasti turpoavalle näytteelle (esim. rehuseokset) lisätään enemmän puskuroitua peptoniliuosta, jotta jatkosierrostus on mahdollista²⁾. 25 g:n näyte voidaan

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä.
Osa A ja Osa B.

jakaa kahteen osaan ja lisätä peptoniliuosta 175 ml/astia (laimennussuhde 1:15). Tarvittaessa laimennussuhdetta voidaan kasvattaa enemmän.

Puruluiden salmonellamääritystä varten luusta sahataan tarvittaessa pala. Jos luu mahtuu kokonaisuudessaan inkubointiastiaan (dekanterilasi tms.), sitä ei sahata eikä pilkota. Pieniä luita laitetaan useampia samaan esirikastukseen. Luun päälle kaadetaan peptoniliuosta niin, että vähintään puolet siitä peittyi. Esirikastuksia tehdään näytemäärän salliessa kaksi³⁾.

Jos näytemäärä on pieni (entsyymipreparaatit, prosessinäytteet yms.), näytettä punnitaan esim. 10 g ja lisätään 90 ml peptoniliuosta kuitenkin niin, että laimennussuhde on 1:10.

Maitojauhetta analysoitaessa ei sekoiteta näytettä ja BPW:tä vaan astiaa seisotetaan huoneenlämmössä 60 ± 10 min, jotta näyte liukenee. Juustonäytteisiin BPW lisätään noin 40 °C:een esilämmitettynä.

Kovat, liukenemattomat näytteet (esimerkiksi Betafin S 4 ja kukkaruukkuihin tarkoitettut ravinnepuikot) murskataan huumassa, steriloidussa myllyssä tai vastaavassa ennen BPW:n lisäämistä.

Rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteille BPW:tä lisätään siten, että näyteenotto-sieni tms. peittyi. Esimerkiksi Enviro Swab –näyteenottotikkujen putkiin lisätään noin 20 ml BPW:tä.

Näytettä inkuboidaan $16 - 24$ h¹⁾ 37 ± 1 °C.

Pelletöidyn (esim. seokset, melassileike), kuumennus- tai happokäsitellyn rehunäytteen sekä puruluiden ja kuivattujen korvien tms. esirikastuksen inkubointiaika on $24 - 30$ h.¹⁾

Punnittu määrä ja laimennus kirjataan.

10.2 Rikastukset

Rikastusliemet lämmitetään $+37$ °C:een ennen siirrostusta. Siirrosta sekoittamattomasta esirikasteesta 0,1 ml Rappaport-Vassiliadis-putkiin (RVS) ja 1,0 ml Müller-Kauffmann-tetrationsaatti-novobiosiini-putkiin (MKTTn). RVS-putkia inkuboidaan $41,5 \pm 1$ °C vesihauteessa (tai lämpökaapissa) ja MKTTn-putkia 37 ± 1 °C lämpökaapissa $18 - 24$ h¹⁾. Jos näyte on jaettu kahteen osaan esirikastusvaiheessa, siirrostetaan toisesta esirikasteesta RVS-putki ja toisesta MKTTn-putki²⁾.

10.3 Viljely selektiivisille maljoille

Siirrosta rikastusliemestä silmukalla XLD- ja Rambach-agareille hajotusviljelynä siten, että muodostuu selvästi erillisiä pesäkkeitä. Sekä RVS- että MKTTn-putkista siirrostetaan rinnakkaisina kaksi XLD-maljaa ja kaksi Rambach-maljaa näytettä kohti⁵⁾. Kaikkiaan viljellään 8 maljaa / näyte. Maljoja inkuboidaan 37 ± 1 °C $18 - 24$ h¹⁾.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Varmistettaessa VIDAS–menetelmän (Evira 3256) positiivista tulosta, ISO–menetelmä aloitetaan jääkaapissa säilytetyistä VIDAS–menetelmän RVS- ja MKTTn–putkista. Tällöin myös MKTTn–rikastusliemi on viljelty $41,5 \pm 1$ °C.⁴⁾

10.4 Maljojen lukeminen

Salmonellapesäkkeet oppii tunnistamaan suurelta osin kokemuksen kautta. Niiden ulkonäkö voi vaihdella jonkin verran sekä matriisista ja serotyypistä johtuen.

XLD-malja

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.

Rambach-malja

97 – 99% salmonelloista kasvaa punaisina pesäkkeinä. Esimerkiksi *S. Typhi* ja *S. Paratyphi A* muodostavat kuitenkin värittömiä pesäkkeitä.

11 Varmistusmenettelyt

Valitse jatkoon vähintään kaksi tyypillistä tai epäiltyä pesäkettä/malja. Mikäli maljalla on havaittavissa tyypillisiä tai epäiltyjä pesäkkeitä, mutta ne eivät kasva erillisinä, viljele pesäkkeistä ensin hajotusviljemät selektiiviselle (XLD tai Rambach) agarille. Mikäli pesäke on selvästi erillään, sen voi poimia varmistettavaksi suoraan selektiiviseltä maljalta⁶⁾. Tee varmistuskokeet erillispesäkkeistä. **Tee varmistukset joko kohdan 11.1 tai kohdan 11.2 mukaisesti.**

11.1 Maldi-tof –ajo¹⁰⁾

Varmista pesäkkeet Maldi-tof –ajolla suoralla siirrostuksella työohjeen LAB 7085 mukaisesti kolmena rinnakkaisena näytespottina.

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.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Maldi-tof ajo voi antaa tulokseksi "**not reliable identification**". Score-arvo jää tuolloin matalaksi välille 0,000 – 1,699 eikä tunnistus enää onnistu. Tähän voi olla kaksi syytä. Muodostettu spektri on lukukelpoinen, mutta vastaavuus kirjastoon ei ole ollut riittävä. 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 (spotilla bakteerimassa + 1 ul 70% FA -> kuivaus + 1 ul matriisi) tai ISO 6579:n mukaiset varmistustestit.

Mikäli tulos on pikauuton jälkeen 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 serotyyppityksellä. Harkinnan mukaan varmistusmenettelyä voidaan ennen serotyyppitystä täydentää ISO 6579:n mukaisilla varmistuksilla, esimerkiksi Omnivalentilla tai OBIS-testillä.

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

11.2

Vaihtoehtona Maldi-tofille, varmista mahdolliset salmonellapesäkkeet testaamalla ne biokemiallisesti urea- ja TSI-agar-putkissa, vedä perämalja selektiiviselle agarille viljelmän puhtauden tarkistamiseksi. Tee sitten serologinen varmistus omnivalenttiantiseerumilla ja tarvittaessa biokemiallinen varmistus OBIS-testillä. Jos omnivalentti saostuu, tee pesäkkeestä API 20E.

11.2.1 Urea- ja TSI-agar sekä selektiivinen malja

Siirrosta pesäkkeestä ensin urea-agarille pintaviljelynä, sitten TSI-agarille pinta- ja pistoviljelynä sekä lopuksi perämalja selektiiviselle maljalle kannan puhtauden varmistamiseksi. (Huom. pesäkettä kosketetaan vain kerran).

Inkuboi $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 18 – 24 h¹⁾.

Urea-agar

Salmonella ei hydrolysoi **ureaa**, joten elatusaineen väri säilyy keltaisena.

TSI-agar

Salmonella tuottaa happoa (100%) ja kaasua (92%) glukoosista, mutta ei tuota happoa laktoosista (99%) eikä sakkaroosista (99%), ja pelkistää sulfaattia sulfidiksi (92%), joka saostuu alustassa mustana rautasulfidina. Siten se muuttaa **TSI**-agarin värin puna (pinta) –musta (keskiosa) -keltaiseksi (pohja) tai puna (pinta) mustaksi (pohja) (voimakas rautasulfidin muodostus). Tällöinkin keltaisen värin voi yleensä erottaa putken pohjassa ja/tai keskiosassa valoa vasten katsottaessa. Kaasun muodostus havaitaan agarin halkeilemisena tai ilmakuplina agarissa.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

Kannat, jotka eivät pelkistä sulfaattia sulfidiksi (8%), eivät muodosta mustaa väriä TSI-agarisiin. Laktoosi- ja/tai sakkaroosi-positiiviset (1%) kannat muuttavat koko TSI-agarin värin keltaiseksi (esim. *S. Arizona*-kannoista 26-75% on laktoosipositivisia).

Reaktioiden tulkinta **TSI**-putkessa:

Pisto:

- keltainen glukoosiposiitiivinen (käyttää glukoosia -> tuottaa happoa)
- punainen tai muuttumaton glukoosinegatiivinen (ei käytä glukoosia)
- musta rikkivedyn tuotto
- ilmakuplat tai halkeamat kaasun tuotto glukoosista

Vinopinta:

- keltainen laktoosi- ja/tai sakkaroosiposiitiivinen (käyttää laktoosia ja/tai sakkaroosia -> tuottaa happoa)
- punainen tai muuttumaton laktoosi- ja sakkaroosinegatiivinen (ei käytä laktoosia eikä sakkaroosia)

Tyypillinen salmonellavinopinta on alkaalinen (punainen) vinopintaosaltaan. Putkessa on todettavissa kaasunmuodostusta. Putken alaosa on hapan (keltainen) ja rautasulfidin muodostus näkyy mustuvana renkaana piston ympärillä (noin 90 % tapauksista). Voimakas rautasulfidin muodostus voi muuttaa putken koko alaosan mustaksi.

Selektiivinen malja

Tarkista viljelmän puhtaus. Mikäli viljelämä ei ole puhdas, mutta kasvaa tyypillisiä tai epäilyttäviä erillispesäkkeitä, viljele siitä pesäke TSI- ja urea- agarille ja edelleen selektiiviselle maljalle. Mikäli samasta näytteestä on poimittu useita morfologialtaan samanlaisia pesäkkeitä, jotka ovat puhtasviljelmiä, tämä ei ole tarpeellista.

11.2.2 Serologinen varmistus ominivalentilla

Mikäli kanta vaikuttaa salmonellalta urea- ja TSI-putkien tulosten perusteella, tee serologinen varmistus. Sekoita solumassaa TSI-putkesta fysiologiseen suolaliuokseen objektilasilla auto-agglutinoivien kantojen erottamiseksi. Kääntelee objektilasia varovasti 30 – 60 s autoagglutinaation toteamiseksi. Jos kanta autoagglutinoi, antigeenien osoittaminen ei ole mahdollista.

Jos kanta ei autoagglutinoi, testaa se O-antiseerumilla (omnivalent). Salmonelat saostuvat omnivalentilla.

11.2.3 Biokemiallinen OBIS-testi⁸⁾

Muutkin *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvat bakteerit (esim. *Proteus* ja *Citrobacter*) saattavat saostaa omnivalentin. Harkinnan mukaan pesäke voidaan ennen API:a testata OBIS-testillä⁸⁾, joka erottelee salmonellan *Citrobacterista* ja *Proteuksesta*.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

11.2.4 Kaupallinen tunnistustestisarja (API 20E)⁷⁾

Jos kanta vaikuttaa salmonellalta urea- ja TSI-putkien sekä omnivalentin agglutinaation perusteella (sekä OBIS-testi), tee TSI-putkesta tai perämaljalta API 20E testin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Mikäli kanta on API-tuloksen perusteella mahdollinen salmonella, lähetä kaikki omnivalenttiantiseerumilla agglutinoineet pesäkkeet perämaljoilla Eviran Kuopion tutkimusyksikköön serotyypitettäviksi.

Mikäli maljoilla on useita erinäköisiä/erilaisen biokemiallisen profiilin antaneita salmonellaksi epäiltyjä pesäkkeitä, kaikki erilaiset lähetetään serotyypitettäviksi. Mikäli **näytesarjassa** on hyvin runsaasti positiivisia osanäytteitä, eikä mahdollisten salmonella-pesäkkeiden morfologiassa ole havaittavia eroja, riittää kahden kannan lähettäminen serotyypitykseen.

11.3 Serotyypitys

Serotyypitys tehdään Kauffmann-White –järjestelmän mukaan (menetelmäohje Evira 6004) Eviran Kuopion tutkimusyksikössä.

12 Tulokset

Kirjaa työpaperiin varmistettavien pesäkkeiden määrä rikastuslientä ja maljatyyppiä kohti. Kirjaa työpaperiin Maldi tof- ajon tulos ja liitä mukaan ajon raportti. Liitä API-tulosliuska työpaperiin. Kirjaa myös OBIS-testin ja omnivalentin reaktiot.

Tulokset ilmoitetaan tutkimustodistuksessa joko ”Näytteessä ei todettu salmonellaa” tai ”Näytteessä todettiin salmonella” tutkitussa näytemäärässä, yleensä 25 g:ssa. Salmonellan serotyyppi ilmoitetaan. Jos salmonellalle ei löydy nimeä, tulokseksi merkitään antiseerumiprofiili. Analyysikommentilla ilmoitetaan tieto siitä, että serotyypitys on tehty Eviran Kuopion tutkimusyksikössä.

13 Menetelmän validointi

Menetelmää on käytetty pitkään sekä rehujen että orgaanisten lannoitevalmisteiden analysoinnissa. ISO 6579 –menetelmä on ollut käytössä vuodesta 1996, akkreditoituna vuodesta 1997. Maldi-tof ajo vaihtoehtoiseksi varmistusmenettelyksi käyttöön ottovalidoitiin Rehu- ja lannoitejaostossa vuonna 2014.

Salmonellan osoittaminen elintarvikkeista, rehuista, rehuvalmisteista, komposteista, orgaanisista lannoitevalmisteista, biologisista torjunta-aineista ja rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteistä. Osa A ja Osa B.

14 Menetelmän status

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

15 Laadunvarmistusmenetelmät

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

16 Muutokset edelliseen versioon

Laatijat: Tuula Johansson ja Satu Hakola.

9.5.2014 Evira 3543/8 Tuula Johansson ja Satu Hakola. A- ja B-osat: lisätty Maldi-tof vaihtoehtoiseksi varmistusmenettelyksi. Lisätty laitteisiin ja reagensseihin Maldi-tof ja tarvittavat reagenssit. Muokattu B-osaa: lisätty rehutehtaiden tuotantoympäristönäytteet, muokattu Vidas-positiivisten varmistusta ISO-menetelmällä (ei muutosta suoritukseen). Poistettu API Rapid 20E käyttö. Tekstin jäsentelyä ja muokkausta. Poistettu kohdasta 14 referenssimenetelmä ja virallinen menetelmä. Poistettu kohdasta 15 vertailukantojen käyttö.

14.5.2014 Muokattu A-osan tekstiä yhtenäiseksi B-osan kanssa. Tarkennettu A-osassa menetelmän statusta, kun Maldi-tof käytössä.

25.7.2014 A- ja B-osat: Täsmennetty Maldi-tofin menettelyitä "not reliable identification"-tilanteessa, ei muutoksia suoritukseen.

14.8.2014 Lisätty työturvallisuuskohtaan Maldi-tofin matriisin asetonitrili. Pieniä täsmennyksiä Maldi-tof analyysiin, ei muutoksia suoritukseen.