

Elintarvikemikrobiologia

Tunnus: MELI-salmonella NMKL
Versio: 6.6
Vastuuhenkilö: Eeva Klemetilä-Kirjavainen
Päiväys: 11.1.2013

SALMONELLA -SUVUN BAKTEERIEN MÄÄRITYS RIKASTUSMENETELMÄLLÄ

Yleistä

Salmonella-sukuun kuuluu kaksi lajia *Salmonella Enterica* ja *Salmonella Bongori*. *Salmonella Enterica* jakautuu kuuteen alalajiin ja nämä edelleen serotyypeiksi, joita tällä hetkellä tunnetaan yli 2300. Osa salmonellatyypeistä on patogeenisia ihmisille ja monille eläinlajeille.

Salmonella aiheuttaa useita erilaisia tauteja nopeasti paranevista **ripuleista vaikeisiin septisiin infektioihin**. Tartunta saadaan useimmiten ruuasta tai juomasta, ja tartunta on lähes aina peräisin eläinkunnan tuotteesta tai iduista. harvinaisempaa on, että tartunnan lähteenä on oireeton salmonellan uloste-erittäjä.

Tyypillisimmillään oireet ovat **pahoinvointi, 1-2 vrk kestävä kuume ja alle viikon ripuli. Vaikeat taudinkuvat ovat tavallisia lapsilla ja vanhuksilla sekä erilaisia perustauteja sairastavilla.**

Salmonella pystyy lisääntymään elintarvikkeissa lämpötila-alueella 5-47°C ja pH-alueella 4-9. **Salmonella kestää pakastamista, mutta tuhoutuu kuumennettaessa yli 65°C.** Salmonella ei lisäännä kuivissa elintarvikkeissa, mutta säilyy niissä hengissä.

Näytetyypit

Elintarvikkeet, rehut, ympäristönäytteet (tähän menetelmään on kirjattu ohjeet myös salmonellavalvontaohjelmaan liittyvien näytteiden tutkimiseksi). Jos tutkittavan elintarvikkeen käsittelystä on olemassa standardi, joka poikkeaa tässä kuvatusta, käytetään elintarvikkeen omaa standardia, kuitenkin niin, että poikkeamat tässä kuvatusta menetelmästä ovat mahdollisimman vähäiset.

Määritelmä

Salmonellat ovat *Enterobacteriaceae* -heimoon kuuluvia fakultatiivisesti anaerobeja, gramnegatiivisia sauvoja. Salmonellat liikkuvat tavallisesti peritrikkisin flagelloin, mutta liikkumattomia kantoja tavataan. *S. Gallinarum* ja *S. pullorum* ovat aina liikkumattomia. Salmonella muodostaa happoa glukoosista ja mannitolista, mutta ei sakkaroosista eikä yleensä laktoosista. Diagnostiikassa on kuitenkin erittäin tärkeä muistaa, että on myös laktoosiposiivisia salmonellakantoja. Salmonella on urea- ja indolinegatiivinen. Rikkivedyn muodostuskyky vaihtelee. Salmonella -suku jaetaan antigeenisten ominaisuuksien perusteella serotyyppeihin (O, H, Vi, Kauffman-White).

Periaate

Salmonellan osoittaminen on nelivaiheinen

1. Esirikastus

Punnittu määrä näytettä esirikastetaan esi-selektiivisessä liemessä (puskuroitu peptonivesi) 37±1°C:ssa 16-20 tuntia. Rehunäytteitä pitää esirikastaa vähintään 24 tuntia (-30 tuntia).

2. Rikastus

Tunnettu määrä esirikastettua näytettä siirrostetaan selektiiviseen rikastusliemeen (RV, seleniittikystiini) ja inkuboidaan 41,5±1°C:ssa 18-24 tuntia/RV tai 37±1°C:ssa 48±4 tuntia/seleniittikystiini.

3. Rikastusliemen viljely selektiivisille maljoille

Silmukallinen selektiivisestä rikastusviljelmästä siirrostetaan XLD- ja Rambach- maljoille, joita inkuboidaan 37±1°C:ssa 24±3 tuntia.

4. Varmistus

Salmonellaksi epäillyt pesäkkeet XLD:llä ja/tai Rambachilla varmistetaan biokemiallisin ja serologisin testein. Lopullinen varmistus teetetään alihankintana Evirassa (tarvittaessa KTLssä).

Elintarvikemikrobiologia

Tunnus: MELI-salmonella NMKL
Versio: 6.6
Vastuuhenkilö: Eeva Klemettilä-Kirjavainen
Päiväys: 11.1.2013

Elatusaineet, reagenssit ja välineet

Katso tarkemmin elatusainevalmistuksen agarkansio kunkin elatusaineen kohdalta.

Esirikastus: puskuroitu peptonivesi
maitojauheelle 1% briljanttivihreäliuos ja steriili puhdistettu vesi
kaakaota sisältäville tuotteille kuorittu maito-ravintoliemi-brilj.vihreä
(jos näin sovitaan tutkimuksen tilaajan kanssa)
Rikastus: Rappaport-Vassiliadis-rikastusliemi (RV)
Agarit: Ksyloosi-lysiini-desoksikolaatti-agar (XLD)
Rambach
TSI
Urea
Antiseerumi: Omnivalent
API 20 E tunnistusjärjestelmä

Inkubointikaapit: $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Suoritus

Näytteiden tutkiminen aloitetaan viimeistään saapumista seuraavana päivänä. Jos niitä ei pystytä heti tutkimaan, ne säilytetään jääkaapissa tutkimuksen aloittamiseen asti. Yli 3 vrk matkalla viipyneet näytteet eivät enää ole tutkimuskelpoisia. Tästä ilmoitetaan viipymättä tutkimuksen tilaajalle.

Otettaessa viljelynäytettä salmonellan varalta tehtäviä tutkimuksia varten **on tärkeää ennalta tietää salmonellasaastutuksen todennäköiset kohteet.** Esimerkiksi jäädytetystä lihasta näyte on otettava mahdollisimman laajalta alueelta, koska mahdollinen saastutus voi olla pinnalla. Otettaessa viljelynäytettä kuivista jauhoista tai muroista on näytteen määrä ratkaiseva. Tämän tyyppisistä näytteistä on suotavaa ottaa suurempia näytteitä, esim. 100 g. Jos saatavilla on runsaasti pakkauksia, on syytä ottaa näyte useasta pakkauksesta. Nämä näytteet tutkitaan joko erikseen tai sekoitetaan hyvin ja tutkitaan kokoomänäytteenä. Happamien tuotteiden esirikasteen pH ei saa laskea alle 4,5.

Otettaessa viljelynäytettä kokonaisista raaista siipikarjaruhoista tai nahkaa sisältävistä ruhonosista kasvaa määritysherkkyys, jos esirikastukseen otetaan koko ruho tai sen osa. Vaihtoehtoisesti voidaan näytteeksi ottaa pinta-alaltaan vähintään 25 cm²:n pala niskanahkaa - tai muuta nahkaa ellei niskanahkaa ole saatavilla. Näytteenottotavasta sovitaan mikrobiologin kanssa.

Yleisohje (huom. erikseen mainitut näytetyypit kts. jäljempänä).

Esirikastus

Punnitse **elintarviketta** 10g/25 g näytettä 90 g/225 g:aan puskuroitua peptonivettä pulloon.

Salmonellavalvontaohjelman mukaisia näytteitä koskee näytteenkäsittelyohje ”Salmonellavalvontaan kuuluvien näytteiden käsittely ja koostaminen”, Eviran ohje 6002-1/6, 31.6.2012

Elintarvikemikrobiologia

Tunnus:	MELI-salmonella NMKL
Versio:	6.6
Vastuuhenkilö:	Eeva Klemetilä-Kirjavainen
Päiväys:	11.1.2013

Jos näytemäärä poikkeaa edellä mainituista, valitaan puskuroidun peptoniveden tilavuus siten, että näytemäärän suhde rikasteen tilavuuteen on 1:9 (eli näyte laimenee 1:10, yksi osa näytettä + 9 osaa rikastetta). **Kirjaa rikastettu näytemäärä työraportille.**

Inkubointi: Näyte sekoitetaan puskuroituun peptoniveteen ravistelemalla pulloa kevyesti. Rikastetta inkuboidaan $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa 16-20 tuntia. Rehunäytteitä pitää esirikastaa vähintään 24 tuntia (-30 tuntia). **Esirikaste voidaan siirtää inkuboinnin jälkeen jääkaappiin enintään kahdeksi vuorokaudeksi, mikäli sitä ei voidaan välittömästi inkuboinnin jälkeen jatkoviljellä (esim. viikonloppu). Tällöin esirikastetta on inkuboitava $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa 2 tuntia ennen jatkoviljelyä.**

Rikastus

Lämmitä 10 ml Rappaport-Vassiliadis- rikastusliettä (RV) $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:een. Mikäli puskuroitu peptonivesirikaste on ollut viikonlopun takia jääkaappilämpötilassa, inkuboi sitä $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa 2 tuntia ennen siirrostamista.

Sekoita puskuroitu peptonivesirikaste ja siirrosta siitä 0,1 ml 10 ml:aan RV-liettä.

Säilytä esirikasteet jääkaapissa, kunnes tutkimustulos yhteisnäytteestä on valmis. Jos toteat salmonellan yhteisnäytteestä, tutki jokainen yhteisnäytteen osanäyte erikseen salmonellan varalta.

Inkubointi

RV-liettä inkuboidaan $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa 24 ± 3 tuntia.

Viljely agarmaljoille

Sekoita rikastusliemi. Siirrosta silmukalla (10 μl) rikastusliemestä XLD-maljalle ja –Rambach -maljalle hajotusmenetelmällä, jolloin saadaan selvästi erillisiä pesäkkeitä.

Maljojen inkubointi

Inkuboi XLD- ja Rambach maljoja $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa 24 ± 3 tuntia.

Maljojen tarkastelu

XLD: tyypillinen salmonellapesäke on punertava, läpinäkyvä ja sillä on musta keskusta. Lähes aina (erityisesti voimakkaan salmonellakasvun yhteydessä) on pesäkettä ympäröivässä elatusaineessa laajempi tai kapeampi vaaleanpunainen/punainen vyöhyke.

Rambach maljalla tyypillinen salmonellapesäke on voimakkaan vaaleanpunainen, fuksianpunainen, tasaisen pyöreä tai leviävä pesäke kasvuston ympärillä voi olla alustassa vaaleanpunainen saostuma. Huomioi myös epätyypilliset pesäkkeet: väriltään/persikanvärinen (esim. epätyypillinen *S. paratyphi*) tai rakeinen epätasaisesti leviävä kasvusto (esim. epätyypillinen *S. senftenberg*).

Pesäkkeiden varmistaminen

Epäillyt pesäkkeet varmistetaan biokemiallisin ja serologisin menetelmin.

Valitse kummaltakin maljalta 2-10 (mikäli mahdollista) tyypillistä tai epäiltyä pesäkettä jatkotutkimuksiin. **Mikäli pesäke on selvästi erillään muista pesäkkeistä, siirrosta samalla pesäkkeestä ensin urea-putki, sitten TSI-putki ja lopuksi selektiivinen malja jäljempänä olevan ohjeen mukaan.**

Elintarvikemikrobiologia

Tunnus:	MELI-salmonella NMKL
Versio:	6.6
Vastuuhenkilö:	Eeva Klemetilä-Kirjavainen
Päiväys:	11.1.2013

Mikäli maljalla **ei ole erillisiä pesäkkeitä, viljele selektiiviselle agarille** jatkoviljelmä siten, että saadaan erillisiä pesäkkeitä varmistustestien suorittamista varten. Inkuboi $37\pm 1^{\circ}\text{C}$:ssa 24 ± 3 tuntia.

Tarkista viljelmien puhtaus ja siirrosta siitä pistoviljelmänä TSI- ja pintaviljelynä ureaputkeen Mikäli ne eivät ole puhtaita, valitse kultakin taas tyypillinen tai epäilty pesäke ja viljele sitä edelleen selektiiviselle agarille ja siirrosta samalla TSI- ja urea-putkiin.

Käytä tarvittaessa biokemiallisten testien tulosten tulkinnan varmistamiseksi **positiivista ja tarvittaessa negatiivista testikantaa**. Kirjaa testikantojen antamien reaktioiden tulokset työraporttiin.

TSI- ja ureaputkien inkubointi:

$37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 24 ± 3 tuntia.

TSI-putken tarkastelu:

Salmonella käyttää glukoosia, muttei laktoosia ja sakkaroosia sekä muodostaa yleensä rautasulfidia, jolloin tyypillinen salmonella-reaktio TSI-putkessa on:

pinta punainen (emäksinen)- pohja keltainen (hapan) - keskiosa musta (rauta-(II)-sulfidi)

Voimakas rautasulfidin muodostus voi peittää alleen pohjan keltaisen värin (putki punamusta).

Rikkivetynegatiiviset salmonellat eivät muodosta rautasulfidia, ja aiheuttavat pelkän punakeltaisen reaktion.

Laktoosiposiitiviset salmonellat muuttavat vinopinnan keltaiseksi. Varmista epäselvät tapaukset API20 E:llä.

Urea-putken tarkastelu:

Salmonella ei hydrolysoi ureaa, joten urea-putken väri säilyy keltaisena.

Mikäli XLD/Rambach tyypillinen pesäke antaa salmonellalle tyypilliset reaktiot TSI/Urea:lla, testataan kanta API20E:llä.

Serologinen varmistus

Tee selektiivisellä maljalla olevasta puhdasviljelmän pesäkkeestä objektilasilla agglutinaatiotesti omnivalentilla antiseerumilla seuraavasti:

1. Tiputa tummalla taustalla olevalle puhtaalle objektilasille tippa antiseerumia
2. Siirrä tutkittavaa bakteerimassaa tasaiseksi suspensioksi seerumipisaraan. Bakteerimassan voi ensin liittää pisaraan fysiologista (0,9%) suolaliuosta seerumipisaran vieressä ja kun suspensio on tasainen, sekoita sitä antiseerumiin.
3. Kallista objektilasia edestakaisin.
4. Tummaa taustaa vasten tarkasteltuna salmonella-solut liimautuvat vaaleiksi kokkareiksi tai hiutaleiksi, negatiivisessa tapauksessa samennus on tasainen.
5. Tee myös kontrollinäyte niin, että antiseerumin tilalla käytät fysiologista keittosuolaliuosta (autoagglutinaation toteaminen).
6. Käytä testissä kontrollina positiivista salmonellakantaa.
7. Kirjaa tulokset työraportille.

Biokemiallisin testein (TSI- ja urea, API 20E ja serologisesti) varmistettu bakteerikanta lähetetään EVIRA:an (Kuopio/Henry Kuronen) lopullisesti varmistettavaksi, erityistapauksissa myös KTL:ään.

Lähetä kanta (tavallisesti 5 viljelmää/kanta) maljoilla asianmukaisesti pakattuna EVIRA:an käyttäen EVIRAN:n lähetettä. Lähetä myös ne kannat, jotka autoagglutinoivat. Kirjaa läheteeseen tutkimuspyynnöksi ”Salmonella-serotyypitys”.

Elintarvikemikrobiologia

Tunnus: MELI-salmonella NMKL
Versio: 6.6
Vastuuhenkilö: Eeva Klemettilä-Kirjavainen
Päiväys: 11.1.2013

Jos kyseessä on omavalvontanäyte, on sekin mainittava lähetteessä, koska muuten tulos menee tiedoksi ulkopuolisille tahoille.

Salmonellavalvontaohjelman mukaisissa näytteissä lähetetään aina myös karjojen uusintatutkimuksissa todetut salmonellakannat. Läheteeseen kirjataan myös omistajan kunta ja lääni.

Lähetä puhdas kanta **suoraan EVIRAN:n salmonellalaboratorioon (nimi pakkauksen päälle)**, niin tulos saadaan nopeammin.

Toimita työraportti mikrobiologille mahdollisen välivastauksen kirjoittamista varten.

Tuloksen ilmoittaminen

Tulos ilmoitetaan seuraavasti:

Negatiivinen tulos:	Salmonella	Ei todettu./10 g tai 25 g
Positiivinen tulos:	Salmonella	Todettu /10 g tai 25 g

Huuhtelunäytteiden tulos ilmoitetaan määritysrajan mukaan.

Mikäli näytemäärä on poikkeava, myös **tutkittu näytemäärä** ilmoitetaan ja esim. **pinta-ala**, jos se on saatavilla. Lisäksi ilmoitetaan näytteiden tutkimisesta yhteisnäytteenä.

Virhelähteet

Joskus *Proteus* -kannat voivat aiheuttaa TSI-putkessa samanlaisen reaktion kuin salmonellat. Proteukset ovat kuitenkin ureaasiposiitivia (ureaputki muuttuu punaiseksi).

Jotkut *Citrobacter*-, *Proteus* ja *Enterobacter* -lajit voivat agglutinaatiotestissä aiheuttaa ristireaktion, joka ilmenee heikkona kokkaroitumisena.

Määritysmenetelmän laadunvarmistus

Kyseessä on kansainvälinen standardimenetelmän muunnos. Laboratorio osallistuu menetelmällä laboratorioden välisiin vertailututkimuksiin. Mikäli vertailututkimusta ei jonain vuonna järjestetä, laboratorio osoittaa tulostensa oikeellisuuden siirrostetun näytteen kvalitatiivisella (herkkyys) tutkimuksella. Elatusaineiden toimivuus tarkistetaan toimintaohjeiden mukaisesti.

Viitemenetelmä

NMKL 71:1999