

Salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvien näytteiden käsittely ja koostaminen

1 Soveltuvuus

Tämä työohje soveltuu eläinten elin- ja ulostenäytteiden, ruhojen pintasively- ja niskanahkanäytteiden, liha, lihamurska- ja raakalihavalmistenäytteiden sekä ympäristönäytteiden käsittelyyn ja koostamiseen. Salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvat näytteet tulee käsitellä tämän ohjeen mukaisesti.

Evira vastaa tämän työohjeen päivityksestä, päivitetty versio julkaistaan evira.fi sivuilla. Laboratorioidenvastuulla on voimassa olevan työohjeen noudattaminen.

2 Näytteenotto

Näytteenotossa noudatetaan salmonellavalvontaohjelmasta annettuja Maa- ja metsätalousministeriön Elintarvike- ja terveysosaston asetuksia.

Näytteiden tutkiminen aloitetaan viimeistään 48 tunnin kuluessa niiden saapumisesta. Jos tutkimusta ei pystytä aloittamaan heti, näytteet säilytetään jääkaappilämpötilassa tutkimushetkeen asti ja ne on tutkittava 96 h:n kuluessa näytteenotosta.

Teurastamoissa ja teurastuspaikoissa otetaan ruhoista pintasivelynäytteitä näytteenottosienillä tai steriileillä sidetaitoksilla. Steriilejä sidetaitoksia sisältävät näytteenottopussit voidaan valmistaa näytteet tutkivassa laboratorioissa. Kaksi steriiliä muovipussia (esim. Stomacher-pussi) pujotetaan aseptisesti päällekkäin. Sisempään pussiin siirretään aseptisesti nautojen ruhojen pintasivelynäytteitä varten kaksi ja sikojen ruhojen pintasivelynäytteitä varten kolme steriiliä taitosta (10 x 10 cm). Taitosten päälle pipetoidaan 10 ml steriiliä, puskuroitua peptonivettä. Pussi suljetaan huolellisesti (esim. taivuttamalla suuosa ja teippaamalla pussi tiiviisti kiinni) ja säilytetään jääkaappilämpötilassa niin, että näytteenottoajan ja tutkimuksen aloittamisen välinen aika on enintään 96 tuntia. Mikäli vastaavanlaisia taitoksia on kaupallisesti saatavana, niitä voidaan käyttää.

3 Näytteiden koostaminen esirikastusta varten

Tutkittava näytemäärä on yleensä 25 g ja esirikastusliemen (puskuroitupeptonivesi) tilavuus 225 ml. Mikäli näytemäärä on jokin muu kuin edellä mainittu, 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 esirikastusliettä).

Näyte sekoitetaan esirikastusliemeen ravistelemalla näyteastiaa kevyesti. Esirikastusliettä inkuboidaan 37 + 1 °C/16 - 20 h. Esirikaste voidaan siirtää inku-

Salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvien näytteiden käsittely ja koostaminen

boinnin jälkeen jääkaappiin enintään kolmeksi vuorokaudeksi, mikäli rikastusta ei voida välittömästi jatkaa esim. viikonloppuna.

3.1 Liha, lihamurska, jauheliha ja raakalihavalmisteet

Punnitse 25 g näytettä 225 ml:aan puskuroitua peptonivettä.

- Liha: Koosta näyte lihapaloista. Mikäli palat ovat isoja, koosta usean palan pintaosasta.
- Lihamurska: Sekoita lihamurska huolellisesti ennen punnitsemista.
- Broilerin, kalkkunan ja kanan liha: Erästä otetut viisi näytettä tutkitaan jokainen erikseen. Tutkittavaan näytteeseen, 25 g, leikataan ensisijaisesti nahkaa. Jos nahkaa yksistään ei ole riittävästi, otetaan mukaan lisäksi myös lihan pintaa. Mikäli nahkaa ei ole lainkaan, otetaan näytteeksi pelkästään lihan pintaa.
- Jauheliha- ja raakalihavalmisteista otetut viisi näytettä/erä tutkitaan kukin erikseen.
 - Jauhelihavalmisteet: Sekoita huolellisesti ennen punnitsemista.
 - Raakalihavalmisteet: Mikäli palat pieniä, sekoita, mikäli isoja, leikkaa lihan pintaa useasta palasta näytteen koostamiseksi.

3.2 Broilerin, kalkkunan ja kanan niskanahkanäytteet

Siipikarjan ruhojen niskanahkanäytteet tutkitaan kolmen näytteen yhteisnäytteenä. Yhdistettävien näytteiden on oltava samasta parvesta peräisin olevista ruhoista. Koosta yhteisnäyte ottamalla kustakin yhdistettävästä niskanahkanäytteestä painoltaan noin 8 g:n osanäyte siten, että yhdistenäytteen paino on 25 g. Lisää 225 ml puskuroitua peptonivettä.

3.3 Imusolmukkeet

Imusolmukenäytteet voidaan tutkia joko yksittäin tai enintään viiden näytteen yhteisnäytteenä. Yksittäin tutkittaessa tulee tutkittavan näytemäärän olla vähintään 10 g, jolloin esirikastusliemen tilavuus on 90 ml. Yhteisnäytteenä tutkittaessa näytemäärä on 25 g ja esirikastusliemen tilavuus 225 ml.

Jos tutkit näytteet yhteisnäytteenä, puolita kunkin näytteen muodostavat imusolmukkeet (5 kpl) omalla steriilillä veitsellä. Säilytä näytteiden puolikkaat jääkaappilämpötilassa omassa pusseissaan, kunnes salmonellatutkimus yhteisnäytteestä on valmistunut. Yhdistä enintään viidestä, samaa lajia olevasta eläimestä otetut imusolmukkeiden puolikkaat ja hienonna ne esimerkiksi pilkkomalla steriileillä saksilla. Sekoita hienonnettu näyte ennen kuin punnitset sitä esirikastusliemeen. Jos toteat salmonellaa yhteisnäytteessä, tutki salmonella erikseen jokaisesta osanäytteestä.

3.4 Pintasivelynäytteet ruhoista

Lisää sivelynäytepussiin 225 ml puskuroitua peptonivettä.

Esirikastuksen jälkeen voidaan yhdistää enintään viiden samaa lajia olevan eläimen näytteet.

Salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvien näytteiden käsittely ja koostaminen

RVS – rikastuksella yhdistäminen tapahtuu ottamalla kustakin viidestä esirikasteesta 0,1 ml esirikastetta (yhteensä 0,5 ml) 50 ml RVS – lientä.

MSRV – rikastuksella yhdistäminen tapahtuu ottamalla kustakin viidestä esirikasteesta 0,1 ml esirikastetta (yhteensä 0,5 ml) steriiliin putkeen. Yhteisnäyte sekoitetaan ja MSRV – maljalle otetaan 0,1 ml sekoitusta.

Jos yhteisnäytteessä todetaan salmonellaa, kunkin eläimen jääkaapissa säilytetty esirikastenäyte tutkitaan erikseen.

3.5 Ulostenäytteet (nauta ja sika)

Salmonellavalvontaohjelman mukaiset ulostenäytteet sioista ja naudoista saapuvat laboratorioon pääsääntöisesti enintään 20 ulostenäytteen yhteisnäytteinä.

Yhdistäminen ja sekoittaminen on tehty tilalla, joten laboratorioon tulevasta yhteisnäytteestä otetaan esirikastukseen n. 25 g ulostetta 225 ml puskuroitua peptonivettä. Nuorten eläinten näytemäärä voi olla pienempi, jos ulostetta ei ole riittävästi.

Nautojen keinosiemennystarkoitukseen lähtevän naudän ulostenäyte tutkitaan erikseen, n. 25 g ulostetta 225 ml puskuroitua peptonivettä. Kliinisten oireiden perusteella tutkittavien sikojen ja nautojen ulostenäytteitä voidaan yhdistää korkeintaan viiden eläimen näytteet. Myös salmonellaposiitivisen tilan saneerausvaiheessa voi tulla yksittäisten eläinten näytteitä, joita pyydetään tutkimaan erikseen.

3.6 Tuotantoympäristönäytteet nautojen tai sikojen pitopaikoista

Tuotantoympäristönäytteet (kostutetut sienet, vaahtomuovikuutiot, kankaat) tulevat enintään viiden näytteen yhteisnäytteinä ja ne tutkitaan siten, että lisätään 80 ml puskuroitua peptonivettä sientä, kangasta, vaahtomuovikuutiota tai sideharsotaitosta kohti.

3.7 Aluspaperit, alusmateriaalit ja sivelynäytteet kana-, broileri- ja kalkkunaemokasvattamojen sekä kanojen kasvattamojen untuvikkoparvien kuljetuslaatikoista

Aluspaperit tutkitaan viiden paperin yhteisnäytteenä. Viiden paperin esirikastamiseen tarvitaan 1 litra puskuroitua peptonivettä. Aluspaperit saapuvat laboratorioon pakattuna muovipussiin, viisi aluspaperia/pussi. Leikkaa pussi auki siten, että paperit jäävät muovin päälle. Kostuta paperit pipetoimalla niille osa esirikastukseen tarvittavasta puskuroidusta peptonivedestä. Leikkaa kostutetut paperit aseptisesti paloiksi ja siirrä ne steriiliin Stomacher-pussiin. Lisää joukkoon loppu osa puskuroitua peptonivettä.

Alusmateriaalit (muu kuin paperi) tutkitaan viiden kuljetuslaatikon yhteisnäytteenä. Yhteisnäytteen paino punnitaan ja materiaali siirretään steriiliin Stomacher-pussiin, johon lisätään puskuroitua peptonivettä siten, että näytettä on pussissa yksi osa ja puskuroitua peptonivettä yhdeksän osaa.

Jos emokasvattamojen kuljetuslaatikoissa ei käytetä alusmateriaalia, laatikoiden pohjista otetaan yhteensä kymmenen sivelynäytettä, jotka yhdistetään kahdeksi

Salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvien näytteiden käsittely ja koostaminen

yhteisnäytteeksi. Kanojen kasvattamojen kuljetuslaatikoista otetaan tässä tapauksessa viisi sivelynäytettä, jotka tutkitaan yhtenä yhteisnäytteenä. Näytteenottosienillä, kankailla, vaahtomuovikuutioilla tai harsotaitoksilla otetuista sivelynäytteistä siis viisi yhdistetään ja siirretään 400 millilitraan puskuroitua peptonivettä ja sekoitetaan hyvin.

3.8 Siipikarjan tossunäytteiden tutkiminen

Häkkikanalatyyppisiä siipikarjatiloja lukuun ottamatta siipikarjan ulostenäytteet tulevat tossunäytteinä. Tossut ovat imukykyisiä tossuja, putkilosukkia tai putkiloharsoja.

Tossunäytteet parvesta tulevat laboratorioon seuraavasti:

- kaksi yhden tossuparin (2 tossua) näytettä
 - kanojen, kalkkunoiden ja broilereiden emokasvatusparvet
 - kalkkunoiden ja broilereiden kasvatusparvet (omistaja)
- yksi yhden tossuparin (2 tossua) näyte
 - kanojen, kalkkunoiden ja broilereiden emokanaloiden parvet
 - kalkkunoiden ja broilereiden kasvatusparvet (virallinen)
- yksi kahden tossuparin (4 tossua) yhteisnäyte
 - kanojen kasvatus- ja kanaparvet
 - kalkkunoiden ja broilereiden kasvatusparvet kasvattamoista, joista luovutetaan siipikarjanlihaa vain suoraan kuluttajalle.

Kahden tossuparin (4 tossua) yhteisnäyte tai yhden tossuparin näyte avataan varovasti ja siirretään 225 millilitraan puskuroitua peptonivettä siten, ettei tossuihin takertunut ulostemateriaali irtoa siirrettäessä. Jos tossut eivät peity 225 ml puskuroitua peptonivettä, lisätään peptonivettä sen verran, että ne peittyvät, mutta ei yhtään enempää. Puskuroidussa peptonivedessä olevia näytteitä sekoitetaan niin, että uloste irtoaa.

Jos uusintänäytteenoton syynä on epäily virheellisestä tutkimustuloksesta, näytteiksi otetaan viisi tossuparia, jotka kukin pannaan erillisiin muovipusseihin ja tutkitaan laboratoriossa erikseen. Kukin tossupari laitetaan 225 ml puskuroitua peptonivettä. Jos ko. epäilytilanteessa pitopaikasta ei saada riittävästi pölyä, erikseen tutkittavia tossupareja voi tulla laboratorioon seitsemän paria.

Seitsemän erikseen tutkittavaa näytettä (5 ulostenäytettä, 2 pöly- tai sivelypölynäytettä) voi tulla myös esim. ruokamyrkytys-epidemiaepäilyssä. Parven suuren koon tms. seikan vuoksi voi myös tulla tavanomaista enemmän näytteitä. Näitä lisänäytteitä voidaan yhdistää, jos läheteessä on tästä maininta.

3.9 Siipikarjan ulostenäytteiden tutkiminen

Häkeissä pidettävistä emoparvista ja kanaparvista otetut näytteet tulevat laboratorioon kahtena vähintään 150 gramman yhteisulosteulostenäytteenä.

Emoparvien yhteisnäytteet tutkitaan kumpikin erikseen. Yhteisnäytteet punnitaan ja kumpikin laitetaan erikseen näytteen painoa vastaavaan tilavuuteen puskuroitua peptonivettä sekä sekoitetaan kevyesti. Näytteen annetaan pehmetä 10-15 minuutin ajan ja sekoitetaan uudelleen kevyesti. Sekoittamisen jälkeen punnitaan 50 g seosta 200 millilitraan puskuroitua peptonivettä.

Salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvien näytteiden käsittely ja koostaminen

Kanaparvien näytteet yhdistetään laboratoriossa huolellisesti sekoittamalla, minkä jälkeen seoksesta otetaan 25 gramman osanäyte 225 millilitraan puskuroitua peptonivettä.

Broileri- ja kalkkunakasvattamoista, joista luovutetaan siipikarjanlihaa tai kanaloista, joista luovutetaan kananmunia, vain suoraan kuluttajille, voivat näytteet tulla vähintään 100 gramman yhteisnäytteenä. Sekoitetusta näytteestä otetaan 25 gramman osanäyte, joka laitetaan 225 millilitraan puskuroitua peptonivettä.

Jos uusintanäytteenoton syynä on epäily virheellisestä tutkimustuloksesta, näytteiksi otetaan viisi 150 gramman painoista ulostenäytettä, jotka kukin pannaan erillisiin muovipusseihin ja tutkitaan laboratoriossa erikseen. Kukin 150 gramman näyte sekoitetaan huolellisesti, minkä jälkeen seoksesta otetaan 25 gramman osanäyte 225 millilitraan puskuroitua peptonivettä.

Jos ko. epäilytilanteessa pitopaikasta ei saada riittävästi pölyä, erikseen tutkittavia ulostenäytteitä voi tulla laboratorioon seitsemän.

Seitsemän erikseen tutkittavaa näytettä (5 ulostenäytettä, 2 pöly- tai sivelypölynäytettä) voi tulla myös esim. ruokamyrkytys-epidemia-epäilyssä. Parven suuren koon tms. seikan vuoksi voi myös tulla tavanomaista enemmän näytteitä. Näitä lisänäytteitä voidaan yhdistää, jos läheteessä on tästä maininta.

3.10 Sivelypölynäytteet kanojen, broilereiden ja kalkkunoiden emokanaloista, munivista kanaparvista sekä broilereiden ja kalkkunoiden kasvattamoista

Sivelypölynäytteet otetaan yhdellä tai useammalla kostutetulla kankaalla tai sienellä (yhteispinta-ala vähintään 900 cm²) ja pakataan samaan pussiin. Yhteisnäyte avataan varovasti ja siirretään 225 millilitraan puskuroitua peptonivettä siten, ettei kankaisiin / sieniin tarttunut materiaali irtoa siirrettäessä. Jos kankaat / sienet eivät peity 225 ml puskuroitua peptonivettä, lisätään peptonivettä sen verran, että ne peittyvät, mutta ei enempää. Puskuroidussa peptonivedessä olevia näytteitä sekoitetaan.

Jos uusintanäytteenoton syynä on epäily virheellisestä tutkimustuloksesta, näytteiksi otetaan pitopaikasta edellä kuvattujen tossu- tai ulostenäytteiden lisäksi kaksi sivelypölynäytettä. Sivelypölynäytteet tutkitaan kumpikin erikseen yllä kuvatulla tavalla.

3.11 Pölynäytteet kanalasta

Kanalan pölynäytteeseen kerätään pölyä eri puolilta kanalaa vähintään 250 ml ja 100 grammaa. Pöly punnitaan ja sekoitetaan sen painoa vastaavaan tilavuuteen puskuroitua peptonivettä. Pölyn annetaan liueta 10-15 minuuttia. Pölyn liuettua näytettä sekoitetaan kevyesti ja 50 grammaa seosta siirretään 200 millilitraan puskuroitua peptonivettä. Pölynäytteiden käsittelyssä on oltava erityisen huolellinen ristikontaminaatioiden välttämiseksi.

Jos uusintanäytteenoton syynä on epäily virheellisestä tutkimustuloksesta, näytteiksi otetaan pitopaikasta edellä kuvattujen tossu- tai ulostenäytteiden lisäksi kaksi pölynäytettä. Pölynäytteet tutkitaan kumpikin erikseen yllä kuvatulla tavalla.

Salmonellavalvontaohjelmaan kuuluvien näytteiden käsittely ja koostaminen

3.12 Hautomon tuotantoympäristö- ja pitopaikan pintapuhtausnäytteet

Näytteenottosieniä, kankaita, vaahtomuovikuutioita tai sideharsotaitoksia esirikastetaan 1-5 kpl siten, että puskuroitua peptonivettä lisätään 80 ml sientä, kangasta, vaahtomuovikuutiota tai sideharsotaitosta kohti.

Yhdistettäessä on otettava huomioon se, että mahdolliset salmonellapositiiviset löydökset täytyy pystyä kohdistamaan lähetteen mukaiseen näytteenottokohtaan (esimerkiksi hautomon eri osien näytteitä ei yhdistetä).

3.13 Rehuympäristönäytteet

Rehuympäristönäytteet (kostutetut sienet, vaahtomuovikuutiot, kankaat) tulevat yksittäin pakattuina ja ne tutkitaan erikseen edellä kuvatuilla tavoilla.

4 Näytteiden tutkiminen

Näytteet tutkitaan NMKL- tai ISO - menetelmän uusimpien painosten mukaisesti. Siipikarjan, nautojen ja sikojen uloste- ja tuotantoympäristönäytteet on tutkittava ISO 6579:2002, Amendment 1:2007 – standardin mukaisella MSRV – menetelmällä. Teurastamossa ja leikkaamossa otetut imusolmuke-, ruho-, kaulanahka- ja liha/lihamurskanäytteet on tutkittava ISO 6579:2002 –menetelmällä, ISO 6579:2002/muutos 1:2007 –menetelmällä, NMKL N:o 71:1999 –menetelmällä tai NMKL N:o 187:2007 –menetelmällä. Jauhelihan ja raakalihavalmisteiden tutkimisessa voidaan käyttää myös vaihtoehtoista menetelmää, jos menetelmä on validoitu ISO 6579:2002 –menetelmää vastaan EN/ISO 16140 –standardin mukaisesti.

5 Muutokset edelliseen versioon

Tämän ohjeen laadinta: Tuula Johansson ja Henry Kuronen
Työohje 6002/liite1 muutettiin menetelmäohjeen liitteeksi.