

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSRv-menetelmällä.

---

## **Salmonella. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSRv-menetelmällä.**

### **1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat sekä menetelmän liitteet**

- Eläinten elin- ja ulostenäytteet ja tuotantoympäristönäytteet: ISO 6579:2002 / Amendment 1, 2007, Annex D
- Elintarvikkeet: ISO 6579:2002 / Amendment 1, 2007, Annex D; ja NMKL 187:2007

(Puskuroitu peptonivesi 37 °C / 16-20 h, MSRv 41,5 °C / 2 x 24 ± 3 h, XLD-agar ja valinnainen selektiivinen agar [esim. Rambach- agar 37 °C / 24 ± 3 h), L-lysiinidekarboksylaasiliemi, Urea-, TSI- ja/tai API 20E; Brolacin- agar (tai XLD tai Rambach) 37 °C / 24 ± 3 h; vaihtoehtoisena varmistuksena Maldi-tof)

Poikkeamat ISO-menetelmästä:

- 1) Epäiltäessä liikkumattomia salmonelloja eläinten taudinaiheuttajaksi tehdään rikastuksen lisäksi viljelyt myös suoraan naudanveriagarille ja selektiivisille agareille, inkubointi 37 °C / 24 ± 3 h tai vähintään 48 ± 3 h 37°C; Pullorum ja Gallinarum/linnut)
- 2) Urea- ja TSI-agar, lysiinidekarboksilaasiliemi sekä API-testisarja voidaan korvata Maldi-tof -analyysillä.

Poikkeamat NMKL-menetelmästä:

- 1) Urea- ja TSI-agar, lysiinidekarboksilaasiliemi sekä API-testisarja voidaan korvata Maldi-tof -analyysillä.

Liite-1: Kansallisen salmonellavalvontaohjelman mukaisten näytteiden käsittely ja koostaminen

Liite 2: Eläinlajispesifisten salmonellojen eristyksen erityispiirteitä

### **2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala**

ISO-menetelmä on tarkoitettu salmonellojen osoittamiseen eläinten ulosteista ja alkutuotannon ympäristönäytteistä. Sitä sovelletaan myös eläinten elinnäytteiden ja elintarvikenäytteiden tutkimiseen.

NMKL-menetelmä on tarkoitettu salmonellojen osoittamiseen elintarvikkeista, ulosteista ja alkutuotannon ympäristönäytteistä.

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSR-v-menetelmällä.

---

Epäiltäessä liikkumattomia salmonelloja (kuten *S. Gallinarum*) eläinten taudinaiheuttajaksi tehdään rikastuksen lisäksi viljelyt myös suoraan naudanveriagarille ja selektiivisille agareille. Tunnistaminen tehdään tämän menetelmäohjeen mukaisesti.

### 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 2400 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.

### 4 Periaate

Salmonellojen osoittaminen on nelivaiheinen:

**Esirikastus.** Tunnettu määrä näytettä esirikastetaan ei-selektiivisessä elatusaineessa (BPW)  $37 \pm 1$  °C:ssa 16 - 20 tuntia.

**Rikastus.** Tunnettu määrä esirikastettua näytettä siirretään selektiiviselle rikastusmaljalle (MSRV) ja inkuboidaan  $41,5 \pm 1$  °C:ssa  $24 \pm 3$  tuntia sekä toiset  $24 \pm 3$  tuntia, jos maljalla ei ole tyypillistä kasvua  $24 \pm 3$  h inkuboinnin jälkeen.

**Maljaviljely.** Rikastusmaljoilta siirretään kasvustoa kiinteille, selektiivisille elatusaineille (XLD ja Rambach), joita inkuboidaan  $37 \pm 1$  °C:ssa  $24 \pm 3$  tuntia.

**Varmistus.** Salmonellaksi epäiltyä kasvustoa siirrostetaan sopivalle elatusaineelle ja varmistetaan

- Maldi-tofilla
- biokemiallisin menetelmin

### 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.

Jos eläintä on ehditty hoitaa antibiooteilla ennen näytteenottoa, salmonellat voivat jäädä toteamatta.

Jos MSR-v-maljojen inkubointilämpötila on alhaisempi kuin  $41,5 \pm 0,5$  °C, voivat jotkut enterobakteerit (esim. *Citrobacter* spp., *E.coli*) kasvaa myös leviävänä kasvustona.

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSRv-menetelmällä.

---

Ristikontaminaatio näytteiden välillä tai laboratorion kontrollikannan kanssa on mahdollinen. Virhepositiivinen tulos voi johtaa eläin- ja elintarvikepuolella hyvinkin 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.

## 7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Lämpökaappi +37 ±1 °C
- 3) Lämpökaappi +41,5 ± 1 °C
- 4) Maldi-tof Biotyper, Bruker

## 8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Puskuroitu peptonivesi (BPW)
- 2) Modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV)
- 3) Ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti-agar (XLD)
- 4) Rambach / muu valinnainen
- 5) Naudanveriagar
- 6) Brolacin-agar
- 7) Triple sugar iron-agar (TSI)
- 8) Urea-agar
- 9) L-lysiinidekarboksylaasiliemi
- 10) API 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 (NCTC 6017) mahdollisten ristisaastumisten havaitsemiseksi. Ristisaastumismahdollisuuden vuoksi kontrollikantojen rutiininomaista käyttöä näytteiden rinnalla ei suositella.

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSR-v-menetelmällä.

---

## 10 Näytteen esikäsittely

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

## 11 Suoritus

Näytteiden tutkiminen aloitetaan niiden saapumispäivänä. Jos näytteitä ei pystytä tutkimaan heti, näytteet säilytetään yksiköiden toimintaohjeiden mukaisesti. Yli kolmen vuorokauden ikäisten ulostenäytteiden osalta harkitaan erikseen, onko näyte enää tutkimuskelpoinen. Hylkäämisestä päättää tällöin vastaava tutkija.

### 11.1 Näytteenotto esirikastusta varten

Puskuroidun peptoniveden on oltava huoneenlämpöisiä ennen kuin siihen siirrostetaan näyte.

Kansallisen salmonellavalvontaohjelman mukaisten uloste-, tossu-, imusolmuke-, liha- ja tuotantoympäristönäytteiden tutkimista varten näytteet käsitellään ja koostetaan työohjeen Evira 6002-1 mukaisesti

#### 11.1.1 Elin- ja ulostenäytteet

Elin- ja ulostenäytteitä tutkittaessa näytemäärä on n. 1 g ja esirikastusliemen tilavuus 9 ml. Mikäli näytemäärä on jokin muu kuin edellä mainitun, on esirikastusliemen tilavuus valittava siten, että näytemäärän suhde esirikastusliemen tilavuuteen on noin 1:9 (eli näyte laimenee suhteessa 1:10 = yksi osa näytettä + yhdeksän osaa esirikastuslientä).

Ota yhteensä noin 1 g elimiä (yleensä maksa, perna ja suoli) tai noin 1 g ulostetta, mikäli mahdollista, 9 ml:aan puskuroitua peptonivettä. Sekoita näyte esirikastusliemeen ravistelemalla näyteastiaa kevyesti.

#### 11.1.2 Elintarvikenäytteet

Elintarvikkeita tutkittaessa 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.

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSRv-menetelmällä.

---

Poikkeavaa käsittelyä vaativien elintarvikkeiden näytteenotto esirikastusta varten on kuvattu menetelmäohjeissa Evira 3432 ja Evira 3543 osa A, kohdat 11.1.1.-11.1.9.

## 11.2 Esirikastus

Inkuboi esirikastusliemiä  $37 \pm 1$  °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; Davies et al., 2001).

## 11.3 Rikastus

MSRV-maljojen on oltava huoneenlämpöisiä ennen siirrostamista. Halkeilleita tai nesteytyneitä maljoja ei saa käyttää. Mikäli esirikaste on ollut jääkaapissa (esim. viikonloppu katkaisee työt), inkuboi sitä  $37 \pm 1$  °C / 2 h ennen rikastusliemeen siirrostamista suuren lämpötilavaihtelun välttämiseksi.

Siirrosta esirikastetta 0,1 ml kolmena tippana tasaisin välein MSRv-maljalle kertakäyttöpipetillä. Otettaessa näytettä esirikasteesta on tärkeää, että näytettä ei sekoiteta. Näyte otetaan kohdasta, jossa vapaata nestettä on mahdollisimman paljon. Jos nesteen pinnalla on partikkeleita, on suositeltavaa ottaa näyte syvemmältä.

Inkuboi MSRv-maljoja lämpökaapissa  $41,5 \pm 1$  °C  $24 \pm 3$  h.

MSRV-maljoja ei saa kääntää vaan ne inkuboidaan kannet ylöspäin.

Liikkuvat salmonellat muodostavat leviävän, vaalean, selvärajaisen vyöhykkeen siirrostustippojen ympärille.

Jos MSRv-maljoilla ei ole tyypillistä kasvua  $24 \pm 3$  h inkuboinnin jälkeen, inkuboi toiset  $24 \pm 3$  h. MSRv - maljat voidaan siirtää 24 tai 48 h:n inkuboinnin jälkeen jääkaappiin (2-8 °C) enintään 72 tunniksi, mikäli mahdollista viljelyä selektiivisille maljoille ei voida välittömästi suorittaa.

## 11.4 Viljely selektiivisille maljoille

XLD-maljan ja valinnaisen selektiivimaljan on oltava huoneenlämpöisiä ennen siirrostamista.

Selektiivimaljoille otetaan kasvustoa leviävän vyöhykkeen reunoilta. Siirros otetaan 1 µl:n silmukalla kasvuvyöhykkeen ulkoreunasta siten, että agarია tulee mahdollisimman vähän mukaan siirrokseen. Kummallekin maljalle otetaan näyte omalla steriilillä silmukalla ja viljellään hajotusviljelmäksi siten, että saadaan selvästi erillisiä pesäkkeitä. Käytettäessä 1 µl silmukkaa riittää normaalikokoinen (90 – 100 mm) malja kumpaakin selektiivistä agarია erillisten pesäkkeiden saamiseksi.

24 h:n inkuboinnin jälkeen kielteiset MSRv - maljat laitetaan uudelleen inkuboitumaan  $24 \pm 3$  h. Ko. maljoilta viljellään selektiivisille maljoille vain, jos ne ovat 48 h:n jälkeen muuttuneet positiivisiksi (= leviävää kasvua).

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSR V-menetelmällä.

---

Inkuboi XLD-maljoja ja Rambach -maljoja maljoja  $37 \pm 1$  °C  $24 \pm 3$  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

*Salmonella* (lukuun ottamatta Typhi-serotyyppejä) kasvaa Rambach-maljalla kirkkaanpunaisina pesäkkeinä.

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
- perinteisin biokemiallinen (TSI- ja urea- agar ja lysiinidekarboksylaatioliemi; 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 työohjeen LAB 7085 mukaisesti kahtena tai 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).

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSR-v-menetelmällä.

---

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"** ja 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 ja lysiinidekarboksylaasiliemi tai API 20 E

Valitse molemmilta käyttämiltäsi maljoilta yksi tyypillinen tai epäilty pesäke jatkotutkimuksiin. Mikäli pesäke on selvästi erillään muista pesäkkeistä, siirrosta samasta pesäkkeestä samalla 1 µl:n silmukalla ensin urea-agarille pintaviljelynä ja TSI-agarille pinta- sekä pistoviljelynä, sitten lysiinidekarboksylaasiliemeen ja lopuksi Brolacin-, XLD- tai Rambach- maljalle hajotusviljelynä. Huom. pesäkettä kosketetaan vain kerran, ei jokaisen viljeltävän elatusaineen jälkeen. Peitä lysiinidekarboksylaasiliemi viljelyn jälkeen steriilillä mineraali- tai paraffiiniöljyllä. Inkuboi 37 ± 1°C / 24 ± 3 h.

Jos valitut pesäkkeet eivät olleet salmonellaa, 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 erillisistä pesäkkeistä varmistuskokeet.

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

Salmonella käyttää glukoosia, mutta ei laktoosia eikä sakkaroosia, sekä pelkistää sulfaattia sulfidiksi, joka saostuu alustassa mustana rautasulfidina. Siten se muuttaa **TSI**-agarin värin puna-musta-keltaiseksi tai punamustaksi (voimakas rautasulfidin muodostus). Kannat, jotka eivät pelkistä sulfaattia sulfidiksi, eivät muodosta mustaa väriä. Tällaiset kannat ovat harvinaisia ja ne varmistetaan esim. kaupallisesti saatavissa olevilla testisarjoilla.

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSRv-menetelmällä.

---

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

Tarkista viljelmien puhtaus. *Salmonella* kasvaa **Brolacin**-agarilla läpikuultavina, harmahtavina pesäkkeinä alustan värin muuttuessa sinivihreästä siniseksi (laktoosinegatiivinen). Laktoosiposiitiviset salmonellat sekä muut laktoosiposiitiviset 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.

Urea-, TSI- ja lysiinidekarboksylaasiliemi –kokeet voidaan korvata **API 20 E - testisarjalla**.

## 12.2.2 Jatkovarmistukset

Mikäli viljelit biokemiallisena varmistuksena TSI:n, urean ja lysiinidekarboksylaasiliemen, voit tehdä tarvittaessa lisäksi jatkovarmistuksen kaupallisella tunnistustestisarjalla, esim API 20 E.

## 13 Tulokset

Kukin salmonellanäytteitä tutkiva yksikkö vastaa itse negatiiviseksi toteamansa näytteen tutkimustuloksen:

Eläintautitutkimukset: 'Salmonellabakteereita ei todettu'

Elintarviketutkimukset: 'Salmonellabakteereita ei todettu/25g tai ml' näytettä tai tutkittu näytemäärä tai pinta-ala.

Epäillössään näytteessä salmonellaa Maldi-tofin tai perinteisen biokemiallisen tunnistuksen ja mahdollisen polyvalentti-serotyypityksen perusteella Helsingin, Seinäjoen ja Oulun toimipaikat voivat antaa tutkimuksesta alustavan salmonellaepäily – tuloksen.

Muista kuin Eviran laboratorioista suoraan Kuopioon tulleiden näytteiden sekä Eviraan tulleiden tuotantoeläinten (nauta, sika, siipikarja ja hevonen) ulostenäytteiden osalta Kuopio vastaa serotyypitystuloksen suoraan tutkimuksen tilaajalle.

Kuopio kirjaa ja hyväksyy patologisten näytteiden ja elintarvikkeiden osalta serotyypitystulokset ELMOon. Patologit vastaavat patologisten näytteiden osalta tuloksen yhteisvastauksena ulkoisesti asiakkaalle ja asianmukaisille tiedoksisaajille, elintarvikkeiden osalta Elintarvike- ja rehumikrobiologian tutkimusyksikön tutkijat. Kansalliseen salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvien eläinten (nauta, sika, siipikarja) rajoittavien määräysten antamista varten patologit tekevät välittömästi välivastauksen serotyypitystuloksesta, jos muut tutkimukset ovat vielä kesken.



Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSRv-menetelmällä.

---

Kuopio vastaa faagityypitytulokset ulkoisena lisävastauksena.

## 14 Menetelmän validointi

Menetelmän validoinnista on laadittu erilliset validointiraportit Evira 6002/Kuronen, 2007 sekä Evira 6002/liha/Johansson, Pekkanen 2012.

Maldi-tof -ajo vaihtoehtoiseksi varmistusmenettelyksi käyttöönottovalidoitiin Rehu- ja lannoitejaostossa vuonna 2014. Tähän validointiaineistoon sisältyvien salmonellaserotyypien ja elintarvikkeissa esiintyvien serotyyppien vertailun perusteella Maldi-tofin todettiin soveltuvan myös elintarvikkeista eristettyjen salmonella-kantojen biokemialliseen varmistamiseen.

## 15 Menetelmän status

Standardimenetelmä	<input checked="" type="checkbox"/> <sup>1)</sup>
Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/> <sup>2)</sup>
Virallinen menetelmä (mikäli ei varmistusta Maldi-tofilla)	<input checked="" type="checkbox"/> <sup>1), 2)</sup>
Referenssimenetelmä (mikäli ei varmistusta Maldi-tofilla)	<input checked="" type="checkbox"/> <sup>1)</sup>
Sisäinen menetelmä	<input type="checkbox"/>

## 16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/> <sup>1), 2)</sup>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen / kontrollikantojen käyttö tarvittaessa	<input checked="" type="checkbox"/> <sup>1), 2)</sup>
Siirrostetut näytteet (perehdytyksessä)	<input checked="" type="checkbox"/> <sup>1), 2)</sup>
Rinnakkaisanalyysit	<input type="checkbox"/>

<sup>1)</sup> ISO, <sup>2)</sup> NMKL

## 17 Viitteet

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

ISO 6579:2002 / Amd. 1:2007 (E). Amendment 1, Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.

Davies, R.H., Bedford S., Shankster S. (2001), Enhanced culture techniques for the detection of *Salmonella*, The Veterinary Record, April 28, 2001, p. 539-540.

Eläintautibakteriologia ja Elintarvike- ja rehumikrobiologia

*Salmonella*. Osoittaminen eläinten elin- ja ulostenäytteistä, tuotantoympäristönäytteistä ja elintarvikkeista MSRv-menetelmällä.

---

Johansson, T. ja Pekkanen, K. (2012) MSRv-menetelmän (Evira 6002) toimivuus tutkittaessa salmonellaa lihanäytteistä, Validointiraportti

Johansson, T. Salmonellan tunnistaminen Bruker MALDI-TOF Biotyper -laitteella; elintarvikkeet. Validointiraportti, 08.05.2014

Korver H., Mooijman K.A., Nagelkerke, N.J.D, van de Giessen A.W. and Henken, A.M. (2003) EU Collaborative study VI (2002) on bacteriological detection of *Salmonella* spp. RIVM report 330300001/2003. Bilthoven, The Netherlands.

Kuronen H. Validointiraportti 6002, 16.2.2007.

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.

Pelkola, K. Salmonellan tunnistaminen Bruker MALDI-TOF Biotyper -laitteella, eläinten elin- ja ulostenäytteet sekä tuotantoympäristönäytteet. Validointiraportti 10.9.2014.

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.

## 18 Muutokset edelliseen versioon

Laatijat: Henry Kuronen, Tuula Johansson ja Teresa Skrzypczak  
17.07.2014 Evira 6002/7 Lisätty Malditof vaihtoehtoiseksi varmistusmenettelyksi.  
Lisätty laitteisiin ja reagenssiin Malditof ja tarvittavat reagenssit ja tulosten tulkinta.  
API 20E vaihtoehdoksi biokemiallisille testeille. Poistettu serologinen varmistus.  
Lisätty viitteisiin elintarvikkeiden MSRv- ja Malditof -validointiraportit sekä eläinten elin- ja ulostenäytteiden sekä tuotantoympäristönäytteiden MALDI-TOF -validointiraportti.

## 19 Vastuuhenkilöt

Helsinki: Teresa Skrzypczak  
Kuopio: Henry Kuronen  
Oulu: Varpu Hirvelä-Koski  
Seinäjoki: Mirja Raunio-Saarnisto  
Helsinki/Elintarvikemikrobiologia: Tuula Johansson