

**Opphavs-
rett**

**NORDISK METODIKKOMITÉ FOR
LEVNEDSMIDLER**
NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS

**Copyright
notice**

Opphavsrett

NMKL har opphavsretten på samtlige NMKL metoder. Det er ikke lov verken å reprodusere metoder eller deler av metoder ei heller å lagre dette i gjengangsystemer (som store databaser, intranettsystemer) eller overføre det til andre i noen som helst form, elektronisk, fotostatkopiering, avspilling eller liknede uten at skriftlig tillatelse er gitt.

Forespørsel om tillatelse rettes til
NMKLs generalsekretær, Hilde Skår Norli
c/o Veterinærinstituttet,
PB 750, Sentrum
N-0106 Oslo, Norge
e-post: nmkl@vetinst.no

Reproduksjon kan medføre krav om avgift til innehaver. Overtredelse kan bli rettslig forfulgt.

www.nmkl.org

Copyright notice

All NMKL methods are copyright-protected by NMKL. Neither the methods nor any extract from methods may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted to others in any form or by any means, electronic, photocopying, recording or otherwise, without prior written permission being secured.

Request for permission to produce should be addressed to NMKL Secretary General
Hilde Skaar Norli
c/o National Veterinary Institute
PB 750, Sentrum N-0106 Oslo, Norway
e-mail: nmkl@vetinst.no

Reproduction may be subjected to royalty payments. Violators may be prosecuted.

www.nmkl.org

**SALMONELLA.
OSOITTAMINEN
ELINTARVIKKEISTA.**

Menetelmä on validoitu kollaboratiivisessa testauksessa.

1. TARKOITUS JA KÄYTTÖALUE

Menetelmä on tarkoitettu salmonellojen osoittamiseen elintarvikkeista. Menetelmä soveltuu kaikenlaisille elintarvikkeille.

2. MÄÄRITELMÄ

Salmonellasuku kuuluu *Enterobacteriaceae*-heimoon. Sukuun kuuluu noin 2300 serotyyppiä.

Salmonellabakteeri on fakultatiivisesti anaerobinen gram-negatiivinen sauva. Se liikkuu peritrikkisten flagellojen avulla, mutta liikkumattomia mutanteja voi esiintyä. Lisäksi eräs serotyyppi (*S. Gallinarum*) on aina liikkumaton. Salmonellabakteeri muodostaa happoa glukoosista ja mannitolista, mutta ei sakkaroosista eikä laktoosista. Se ei muodosta indolia eikä hajota ureaa. Useimmat muodostavat rikkivetyä ja dekarboksyloivat ornitiinia ja lysiniä.

Salmonellasuku jaetaan somaattisten (O) ja flagella-(H) antigeenien perustella serotyyppeihin Kauffmann-White'n kaavan mukaan. Serotyypit Enteritidis, Typhi, Paratyphi ja Typhimurium faagityypitetään.

3. KIRJALLISUUSVIITTEET

3.1 NMKL menetelmä nro 91, 2. painos, 1988: Elintarvikkeiden esikäsittely mikrobiologista tutkimusta varten.

3.2 NMKL raportti nro 5, 2. painos, 1994: Laadunvarmistusohjeita mikrobiologisille laboratorioille.

3.3 Peterz, M., Wiberg, C. and Norberg, P. (1989): The effect of the incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in homemade and in commercially

**SALMONELLA.
DETECTION IN FOODS.**

This NMKL method has been validated in a collaborative study.

1. SCOPE AND FIELD OF APPLICATION

This method describes the detection of *Salmonella* in foods. The method is applicable to all kinds of foodstuff.

2. DEFINITION

The genus *Salmonella* comprises about 2300 serotypes and belongs to the family *Enterobacteriaceae*.

Salmonellae are facultatively anaerobic Gram negative rods. They are motile with peritrichous flagella, but unmotile mutants may occur, and one serotype (*Gallinarum*) is always non-motile. *Salmonella* strains produce acid from glucose and mannitol but not from saccharose and lactose. They do not produce indole and do not decompose urea. Most types produce hydrogen sulphide and decarboxylate ornithine and lysine.

The genus *Salmonella* is divided into serotypes after the Kauffmann-White scheme according to its somatic (O) and flagella (H) antigens. Some serotypes (Enteritidis, Typhi, Paratyphi and Typhimurium) are phage typed.

3. REFERENCES

3.1 NMKL method No. 91, 2nd ed., 1988: Pre-treatment of foods for microbiological examination.

3.2 NMKL Report No. 5, 2nd ed., 1994: Quality Assurance Guidelines for Microbiological Laboratories.

3.3 Peterz, M., Wiberg, C. and Norberg, P. (1989): The effect of the incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in homemade and in commercially

available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. J. Appl. Bacteriol. 66, 523-528.

3.4 Maijala, R., Johansson, T. and Hirn, J. (1992): Growth of *Salmonella* and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV)-media. Int. J. Food Microbiol. 17, 1-8.

4. PERIAATE

Salmonellatutkimus on kvalitatiivinen ja vastaus ilmoitetaan: *Salmonella* todettu/ei todettu tutkitussa näytämäärässä.

Salmonellatutkimukseen kuuluu neljä vaihetta. Nämä vaiheet ovat välttämättömiä, koska salmonella esiintyy yleensä pieninä pitoisuuksina ja solut saattavat olla vaurioituneita. Lisäksi näyte useinkin sisältää runsaasti muita *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereita.

4.1 Esirikastus. Tietty määrä näytettä esirikastetaan ei-selektiivisessä elatusaineessa (puskuroidussa peptonivedessä) 37°C:ssa noin 18 tuntia.

4.2 Rikastus. Tietty määrä esirikastetta siirrostetaan selektiiviseen rikastusliemeen (Rappaport-Vassiliadis soijapeptoniliemi) ja inkuboidaan 42°C:ssa noin 24 tuntia.

4.3 Viljely kiinteälle selektiiviselle elatusaineelle. Selektiivistä rikastetta viljellään hajotusviljelyinä kahdelle kiinteälle selektiiviselle agarelatusaineelle (Ksyloosi-lysiini-desoksikolaatti-agar ja lisäksi toinen valinnainen elatusaine), jotka inkuboidaan 37°C:ssa noin 24 tuntia.

4.4 Varmistus. Tyypillisistä ja/tai epäillyistä salmonellapesäkkeistä tehdään puhdasviljelmät sopivalle kiinteälle elatusaineelle ja varmistetaan biokemiallisesti ja serologisesti.

5. ELATUSAINEET

Ensisijaisesti suositellaan kaupallisten kuivaelatusaineiden käyttöä. Ne valmistetaan valmistajan ohjeiden mukaisesti. Ellei toisin ole mainittu, niiden koostumus voi hieman poiketa tässä menetelmässä esitetystä elatusaineista. Käytettyjen kemikaalien tulisi olla "mikrobiologista laatua" tai sitäkin puhtaampia. Tislattua vettä tai vähintään vastaavan laatuista vettä tulisi käyttää liuosten ja elatusaineiden valmistamiseen.

Käyttövalmiit elatusaineet ja liuokset on säilytettävä,

available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. J. Appl. Bacteriol. 66, 523-528.

3.4 Maijala, R., Johansson, T. and Hirn, J. (1992): Growth of *Salmonella* and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV)-media. Int. J. Food Microbiol. 17, 1-8.

4. PRINCIPLE

This method is a qualitative method only, and the result is reported as: *Salmonella* detected/not detected in the amount of sample taken.

Four separate steps are required to detect *Salmonella* most efficiently. These steps are necessary because *Salmonella* often occur in low numbers, sometimes sublethally injured, and often in the presence of much greater numbers of other bacteria of the *Enterobacteriaceae* family.

4.1 Pre-enrichment. A certain amount of sample is pre-enriched in a non-selective medium (buffered peptone water) at 37°C for about 18 hours.

4.2 Enrichment. A certain amount of pre-enriched sample is transferred to a selective enrichment broth (Rappaport-Vassiliadis soy peptone broth) and is incubated at 42°C for about 24 hours.

4.3 Plating out. An aliquot from the selective enrichment broth is inoculated to two selective agar plates (Xylose lysine desoxycholate agar and a further agar plate free of choice), which is incubated at 37°C for about 24 hours.

4.4 Confirmation. Presumptive salmonellae are subcultured on a suitable plate and are biochemically and serologically verified.

5. CULTURE MEDIA

Dehydrated commercially available culture media are primarily recommended. Such media are prepared according to the manufacturer's instructions. If not otherwise stated, the composition of the media may deviate somewhat from those described below. The chemicals used should be of the quality "for microbiology" or purer. Distilled water or purified water of at least the same quality should be used for the preparation of solutions and media.

Prepared media and solutions should, if not otherwise stated, be stored in the dark at ca. 4°C (4±2°C) for not

ellei toisin ole mainittu, pimeässä ja kylmässä noin 4°C:ssa (4±2°C) enintään kuukauden ajan. Elatusainemaljoiden kuivumisen estämiseksi agarkerroksen on oltava riittävän paksu (noin 4 mm). Mikäli maljoiden pinnalla on kosteutta, maljat tulee kuivattaa ennen käyttöä (kannet poistettuna agaripinta alaspäin) 37°C:ssa 30 minuuttia tai kunnes agarin pinta on kuiva.

longer than one month. Poured plates should be thick enough – ca. 4 mm - to avoid drying out. Immediately prior to use, it should be checked that the surface of the plate is dry. If necessary, the plates are dried (with lids removed and with the agar surface downward) at 37°C for 30 min, or until the agar surface is dry.

5.1 Puskuroitu peptonivesi

Peptoni	10,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Dinatriumvetyfosfaatti (Na ₂ HPO ₄)	3,6 g
Kaliumdivetyfosfaatti (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Tislattu vesi	1000 ml

Liuota ainesosat veteen keittämällä. Jaa liuos sopiviksi annoksiksi (normaalisti 225 ml) pulloihin. Autoklavoi 121°C:ssa 15 minuuttia. Steriloinnin jälkeen tulee käyttövalmiin elatusaineen pH:n olla 7,0±0,2 mitattuna 25°C:ssa.

5.1 Buffered peptone water

Peptone	10.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	3.6 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Distilled water	1000 ml

Dissolve the components in the water by boiling. Distribute the solution in suitable portions (normally 225 ml) to flasks. Autoclave at 121°C for 15 min. Adjust the pH so that after sterilization it is 7.0±0.2 at 25°C.

5.2 Rasvaton maitojauhe -liemi

Rasvaton maitojauhe (esim. "Skim milk powder" tai "Bacto skim milk")	100 g
Briljanttivihreä	0,02 g
Tislattu vesi	1000 ml

Liuota ainesosat veteen, mahdollisesti lämmittämällä. Autoklavoi 121°C:ssa enintään 15 minuuttia, koska muutoin maitosokeri voi karamellisoitua. Steriloinnin jälkeen tulee käyttövalmiin elatusaineen pH:n olla 6,8±0,2 mitattuna 25°C:ssa.

5.2 Skim milk broth

Skim milk powder (e.g. "Skim milk powder" or "Bacto skim milk")	100 g
Brilliant green	0.02 g
Distilled water	1000 ml

Dissolve the ingredients in the water, eventually by heating. Autoclave at 121°C for a maximum of 15 min, otherwise there is the risk of caramelization. Adjust the pH so that after sterilization it is 6.8±0.2 at 25°C.

5.3 Rappaport-Vassiliadis soijapeptoni(RVS)-liemi

5.3.1 Peruselatusaine

Soijapeptoni	5,0 g
Natriumkloridi	8,0 g
Kaliumdivetyfosfaatti (KH ₂ PO ₄)	1,4 g
Dikaliumvetyfosfaatti (K ₂ HPO ₄)	0,2 g
Tislattu vesi	1000 ml

Lämmitä noin 80°C:een, niin että kaikki ainesosat liukenevat. Valmista tämä liuos samana päivänä kuin täydellinen RVS-elatusaine.

5.3 Rappaport-Vassiliadis soy peptone (RVS) broth

5.3.1 Base

Soy peptone	5.0 g
Sodium chloride	8.0 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	1.4 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	0.2 g
Distilled water	1000 ml

Heat to about 80°C to dissolve all ingredients. Prepare this solution on the same day as the complete RVS medium is prepared.

5.3.2 Magnesiumkloridiliuos

Magnesiumkloridi (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	400 g
Tislattu vesi	1000 ml

Liuota magnesiumkloridi veteen. Tämä suola on hyvin hygroσκοoppista. Sen vuoksi koko avatun

5.3.2 Magnesium chloride solution

Magnesium chloride (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	400 g
Distilled water	1000 ml

Dissolve the salt in the water. Because this salt is very hygroscopic, it is advisable to dissolve the entire

pakkauksen sisältö tulisi liuottaa tislattuun veteen. Magnesiumkloridiliuos voidaan säilyttää ilman sterilointia tummassa kierrekorkillisessa pullossa, huoneenlämmössä 2 vuotta.

contents of a newly opened container in distilled water. The magnesium chloride solution can be stored unsterilized, in a dark bottle with screw cap, at room temperature for 2 years.

5.3.3 Malakiittivihreäliuos

Malakiittivihreäoksalaatti	0,4 g
Tislattu vesi	100 ml

Liuota suola veteen. Liuos voidaan säilyttää sterilioimattomana tummassa kierrekorkillisessa pullossa, huoneenlämmössä 8 kuukautta.

5.3.3 Malachite green solution

Malachite green oxalate	0.4 g
Distilled water	100 ml

Dissolve the salt in the water. The solution can be stored unsterilized, in a dark bottle with screw cap, at room temperature for 8 months.

5.3.4 Täydellinen elatusaine

Peruselatusaine (5.3.1)	1000 ml
Magnesiumkloridiliuos (5.3.2)	100 ml
Malakiittivihreäliuos (5.3.3)	10 ml

Sekoita liuokset huolellisesti yllämainitussa järjestyksessä. Jaa liuos 10 ml annoksiin kierrekorkillisiin putkiin. Autoklavoi 115°C:ssa 15 minuuttia. Steriloinnin jälkeen tulee käyttövalmiin elatusaineen pH:n olla 5,2±0,2 mitattuna 25°C:ssa. Käyttövalmis elatusaine voidaan säilyttää kierrekorkillisissa putkissa noin 4°C:ssa 4 kuukautta.

5.3.4 Complete medium

Base (5.3. 1)	1000 ml
Magnesium chloride solution (5.3.2)	100 ml
Malachite green solution (5.3.3)	10 ml

Mix the solutions well in the order specified above. Distribute the solution in portions of 10 ml to tubes with screw caps. Autoclave at 115°C for 15 min. Adjust the pH so that after sterilization it is 5.2±0.2 at 25°C. The ready-to-use medium can be stored, in tubes with screw caps, at about 4°C for 4 months.

Käyttövalmiin RVS-liemen MgCl₂ · 6 H₂O -pitoisuuden (sisältäen 6 H₂O) tulee olla 29 g/l. Liemen toimivuuden kannalta on tärkeää, että pitoisuus on oikea. Siksi kaupallisia kuivaelatusaineita käytettäessä on pitoisuus aina tarkastettava.

As the amount of MgCl₂ · 6 H₂O is very important for the RVS medium to function satisfactorily, it is necessary, when using commercially available dehydrated media, to ascertain that the amount is about 29 g/l in the ready-to-use medium.

5.4 Ksyloosi-lysiini-desoksikolaatti (XLD)-agar

Hiiuvauute	3,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Ksyloosi	3,75 g
Laktoosi	7,5 g
Sakkaroosi	7,5 g
L-lysiini-HCL	5,0 g
Natriumtiosulfaatti	6,8 g
Rauta(III)ammoniumsitraatti	0,8 g
Fenolipuna	0,08 g
Natriumdesoksikolaatti	1,0 g
Agar	15,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Liuota ainesosat veteen. Kuumenna koko ajan sekoittaen, kunnes elatusaine alkaa kiehua. Vältä ylikuumentamista. Vältä suurten tilavuuksien valmistamista, koska tämä pidentää kuumennusaikaa. Siirrä liuos välittömästi vesihauteeseen, joka on temperoitu noin 50°C:een. Jatka sekoittamista,

5.4 Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar

Yeast extract	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Xylose	3.75 g
Lactose	7.5 g
Sucrose	7.5 g
L-Lysine hydrogen chloride	5.0 g
Sodium thiosulphate	6.8 g
Iron(III)ammonium citrate	0.8 g
Phenol red	0.08 g
Sodium desoxycholate	1.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml

Dissolve the components in the water. Heat under constant stirring until the medium starts to boil. Avoid over-heating. Avoid preparing too large volumes of medium, as this requires prolonged heating. Immediately transfer the solution to a water bath tempered to about 50°C, continue stirring until the

kunnes elatusaineen lämpötila on noin 50°C. Steriloinnin jälkeen tulee käyttövalmiin elatusaineen pH:n olla 7,4±0,2 mitattuna 25°C:ssa. Valmiita agarmaljoja voidaan säilyttää pimeässä muovipussiin pakattuna enintään 14 päivää noin 4°C:ssa.

Elatusaineen selektiivisyyden lisäämiseksi siihen voidaan lisätä natriumnovobiosiinia. Kun elatusaine on jäähdetty noin 50°C:een, lisätään 10 ml 0,15 % steriilisuodatettua natriumnovobiosiinin vesiliuosta.

6. LAITTEISTO

6.1 Lämpökaappi 37,0±1,0°C

6.2 Vesihaude (veden kierrätyksellä) 42,0±0,2°C, vaihtoehtoisesti lämpökaappi 41,5±0,5°C. Lämpökaappia voidaan käyttää, mikäli alla olevat ehdot täyttyvät.

Vesihaudetta käytetään rikastusliemen (RVS) inkubointiin. Tarkka inkubointilämpötila on tärkeä tekijä rikastuksen optimoimiseksi. Optimaalinen rikastuslämpötila on 42,0°C. Vesihauteen lämpötilanvaihtelu on ajan ja tilavuuden suhteen minimaalinen verrattuna lämpökaappiin. Tällä hetkellä saatavissa olevien parhaimpien lämpökaappien (joissa on inkubaattori-ilman kierrätys puhaltimella) lämpötilanvaihtelu ajan ja tilavuuden suhteen on noin 1°C. Jotta vesihauteen sijasta voitaisiin käyttää (puhaltimella varustettua) lämpökaappia, tulee varmistautua mittauksin siitä, että lämpötila ajallisesti ja koko tilavuudelta pysyy 41,5±0,5°C:ssa. Tämä on erityisen tärkeää, mikäli lämpökaapin koko tilavuutta käytetään monien rikastusliemien inkubointiin.

7. NÄYTTEENOTTO

Näytteet otetaan tavanomaisen mikrobiologisen käytännön mukaisesti (3.1).

Otettaessa näytteitä salmonellatutkimuksiin on tärkeää tietää mahdollinen saastutuskohta. Esim. tutkittaessa pakastettua lihaa, näyte on otettava lihan pinnasta mahdollisimman laajalta alueelta. Tutkittaessa jauheita tai hiutalemaisia tuotteita, on näytteen määrä sen sijaan ratkaiseva. Tällöin näytteeksi on suositeltavaa ottaa tavallista suurempia näytemääriä, esim. 100 g. Mikäli mahdollista, otetaan näyte useasta pakkauksesta. Näytteet tutkitaan joko erikseen tai yhteisnäytteenä.

Tutkittaessa raakaa siipikarjan lihaa menetelmän herkkyys kasvaa, jos esirikastetaan koko lintu. Vaihtoehtoisesti voidaan näytteeksi ottaa vähintään

medium has reached about 50°C. Adjust the pH so that after heating it is 7.4±0.2 at 25°C. Poured agar plates can be stored for a maximum of 14 days, stored in plastic bags in the dark, at about 4°C.

Sodium novobiocin can be added in order to increase the selectivity of the medium. Add, after cooling of the medium to about 50°C, 10 ml of a 0.15% filter-sterilized aqueous solution of sodium novobiocin.

6. APPARATUS

6.1 Incubator for incubation at 37.0±1.0°C

6.2 Water-bath (with circulation), controllable at 42.0±0.2°C. An incubator can be used, on condition that the requirements below are fulfilled.

The water-bath is used for incubation of the enrichment broth. An exact incubation temperature is a very important factor for optimal enrichment with this substrate. The optimal enrichment temperature is 42.0°C. A water-bath has a minimal variation of temperature in time and space compared to an incubator. The best incubators today (equipped with a fan for re-circulation of the air in the incubator) have a variation of temperature in time and space of about 1°C. Therefore, before you use an incubator (equipped with a fan) instead of a water-bath, you should measure the temperature in time and in the whole space of the incubator, to control that the temperature is maintained within 41.5±0.5°C. This is especially important when the whole space of the incubator is used for incubation of many enrichment broths.

7. SAMPLING

Take samples according to established bacteriological practice (3.1).

When sampling for *Salmonella* examinations it is important to have some knowledge about the probable sites of the *Salmonella* contamination. For example when sampling frozen meat, the sample must be taken from an area as large as possible, because possible contamination will be on the surface. When sampling dry powder or cereals, on the other hand, the quantity of the sample is crucial. It is desirable to take larger samples of this type of products, e.g. 100 g. If many packages are available, several packages should be sampled. These samples are either examined separately or are well mixed and examined as a composite sample. When sampling whole raw poultry the detection frequency increases if the whole bird is pre-enriched.

25 g kaulanahkaa. Mikäli kaulanahkaa ei ole, otetaan näytteeksi nahkaa muista linnun osista.

8. SUORITUS

8.1 Näytteen esikäsitely

Näyte sekoitetaan hyvin. Näytteeksi otetaan vähintään 25g (määrän tulee olla tarkka). Tarvittaessa näyte homogenoidaan.

8.2 Esirikastus

8.2.1 Tavanomainen esirikastus

Periaatteena on lisätä 1 osa näytettä 9 osaan puskuroitua peptonivettä (5.1). Näyte (25g) punnitaan pulloon, jossa on 225 ml puskuroitua peptonivettä.

8.2.2 Esirikastus – erityistapaukset

Eräiden elintarvikkeiden esirikastamiseen tulee käyttää tavanomaisesta poikkeavia rikasteliemiä tai muuta laimennossuhdetta kuin 1:10. Syynä voi olla se, että elintarvikkeessa on luonnostaan salmonellalle toksisia aineita tai että elintarvikkeen koostumus on erityislaatuinen.

Raaka siipikarja: Siirrä koko lintu suureen vahvaan muovipussiin. Lisää 1 l puskuroitua peptonivettä (5.1). Ravista voimakkaasti vähintään 30 sekuntia niin, että peptonivesi huuhtelee koko linnun. Inkuboi koko nestemäärä ohjeen 8.2.3 mukaisesti.

Kuivamaitotuotteet: Punnitse 25 g näytettä 225 ml:aan puskuroitua peptonivettä (5.1). Älä sekoita, vaan anna pullon seistä huoneenlämmössä 60±10 minuuttia. Sekoita sen jälkeen niin, että näyte liukenee kokonaan, ja inkuboi kohdan 8.2.3 mukaisesti.

Yrtit, mausteet ja elintarvikkeet, joissa on vahvasti turpoavia aineita: Normaalin 1:10 laimennussuhteen sijasta voidaan käyttää suhdetta 1:100, jotta vältetään näytteen estävien aineiden vaikutukset tai näytteen epätäydellinen homogenoituminen.

Kaseiini, juusto, voi ja vastaavat tuotteet: Jotta nämä tuotteet saataisiin täydellisesti homogenisoiduksi, esilämmitetään puskuroitu peptonivesi (5.1) ennen käyttöä noin 40°C:ksi.

Kaakaota sisältävät tuotteet: Sekoita 25 g näytettä 225 ml:aan kuorittu maito -lientä (5.2). Suklaan homogenoimiseksi liemi on esilämmitettävä noin 40°C:een.

Alternatively, 25 g of neck skin may be taken - or other skin if the neck is not available.

8. PROCEDURE

8.1 Sample pre-treatment

The sample is mixed well and a sample of at least 25 g (exact amount) is taken. If needed the sample is homogenized.

8.2 Pre-enrichment

8.2.1 Normal pre-enrichment

The principle is to take 1 part of sample and 9 parts of buffered peptone water (5.1). If 25 g has been taken, transfer the sample to a flask containing 225 ml buffered peptone water.

8.2.2 Pre-enrichment – certain foods

Some foods require special pre-enrichment broths. The reason may be either that the food contains naturally occurring substances that are toxic to *Salmonella*, or may be connected with other aspects of the composition of the food. These negative effects can be suppressed by using a special pre-enrichment broth or other dilution ratio than 1:10.

Raw poultry: Place the whole bird in a large strong plastic bag. Add 1 L buffered peptone water (5.1). Shake vigorously for at least 30 sec so that the peptone water rinses the whole bird. Incubate the entire broth as described below (8.2.3).

Dried milk products: Add 25 g sample to 225 ml pre-enrichment broth (5.1). Without mixing, allow the flask to stand undisturbed at room temperature for 60±10 min. Thereafter, mix the content until it is completely dissolved and incubate as described below (8.2.3).

Herbs, spices and foodstuffs containing heavily swelling agents: A dilution factor of 1:100 could be used instead of the normal 1:10 to eliminate the effects of inhibitory substances in the sample or incomplete homogenization of the sample.

Casein, cheese, butter and similar products: For complete homogenization of these products, pre-enrichment broth (5.1) could be pre-warmed to about 40°C prior to use.

Products containing cocoa: Mix a 25 g sample with 225 ml skim milk broth (5.2). For the homogenization of chocolate, the broth must be pre-warmed to about 40°C.

Kookos ja sen kaltaiset tuotteet, joiden rasvapitoisuus on hyvin korkea: Sekoita 25 g näytettä 225 ml:aan puskuroitua peptonivettä (5.1). Lisää sen jälkeen 2-3 pisaraa Triton X-100.

8.2.3 Esirikasteliemien inkubointi

Esirikasteliemet inkuboidaan $37,0\pm 1,0^{\circ}\text{C}$:ssa 18 ± 2 tuntia. Mikäli annettua inkubointiaikaa ei voida noudattaa käytännön syistä, inkubointiaikaa voidaan pidentää 21 ± 3 tuntiin.

8.3 Rikastus

8.3.1 Esirikaste sekoitetaan. Siitä siirretään 0,1 ml 10 ml:aan RVS-lientä (5.3), joka on esilämmitetty inkubointilämpötilaan.

8.3.2 Inkuboi vesihauteessa $42,0\pm 0,2^{\circ}\text{C}$:ssa (tai inkubaattorissa $41,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$:ssa, katso 6.2) 24 ± 3 tuntia. Vaihtoehtoisesti inkubointiaikaa voidaan pidentää 48 ± 4 tuntiin.

8.4 Viljely kiinteälle selektiiviselle elatusaineelle

8.4.1 Ota silmukalla materiaalia rikasteesta ja viljele hajotusviljelmäksi XLD-agarmaljan (5.4) pinnalle. Toista viljely valinnaiselle selektiiviselle elatusaineelle. Maljan koko pinta on käytettävä siten, että saadaan erillisiä pesäkkeitä.

Esimerkkejä valinnaisista kiinteitä selektiivisiä elatusaineita ovat briljanttivihreä-fenolipuna-agar, Rambach-agar ja mannitoli-lysiini-kristallivioletti-briljanttivihreä(MLCB)-agar. MLCB-agarin etuna on, että laktoosi- ja sakkaroosipositiiviset pesäkkeet voidaan todeta helposti.

8.4.2 Inkuboi maljat ylösalaisin käännettyinä $37,0\pm 1,0^{\circ}\text{C}$:ssa 24 ± 3 tuntia.

8.5 Lukeminen

XLD-agar: Tyypillinen salmonellapesäke on mustakeskustainen ja sen reunassa on hieman läpinäkyvä, punertava vyöhyke. Melkein aina (erityisesti kun salmonellakasvu on massiivisen runsas) näkyy elatusaineessa pesäkkeiden ympärillä vaihtelevan suuruinen vaaleanpunainen-punainen vyöhyke.

Coconut and similar products with a very high fat content: Mix 25 g of sample with 225 ml buffered peptone water (5.1). Then add 2-3 drops of Triton X-100.

8.2.3 Incubation of pre-enrichment broths

Incubate all samples at $37.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 18 ± 2 hours. If the stated incubation time can not be used for practical reasons the time could be extended to 21 ± 3 hours.

8.3 Enrichment

8.3.1 Mix the pre-enrichment broth prior to removal and transfer of 0.1 ml pre-enrichment broth to 10 ml Rappaport-Vassiliadis soy peptone broth (5.3), which has been pre-warmed to the incubation temperature.

8.3.2 Incubate in a water-bath at $42.0\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (or incubator at $41.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, see 6.2) for 24 ± 3 hours. As an alternative, the incubation time can be extended to 48 ± 4 hours.

8.4 Spreading on agar plates

8.4.1 Using a loop take material from the enrichment broth and inoculate on the surface of an XLD agar plate (5.4). Repeat the procedure on another optional and selective plate. Use the whole surface of the plate in order to get well-isolated colonies. Begin with a main streak from the edge of the plate and downwards about one third. Continue with the same loop and make a secondary streak – starting at the beginning of the main streak and diagonally towards this – from edge to edge over the whole surface of the plate.

Example of optional plates is brilliant green phenol red, Rambach- and mannitol lysine crystal violet brilliant green (MLCB) agar. One advantage of the MLCB agar plate is that lactose- or saccharose positive colonies can easily be detected.

8.4.2 Incubate the plates in inverted position at $37.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 24 ± 3 hours.

8.5 Reading

XLD agar plate: A typical *Salmonella* colony has a slightly transparent zone of reddish colour due to the indicator change in the medium, and has a black centre. Almost always (especially in the case of massive *Salmonella* growth) a larger or smaller pink-red zone is seen in the medium surrounding the colonies.

8.6 Varmistus

Tyypilliset ja/tai epäiltävät pesäkkeet varmistetaan biokemiallisesti ja serologisesti.

Maljoilta poimitaan vähintään viisi tyypillistä tai epäiltävää pesäkettä, jotka viljellään puhtaaksi sopivalle ei-selektiiviselle agarelatusaineelle siten, että saadaan erillisiä pesäkkeitä. Maljat inkuboidaan $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$:ssa, kunnes saadaan varmistusta varten riittävästi kasvustoa.

8.6.1 Biokemiallinen varmistus

Biokemiallisessa varmistuksessa käytetään tavanomaisia salmonellan biokemialliseen identifiointiin tarkoitettuja testejä. Myös kaupallisia testisarjoja voidaan käyttää, jos ne valmistajan ilmoituksen mukaan on tarkoitettu salmonellojen identifiointiin. Sopivia testejä ovat Triplesugar-iron(TSI)-agar, mannitoli, urea, ornitiinidekarboksylaasi ja lysiinidekarboksylaasi.

8.6.2 Serologinen varmistus

Serologinen varmistus tehdään fysiologisella keittosuolaliuoksella (auto-agglutinoivien kantojen eliminoimiseksi), salmonellapolyvalentilla O-antiserumilla sekä salmonellapolyvalentilla H-antiserumilla.

Täydellistä serologista tyypitystä varten kanta lähetetään hyväksytyyn salmonella-referenssilaboratorioon.

9. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tutkimustulos ilmoitetaan: *Salmonella* todettu / ei todettu 25 g:ssa näytettä tai tutkitussa näytemäärässä.

Vastausta täydennetään serotyypillä heti kun tulos saadaan.

10. KOLLABORATIIVISEN TESTAUKSEN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖS

Menetelmän kollaboratiivisessa testauksessa käytettiin ISO 6579:1993-menetelmää referenssimenetelmänä. Näillä kahdella menetelmällä saatuja tuloksia arvioitiin tilastollisesti ja verrattiin McNemar-testillä, joka antoi χ^2 -arvon 1,23. Mikäli testin antama χ^2 -arvo on suurempi kuin 3,84, eroavat menetelmien antamat tulokset tilastollisesti merkitsevästi 5% tasolla. ISO- ja NMKL-menetelmien antamat tulokset eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi.

8.6 Confirmation

Presumptive colonies should be verified biochemically and serologically.

Pick from agar plates used at least five colonies believed to be typical or presumptive, and inoculate on a suitable non-selective plate, so that well isolated colonies are developed. Incubate the plates at $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ until a good growth for the confirmation is developed.

8.6.1 Biochemical confirmation. In the biochemical verification an established test for the biochemical identification of *Salmonella* should be used. So-called mini-diagnostics may also be used, if they, according to the manufacturer, are designed for *Salmonella* identification. Suitable tests may be Triple sugar iron (TSI) agar, mannitol, urea, ornithin decarboxylase and lysine decarboxylase.

8.6.2 Serological confirmation. Serological confirmation should be performed against physiological saline solution (to eliminate auto-agglutinating strains), *Salmonella* polyvalent O-antiserum and *Salmonella* polyvalent H-antiserum.

For complete serological typing, send the strain to a recognized reference laboratory for *Salmonella*.

9. REPORTING OF RESULTS

According to the result, state: *Salmonella* detected or not detected in 25 g sample (or the amount analyzed).

As soon as the serotyping is complete, the result can be supplemented with serotype.

10. RESULTS OF THE COLLABORATIVE STUDY AND CONCLUSION

In the collaborative study of this NMKL method ISO 6579:1993 was used as the reference method. The results obtained using the two methods were statistically evaluated and compared by means of a McNemar test, which gave a χ^2 value of 1.23. In this test a χ^2 value of above 3.84 indicates a statistically significant difference between the two methods at the 5% level. Therefore the observed difference in the performance of the ISO and the NMKL methods was not statistically significant.

11. MENETELMÄN REFERENTTI

NMKL-menetelmän 71:1991 on uusintu Christer Wiberg, (Livsmedelsverket, Box 622, SE-751 26 UPPSALA, SVERIGE).

11. REFEREE OF THE METHOD

This revised NMKL method has been elaborated by Christer Wiberg, National Food Administration, Box 622, SE-751 26 UPPSALA, SWEDEN.

©NMKL
c/o National Veterinary Institute
PO Box 8156 Dep.,
N-0033 OSLO,
NORWAY