



Milla Rasinkangas

Kvalitatiivisen qPCR-menetelmän verifiointi *Salmonella spp.* - bakteerien toteamiseen eläinperäisistä rehuista ja rehun raaka-aineista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

1.9.2023

Tiivistelmä

Tekijä:	Milla Rasinkangas
Otsikko:	Kvalitatiivisen qPCR-menetelmän verifiointi <i>Salmonella spp.</i> -bakteerien toteamiseen eläinperäisistä rehuista ja rehun raaka-aineista
Sivumäärä:	43 sivua + 7 liitettä
Aika:	30.9.2023
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Laboratoriokoordinaattori, mikrobiologi MMT Minna Santalahti Lehtori Tiina Soininen

Opinnäytetyön tavoitteena oli osoittaa kvalitatiivisen SureTect qPCR -menetelmän soveltuvuus eläinperäisten rehujen salmonellavalvontaan. Lisäksi tavoitteena oli osoittaa kaupallisten varmistustestien toimivuus salmonellojen toteamisessa, soveltaen EN ISO 6579-1 -standardin vaatimia testejä. Rehujen valvonnan avulla voidaan osaltaan turvata elintarviketurvallisuutta sekä edistää eläinten terveyttä. Opinnäytetyö toteutettiin Metropolilab Oy:n elintarvikemikrobiologian laboratoriossa.

Verifiointi suoritettiin elintarvikemikrobiologian menetelmien validointiin tarkoitetun EN ISO 16140-3 -standardin mukaan. Standardi antaa ohjeet koejärjestelyihin sekä toteamisrajan määrittämiseen, joka kertoo menetelmän soveltuvuudesta salmonellojen toteamiseen eläinperäisten rehuista. Varmistustestaukset toteutettiin EN ISO 6579-1 -standardin ohjeiden mukaan. Menetelmän käyttöönotto nopeuttaa tulosten toimitusaikaa kahdella vuorokaudella. Alustavat tulokset voidaan antaa jo vuorokauden sisällä näytteen tutkimuksen aloittamisesta.

Verifiointikokeiden tavoitteena oli määrittää arvioitu toteamisraja (eLOD₅₀) sekä arvioida mittausepävarmuutta menetelmän virhelähteiden avulla, minkä jälkeen voitiin varmistaa menetelmällä saatujen tulosten oikeellisuus osallistumalla pätevyyskokeeseen. Vasikan maitojauheelle ja koiran märkäruualle saatiin määritettyä eLOD₅₀-arvoksi ≤ 1 pmy, kun taas lohiöljylle saatiin 3,25 pmy. Koiran lohipuruluiden eLOD₅₀-arvoksi määritettiin 1,95 pmy ja koiran kuivaruualle 1,3 pmy. Toteamisrajat vaihtelivat näytetyypin mukaan, mutta jokainen näytetyyppi täytti sille asetetun hyväksyttävyyssrajan. Arvioitu toteamisraja (eLOD₅₀) eläinperäisille rehuille oli ≤ 2 pmy. Menetelmän herkkyyden ja nopeuden avulla voidaan löytää salmonella näytteestä helpommin ja siten edistää eläinten terveyttä sekä elintarviketurvallisuutta.

Avainsanat: salmonella, qPCR, verifiointi, kvalitatiivinen menetelmä

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Milla Rasinkangas
Title: Verification of Qualitative qPCR Method for Detection of *Salmonella spp.* Bacteria in Animal Feed and Feed Ingredients
Number of Pages: 43 pages + 7 appendices
Date: 30 September 2023

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Santalahti Minna, Laboratory coordinator, microbiologist
DSc
Soininen Tiina, Senior Lecturer

The aim of this thesis study was to implement a qualitative qPCR method for detecting *Salmonella spp.* bacteria in animal feed and feed ingredients. At the same time, an effort was made to demonstrate the performance of commercial confirmation tests for salmonella detection, by applying the test required by the EN ISO 6579-1 standard. The commercial SureTect method speeds up the delivery time of the results by two days, regardless of whether a positive or a negative sample. Verification test for the thesis study was conducted in Metropolilab Oy's food microbiology laboratory.

Verification tests were guided by the EN ISO 16140-3 standard, which directs and helps laboratories to perform verification of methods reliably. The determination of the eLOD₅₀ (estimated Limit Of Detection) value contained in the standard will assess the suitability of the method to detect *Salmonella spp.* bacteria from animal feed. Preliminary results through the method can be obtained after 20 hours of the start of the sample, whereas the old cultivation method took three days to obtain results. Speed can help prevent animal salmonella infections and make the laboratory competitive for the testing of salmonella in animal feed.

The parameters determined in the verification were an estimated detection limit, measurement uncertainty and accuracy. The detection limit was determined by means of standard test arrangements. For the limits of the calf milk powder and dog's wet food ≤ 1 pmy was given, which is low compared to 3.25 pmy of salmon oil. The dog's salmon chips were set at 1.95 pmy as the detection limit and the dry food detection limit was 1.3 pmy. The detection limits varied according to the sample but met the acceptability limits. The estimated detection limit obtained for the method was ≤ 2 pmy. To assess accuracy, the laboratory participated in the qualification tests and received a right positive salmonella result from the matrix provided.

Keywords: qPCR method, method implementation verification, *Salmonella spp.* bacteria, feed

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Salmonella	2
2.1	Ominaisuudet	2
2.2	Salmonella eläinperäisissä rehuissa	5
3	Lainsäädäntö	7
3.1	Rehulaki	7
3.2	Zoonoosiasetus ja eläintautilaki	8
4	Kvalitatiivisen qPCR-menetelmän verifiointi	9
4.1	Verifiointi ja EN ISO 16140-3 -standardi	9
4.2	Verifiointissa määritettävät parametrit	11
4.2.1	Toteamisraja	11
4.2.2	Oikeellisuus	12
4.2.3	Mittausepävarmuus	12
4.3	SureTect qPCR -menetelmä	13
4.4	SureTect qPCR -menetelmän virhelähteet	16
4.5	ISO EN 6579-1 -standardi salmonellan serotyypityksessä	19
5	Työn toteutus	22
5.1	Matriisi ja koejärjestelyt	22
5.2	Näytteiden esikäsittely	24
5.3	Näytteiden analysointi	25
5.4	Näytteiden varmistustestaukset	26
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	28
6.1	Toteamisrajan määrittäminen	28
6.2	Mittausepävarmuuden arvioiminen	32
6.3	Oikeellisuuden varmistaminen	33
6.4	Varmistustestaukset	33
7	Yhteenveto	36

Liitteet

Liite 1: EN ISO 16140-3 -taulukko eLOD₅₀-arvon määrittämiseen

Liite 2: Koiran kuivanappuloiden tulokset kootusti

Liite 3: Koiran märkäruuan tulokset kootusti

Liite 4: Vasikan maitojauheen tulokset kootusti

Liite 5: Koiran lohipuruluiden tulokset kootusti

Liite 6: Lohiöljyn tulokset kootusti

Liite 7: Kylmäsäilytyksen tulokset

Lyhenteet

AOAC:	Association of Official Analytical Chemists. Konsensusstandardeja kehittävä organisaatio.
AFNOR:	Association Française de Normalisation. Ranskan standardointiliitto.
Cq:	Quantification cycle. Kvantifiointisykli.
EPS:	Extracellular Polymeric Substance. Solunulkoinen polymeerinen aine.
eLOD ₅₀ :	Estimated Limit of Detection. Arvioitu toteamisraja.
IPC:	Internal Positive Control. Sisäinen kontrolli.
LPS:	Lipopolysakkaridi.
NMKL:	Nordic Committee on Food Analysis. Pohjoismainen elintarvikkeiden analyysikomitea.
PCA:	Plate Count Agar. Yleiskasvatusagar mikrobien laskemiseen.
pmy:	Pesäkkeen muodostavaa yksikköä.
Salmonella spp:	Salmonella Species. Salmonellalajit.
XLD-agar:	Xylose Lysine Deoxycholate agar. Ksyloosi-lysiinideoksikolaattiagar.

1 Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin Metropolilab Oy:n elintarvikemikrobiologian laboratoriossa, joka on FINAS-akkreditointipalveluiden akkreditoima ja noudattaa SFS-EN ISO/IEC 17025 -akkreditointivaatimuksia. Akkreditoituun pätevyysalueeseen kuuluu kemiallisia ja mikrobiologisia analyysejä sekä elintarvike- ja pintapuhtausnäytteenotto. [1.]

Salmonella kuuluu maailmanlaajuisesti yleisimpiin ruokamyrkytyksen aiheuttajiin, joka leviää eläinten ja ihmisten ulosteilla saastuneiden elintarvikkeiden ja veden välityksellä. Tuotanto- ja lemmikkieläimet voivat saada tartunnan saastuneen rehun ja veden kautta. Salmonella voi siirtyä sitä kantavan eläimen kautta suoraan ihmiseen tai toisinpäin, mikä tekee siitä zoonoottisen bakteerin. [2.]

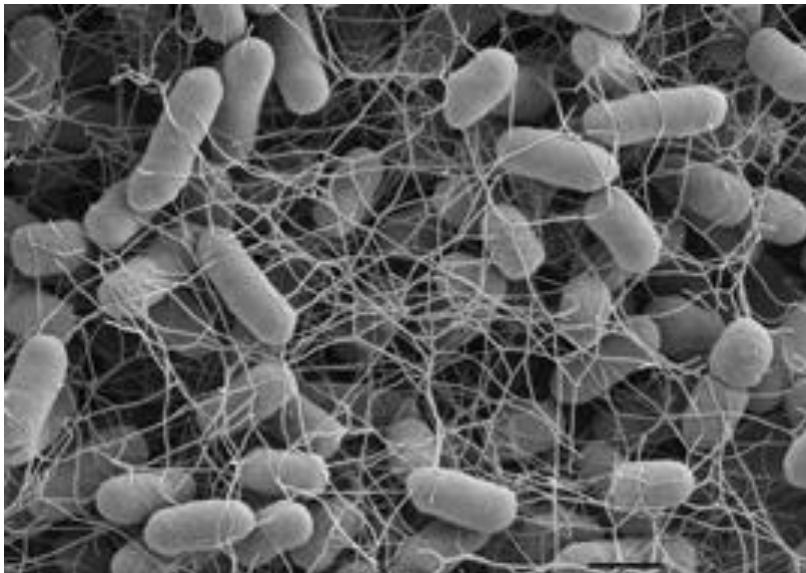
WHO on arvioinut, että salmonella aiheuttaa vuosittain jopa 59 000 kuolemantapausta maailmanlaajuisesti, mikä tekee siitä ruokamyrkytyksen aiheuttajista eniten kuolemantapauksia aiheuttavan bakteerin. Suomessa salmonellatilanne on kuitenkin varsin hyvä kansainvälisesti verrattuna. Koko elintarvikeketjun kattava valvonta ja tehokas yhteistyö tuottajien ja viranomaisien välillä on mahdollistanut Suomessa salmonellan hävittämisen lähes kokonaan elintarvikkeista. [3.]

Salmonella spp. -bakteerien toteamiseen eläinperäisistä rehuista ja rehun raaka-aineista käytetty NMKL 71:1999 -menetelmä ei enää vuoden 2023 jälkeen sovellu zoonosiasetuksen mukaisiin tutkimuksiin. Verifiointin tarkoituksena on käyttöönottaa kaupallinen SureTect qPCR -menetelmä salmonellojen toteamiseen eläinperäisistä rehuista. Menetelmän verifiointi suoritetaan EN ISO 16140-3 -standardin mukaisesti, varmistaen sen luotettavuus ja pätevyys tutkimuskäyttöön. Varmistustestaus toteutetaan standardin EN ISO 6579-1 mukaan.

2 Salmonella

2.1 Ominaisuudet

Salmonellat ovat enterobakteerien sukuun kuuluvia gramnegatiivisia suolistobakteereja, jotka kykenevät lisääntymään hapellisissa sekä hapettomissa olosuhteissa [2]. Salmonellan morfologia voi vaihdella eri serotyypin ja kantojen välillä, mutta yleensä salmonellat ovat lyhyitä noin 2–5 µm:n pituisia liikkuvia sauvabakteereita (kuva 1), jotka esiintyvät yksittäin, pareittain tai ketjuina [4]. Salmonelloja esiintyy kaikkialla myös suoliston ulkopuolella, ja ne voivat selviytyä useita viikkoja kuivissa olosuhteissa ja useita kuukausia vedessä [2].



Kuva 1. Salmonella pyyhkäiselektronimikroskoopissa (SEM) [5]. Salmonellan ympärillä on noin 6–10 siimaa eli flagellaa, joiden avulla bakteeri kykenee liikkumaan ympäristössä [6].

Optimaalisin lämpötila salmonellan kasvulle on +37 °C ja pH 6,5–7,5, mutta eri kannat kykenevät kasvamaan myös lämpötilan ollessa +2–54 °C ja pH:n ollessa 4,0–9,5. Salmonella kykenee selviytymään elintarvikkeissa jopa vuosien pakastuksen ajan. Kasvuun salmonella tarvitsee vähintään 0,93:n vesiaktiivisuuden, mutta salmonella voi kuitenkin säilyä kuukausia

alhaisemmilla vesiaktiivisuuksilla. Salmonellan sopeuduttua vähäkosteisiin ympäristöihin sen kyky selviytyä korkeammassa lämpötiloissa paranee, tehden siitä vakavan ongelman kuivatuissa elintarvikkeissa. Altistuminen ympäristön rasiukselle tekee salmonellasta vastustuskykyisemmän myös muille negatiivisille kasvuolosuhteille. [7.]

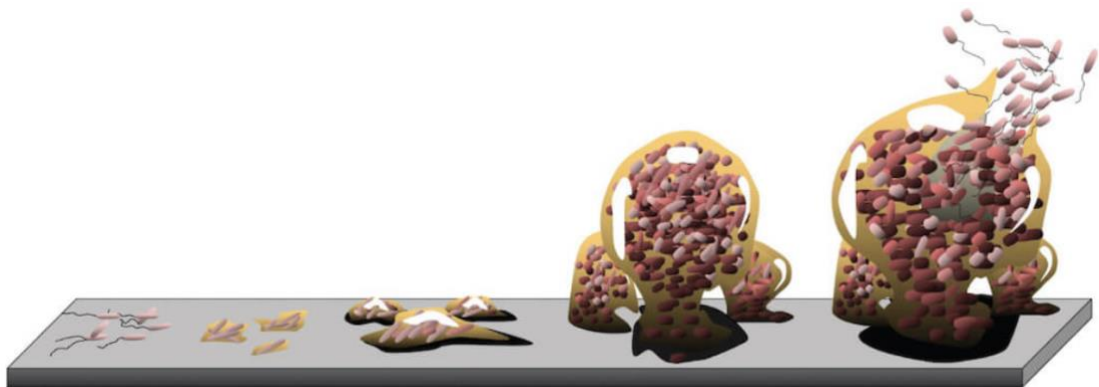
Salmonellan tarttuminen ja tunkeutuminen fagosyyttisiin ja epiteelisoluihin on tärkeä ominaisuus infektion aiheuttamisen, patogeenisyyden, solunsisäisen replikaation sekä leviämisen kannalta. Tarttumisen ja tunkeutumisen soluun mahdollistaa salmonellan adheesiokyky sekä invasiivisuus. [8.] Salmonellan adheesiokyky perustuu erilaisiin mekanismeihin, joista fimbrion eli bakteerin pinnalla olevat ohuet karvat ovat tärkeimpiä tekijöitä kiinnittymisessä isäntäsoluun. Virulenssitekijät, kuten salmonellan tuottamat adheesioproteiinit, mahdollistavat sen tiukan kiinnittymisen isäntäsolun pinnan proteiineihin tai sokeryhdisteisiin. Salmonella kykenee myös hyödyntämään invasiivisuustekijöitä, kuten proteiineja, tunkeutumisessa isäntäsoluun. Adheesiokyvyn ja invasiivisuuden ymmärtäminen ovat tärkeitä tekijöitä salmonellan aiheuttamien infektioiden torjunnassa ja ehkäisyssä. [9, s. 6.]

Gramnegatiivisena bakteerina salmonellalla on kaksi kalvokerrosta soluseinän lisäksi, jotka suojaavat bakteeria tehokkaasti. Ulomman lipopolysakkaridikerroksen eli LPS:n ansiosta gramnegatiiviset bakteerit ovat vastustuskykyisempiä mikrobilääkkeille ja desinfiointiaineille kuin grampositiiviset. LPS vaikuttaa bakteerin kykyyn aiheuttaa tulehdusreaktio isäntäorganismissa. [10.] Salmonellan adheesion ja invasiivisuuden estämisellä voidaan rajoittaa bakteerin patogeenisyyttä sekä ehkäistä infektoita. Solunsisäisten salmonellainfektioiden hoitoon käytetään ihmisillä ja eläimillä erilaisia antimikrobisia aineita. [8.]

Antibiootit ovat mikrobin tuottamia, toisia mikrobeja tappavia tai niiden kasvua häiritseviä aineita. Bakteereilta löytyy luontaista resistenssiä, joka on tietyille bakteerisuvulle tyypillinen ominaisuus. Bakteerit kykenevät myös muuttamaan vastustuskykyisiksi antibiooteille geenimutaation seurauksena, mitä kutsutaan

hankituksi resistentiksi. [11.] Salmonellat ovat kehittäneet resistenssiä antibakteerisille aineille, kuten fluorokinoloneille, joita käytetään eläinlääketieteessä infektioiden hoitoon ja ihmisillä gastroenteriitin eli ruuansulatuskanavan tulehduksen hoidossa. Salmonellan resistenttiys tätä antimikrobista lääkettä kohtaan voi johtaa hoidon epäonnistumiseen, sytotoksisuuteen sekä mikrobilääkeresistenssin lisääntymiseen. [8.]

Salmonellan kyky muodostaa biofilmejä vaikuttaa sen kykyyn selviytyä erilaisista negatiivisista ympäristöärsykkeistä, kuten pH:n, lämpötilan tai hapen muutoksista. Biofilmit tekevät bakteerista myös huomattavasti vastuskykyisemmän antibiootteja vastaan. Biofilmit ovat yhteisönä kasvavia bakteereja (kuva 2), jotka kiinnittyvät pintaan muodostaen matriisin ekstrasellulaarisista polymeerisistä aineista. [12.]



Kuva 2. Biofilmin muodostuminen. Muodostuminen alkaa, kun joukko mikrobeja löytää pinnan, johon tarttua. [13.]

Pintaan tartuttuaan mikrobit alkavat kasvamaan ja jakautumaan. Selviytyäkseen ympäristötekijöiltä mikrobit tuottavat ympärilleen EPS-matriisia eli ekstrasellulaarista polymeeristä ainetta. Tämä vaihe tapahtuu nopeasti, yleensä vain muutamissa tunneissa tai päivissä. Kypsyneet mikrobit irtoavat biofilmistä ja siirtyvät uusiin paikkoihin tai biofilmeihin. Kolmiulotteinen EPS-matriisi vaikeuttaa biofilmien hävittämistä desinfiointiaineilla sekä vaarantaa elintarviketurvallisuuden, koska matriisi rajoittaa diffuusiota ja inaktivoi

ksenobioottisia aineita. Tämä parantaa salmonellan selviytymistä ja leviämistä erilaisissa ympäristöissä. [14.]

Kaikki edellä mainitut salmonellan ominaisuudet tekevät bakteerista erittäin vaikean hävitettävän elintarvikeketjuun päästessään ja salmonella voi aiheuttaa vakavan uhan ihmisten ja eläinten terveydelle. Salmonellan pääsyä elintarvikeketjuun estetään hyvän tuotantohygienian, valvonnan ja tarkastusten avulla.

2.2 Salmonella eläinperäisissä rehuissa

Eläinperäisillä rehuilla tarkoitetaan lemmikkieläinten, tuotantoeläinten sekä luonnoneläinten ruokintaan tarkoitettuja tuotteita, kuten rehuaineita, rehuseoksia, rehun lisäaineita tai lisäaineiden esiseoksia, jotka sisältävät eläinperäisiä osia. Lisäksi elintarvikeketjun oheistuotteina syntyvät ja eläinten ravinnoksi kelpaavat tuotteet ovat rehuja. [15.]

Tuotantoeläimillä merkittävimmät salmonellan tartunnanlähteet ovat saastunut rehu, salmonellaa kantava eläinten hoitaja tai vierailija sekä saastunut kuljetusajoneuvo. Salmonella säilyy hyvin rehuissa sekä pölyssä, joten sen leviäminen niistä voi aiheuttaa laajan tartunnan. Kissat ja koirat saavat tartunnan usein ruuasta, ympäristöstä tai ihmisestä. Rehujen merkitys salmonellan torjunnassa on merkittävä, sillä niiden valvonnan avulla voidaan tehokkaasti ehkäistä eläinten salmonellatartuntoja ja siten estää salmonellan esiintymistä myös elintarvikkeissa. [16.]

Salmonella aiheuttaa eläimillä suolistotulehduksen, mutta voi aiheuttaa vakavampiakin oireita, kuten keskenmenon tai verenmyrkytyksen. Salmonellainfektio voi olla myös oireeton, ja eläin voi oireiden loppumisen jälkeen kantaa piilevää tartuntaa jopa kuukausia. Tuotantoeläimistä heikkokuntoiset, nuoret, vastasyntyneet sekä vastasyntyttäneet ovat alttiimpia sairastumiselle. Lemmikkieläimistä matelijat ovat herkimpiä sairastumaan,

mutta myös kissoilla ja koirilla esiintyy satunnaisia tartuntoja. Lemmikit kuitenkin kantavat salmonellaa usein suolistossaan ilman oireita, joten infektio huomataan usein vasta omistajan sairastuttua. [17.]

Salmonellalle alistunut koira voi ulosteiden kautta levittää salmonellaa ympäristöön aiheuttaen ympäristön saastumisen ja siitä edelleen kasvattaa ihmisten riskiä alistua salmonellalle. Infektion kehittyminen kuitenkin riippuu bakteerien määrästä ja serotyypistä. Infektioannoksen on arvioitu olevan noin 10^5 bakteeria. Terveet aikuiset koirat saavat harvemmin oireita salmonellasta, mutta salmonella voi kuitenkin aiheuttaa koiralle kuumetta, oksentelua, ripulia ja vatsakipuja. [17.]

Zoonoosit ovat tauteja, jotka tarttuvat ihmisten ja eläinten välillä. Salmonella kuuluu merkittävimpiin rehujen välityksellä leviäviin zoonooseihin, jota esiintyy varsinkin kasvi- ja eläinperäisissä valkuaisrehuissa. Rehun saastuminen voi tapahtua rehun valmistuksen, varastoinnin tai kuljetuksen aikana. Rehujen saastumista salmonellalla voidaan ehkäistä rehujen valmistuksessa käytettävien raaka-aineiden puhtauden varmistamisella, asianmukaisella kuumennuskäsittelyllä, jälki- ja ristikontaminaatioiden ehkäisyllä sekä yleisellä hyvällä hygienialla. Ilman valvontaa ja tiukkaa suhtautumista rehujen salmonellaan, eläinten salmonellatilannetta ei voida säilyttää yhtä hyvänä kuin mitä se nyt on. [18.]

Suomen rehulaissa (1263/2020) asetetaan yleisiä laatuvaatimuksia rehuille sekä säädetään rehujen valmistukseen liittyvistä määräyksistä. Lisäksi maa- ja metsätalousministeriö edellyttää, että analyysin suorittamiseen käytetään kansainvälisten elinten hyväksymiä standardeja. Suomen kansallisen lainsäädännön (RL 1263/2020, § 6) mukaan rehut eivät saa sisältää salmonellaa. Koirien ja kissojen kuivamuonissa tai märkäruoissa ei ole todettu salmonellaa, mutta eläinperäisistä sivutuotteista, kuten possunkorvista ja muista paistetuista ruhon osista, on satunnaisesti todettu salmonellaa Suomessa. [19.]

3 Lainsäädäntö

3.1 Rehulaki

Euroopan unionin sekä sitä täydentävän kansallisen rehulainsäädännön tarkoituksena on varmistaa hyvä elintarviketurvallisuus. Rehulaki käsittelee rehuja, rehujen käsittelyä sekä rehualan toimijoita, laboratorioita ja valvontaa. Lain tavoitteena on turvata eläinten terveys ja eläimistä saatavien elintarvikkeiden laatu turvaamalla rehujen laatu, jäljitettävyys, turvallisuus sekä rehuista annettavien tietojen oikeellisuus. Lakia voidaan soveltaa käytettäväksi rehuihin ja niiden käsittelyyn, rehualan toimijoihin, laboratorioihin ja valvontaan kaikissa rehujen tuotanto-, valmistus- ja jakeluvaiheissa aina alkutuotannosta markkinoille saattamiseen ja rehun käyttöön asti. [20.]

Rehulain mukaan rehujen on täytettävä sen asettamat laatuvaatimukset poikkeuksetta. Yleisten laatuvaatimusten mukaan rehujen on oltava rehulain sekä Euroopan unionin lainsäädännön vaatimusten mukaisia, laadukkaita, turvallisia, aitoja ja eläinten ravitsemukseen soveltuvia. Haitalliset aineet, tuotteet tai eliöt, jotka voivat uhata ihmisten tai eläinten terveyttä tai ympäristöä, on kielletty rehuissa. [20.]

Rehulain mukaista valvontaa varten otetut näytteet on tutkittava Ruokavirastossa tai Ruokaviraston hyväksymässä laboratoriossa. Laboratorion tulee täyttää valvonta-asetuksessa määrätyt ehdot. Laki mahdollistaa viranomaisille valtuudet tehdä näytteenottoja ja tarkastuksia, jotta voidaan varmistua lakien ja standardien noudattamisesta rehuvalmistajien ja markkinoijien keskuudessa. Rehulain ja Euroopan unionin rehuja koskevan lainsäädännön tai niiden nojalla annettujen säännösten laiminlyönnistä voi seurata sakkoja, määräyksiä, tuotteiden takaisin vetoa tai oikeudellisia seuraamuksia. [20.]

Rehulaki on jatkuvasti päivittyvä ja kehittyvä, jotta se pysyy mukana vastaamaan elintarvikealan kehitystä, uusia tutkimustuloksia ja kansainvälisiä standardeja. Viimeisin päivitys on tehty vuonna 2021, minkä avulla pyrittiin

vähentämään toimijoiden hallinnollista taakkaa ja lisätä viranomaisten toimivaltaa uusilla valvontaan liittyvillä työkaluilla. Päivitysten tavoitteena on parantaa rehujen jäljitettävyyttä, laatua, turvallisuutta sekä kehittää kestävää rehutuotantoa. Rehulaissa annettujen säännösten lisäksi rehuja koskevia säännöksiä on eläintautilaissa. [20.]

3.2 Zoonosiasetus ja eläintautilaki

Zoonosiasetuksessa annetaan tuotantoeläimiä ja salmonellavalvontaa koskevat säännökset. Asetuksessa annetaan myös zoonosien tutkimusmenetelmiä koskevia säädöksiä sekä säädetään zoonositutkimuksia tekevien laboratorioden velvollisuuksista toimittaa tutkimustietoja, näytteitä ja kantoja viranomaisille. [21.]

Zoonosiasetuksessa säädetään lisäksi salmonellanäytteiden tutkimisesta ja tutkimustulosten varmistamisesta. Asetuksen vaatimusten mukaan salmonelat tulee osoittaa standardin EN ISO 6579-1 vertailumenetelmällä tai vaihtoehtoisella menetelmällä, joka on validoitu vasten EN ISO 16140-2 -standardia. Vaihtoehtoiseen menetelmään pitää sisältyä salmonellakannan eristäminen positiivisesta näytteestä, koska tutkimuksen suorittaneen eläintautilain nojalla hyväksytyt laboratorion on toimitettava kaikki kannat ja näytetiedot Ruokavirastoon tulosten varmistamiseksi. [21, § 9.]

NMKL 71:1999 -menetelmää ei ole validoitu vasten EN ISO 16140-2:2021 -standardia, joten menetelmän käytöstä salmonellan valvontatutkimuksissa on luovuttava. Laboratorioden tulee esittää zoonosiasetuksen kriteerejä noudattava menetelmä akkreditoitavaksi vuoden 2023 loppuun mennessä. Laboratorio voi siirtyä NMKL-menetelmästä standardin EN ISO 6579-1 vertailumenetelmään tai kaupalliseen menetelmään, joka täyttää zoonosiasetuksen vaatimukset. [22.]

Eläintautilaki (76/2021) on kansallinen lainsäädäntö, joka määrittelee säännöksiä ja määräyksiä eläintautien, mukaan lukien zoonoottisten tautien

ennaltaehkäisystä, torjunnasta ja hallinnasta. Kansainvälisenä lainsäädäntönä eläintautilaki on voimassa vain tietyssä maassa tai alueella ja noudattaa sekä toteuttaa osaltaan zoonosiasetuksen vaatimuksia. Eläintautilaissa viitataan zoonosiasetuksessa esitettyihin vaatimuksiin ja ohjeisiin, jotta voidaan varmistua kansainvälisten standardien noudattamisesta. [23.]

Eläintautilaki määrittää erilaisia velvoitteita ja toimenpiteitä noudatettavaksi eläinten terveyden ja tautien torjunnan varmistamiseksi. Se antaa viranomaisille valtuudet valvoa toimijoiden toimintaa, ohjata eläinten terveydenhuoltoa sekä määrätä toimenpiteitä erilaisten sairauksien leviämisen ehkäisemiseksi. Euroopan unionin lainsäädännön eläintautiluokitus a–e ei koske salmonellaa, mutta salmonellat kuuluvat naudoissa, sioissa, kanoissa sekä kalkkunoissa valvottaviin eläintauteihin. [23.]

4 Kvalitatiivisen qPCR-menetelmän verifiointi

4.1 Verifiointi ja EN ISO 16140-3 -standardi

Laboratorioiden ja elintarvikkeiden valmistajien on varmistettava ennen mikrobiologisten analyysien suorittamista, että käytössä olevat menetelmät ovat asianmukaisesti validoituja sekä verifioituja. Menetelmän verifiointi ja validointi ovat toteutukseltaan ja laajuudeltaan hyvin erilaisia, minkä takia niiden erojen ymmärtäminen on tärkeää tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi sekä akkreditoinnin suojaamiseksi.

Kvalitatiivinen tutkimus tarkoittaa laadullista tutkimusta, eli pyritään ymmärtämään kohteen laatua, ominaisuuksia ja merkityksiä kokonaisuudessaan. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa pyritään saamaan vastaus muodossa positiivinen/negatiivinen. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa eli määrällisessä tutkimuksessa pyritään laadun sijaan tulkita kohdetta tilastojen ja numeroiden avulla. [24.] qPCR-menetelmä on kvantitatiivinen, koska sen tuottama fluoresenssisignaali on verrannollinen tuotteen määrään. SureTect qPCR -menetelmä on kvalitatiivinen, koska menetelmässä ei ole kvantitatiivista

standardia, johon näytteen fluoresenssisignaalia voidaan verrata. Ilman vertailuarvoa näytteen tuottaman fluoresenssisignaalin perusteella ei voida arvioida määrää.

Menetelmän validoinnin tavoitteena on testata menetelmän kyky havaita kohdeorganismit tietyissä olosuhteissa sekä todentaa menetelmän suorituskykyominaisuudet tietyille matriisikategorialle sisältäen eri näytetyyppejä, kuten kosteat tai kuivat koiranruuat. Kaupallisia testejä kehittävät yritykset validoivat menetelmät usein vasten AOAC-, ISO-, NF- (by AFNOR) tai jotain muuta standardointielinten hyväksymiä protokollia. Menetelmä on validoitu, kun sen on osoitettu onnistuneesti referenssimenetelmään vertaamalla havaitsevan kohdeorganismit vaaditulla herkkyydellä, spesifisyydellä ja tarkkuudella. [25.]

Verifioinnilla taas pyritään varmistamaan, että validoitu menetelmä toimii tietyssä laboratorioissa. Laboratorion on aina suoritettava menetelmän verifiointi osoittaakseen, että se voi onnistuneesti käyttää validoitua menetelmää ja havaita kohdeorganismit oikein. Verifiointi on laajuudeltaan suppeampi kuin validointi, minkä takia tarve verifiointiin tulee, kun halutaan käyttöönottaa jo muualla validoitu menetelmä, tai kun tehdään muutoksia jo validoituun menetelmään. [26.]

Validoinnille sekä verifioinnille tulee asettaa tavoitteet jo suunnitteluvaiheessa. Tavoitteet voi laboratorio itse asettaa, tai ne voivat olla asiakkaiden tai viranomaisten vaatimia. Taustatiedot on tunnettava hyvin, jotta laatutavoitteet voidaan määrittää tapauskohtaisesti oikein. Nämä eri tekijät määrittävät esimerkiksi, kuinka matalia pitoisuuksia menetelmällä on pystyttävä määrittämään ja kuinka täsmällisiä tuloksia tulee saavuttaa. Validoinnissa ja verifioinnissa ei kuitenkaan aina tule pyrkiä mahdollisimman alhaisiin määritys- tai toteamisrajoihin, vaan keskittyä kriittisiin parametreihin ja menetelmään liittyviin häiriötekijöihin, joilla on suurin merkitys tuloksiin. [26.]

Elintarvikemikrobiologisten menetelmien käyttöönottoa ja pätevyyden osoittamista varten on kehitetty monia ohjaavia standardeja ja oppaita. Elintarvikeketjun mikrobiologisten menetelmien validointia ohjaavana standardina käytetään EN ISO 16140-3:a, joka sisältää protokollan vertailumenetelmien ja validoitujen vaihtoehtoisten menetelmien verifiointiin laboratorion sisällä. Laajoihin validointeihin, kuten laboratorioden itse kehittämien menetelmien validointiin käytetään EN ISO 16140-4 -standardia, joka on vaatimuksiltaan huomattavasti laajempi sekä haasteellisempi. [27.]

Standardissa EN ISO 16140-3 vaaditaan, että laboratorion tulee osoittaa menetelmän toimintakyky määrittämällä toteamisraja. Testien tavoitteena on osoittaa menetelmän herkkyys havaita salmonella näytteestä riittävällä tasolla. Laboratorion pitää noudattaa standardin asettamia ohjeita ja dokumentoida verifiointin kaikki vaiheet. EN ISO 16140-3 -standardi ei vaadi muita parametrejä määritettäväksi, mutta EN ISO/IEC 17025 -standardi, joka käsittelee akkreditointivaatimuksia, vaatii oikeellisuuden määrittämisen ja mittausepävarmuuden arvioinnin osana menetelmän verifiointia. Laboratorion tulee suorittaa pätevyyskoe, jotta akkreditointipalveluita tarjoava FINAS voi hyväksyä menetelmän käyttöön [28].

4.2 Verifiointin määritettävät parametrit

4.2.1 Toteamisraja

Kvalitatiivisen menetelmän verifiointin toteamisrajan määrittäminen on ehdoton. Standardin EN ISO 16140-3 mukaan toteamisraja kuvaa menetelmän soveltuvuutta käyttötarkoitukseen. Toteamisraja on matalin pitoisuus, jonka avulla voidaan todeta luotettavasti määritettävän mikrobin läsnäolo näytteestä. Raja-arvon tulee kuitenkin erota nollanäytteen arvosta merkittävästi. Määritettävä parametri LOD₅₀ on pitoisuus, jossa voidaan 50 %:n todennäköisyydellä havaita organismin läsnäolo. Havaitsemistasolla pitää saada ≥ 50 % positiivisia tuloksia. [29.]

Toteamisraja on yksi tärkeimmistä määritettävistä parametreista, koska sen avulla voidaan määrittää menetelmän herkkyys tunnistaa pieniä pitoisuuksia kohdeorganismia. Mitä matalampi toteamisraja on, sitä herkempi menetelmä on ja sitä pienempi määrä kohdeorganismia voidaan havaita. Menetelmän riittävä herkkyys on tärkeä osa elintarviketurvallisuuden takaamisessa ja ihmisten sekä eläinten terveyden turvaamisessa.

4.2.2 Oikeellisuus

Oikeellisuutta arvioidaan useiden mittaustulosten keskiarvon yhtäpitävyydellä mitattavan suureen sovitun raja-arvon kanssa. Oikeellisuutta kuvataan yleensä poikkeamana, joka määritetään vertaamalla menetelmällä saatuja tuloksia tiettyyn referenssiarvoon, joka on peräisin tunnetusta vertailumateriaalista tai tunnetulla menetelmällä saadusta mittaustuloksesta. Vertailumateriaalista saadulla referenssiarvolla tulisi olla jäljitettävyyttä kansainvälisiin mittanormaaleihin. Mittanormaali on kansainvälisen päätöksen perusteella tunnustettu arvo, joka toimii perustana määritettäessä muita saman suureen arvoja. [30.]

Hyvän vertailumateriaalin tulisi olla sertifioitu sekä mahdollisimman lähellä tutkittavia näytetyyppejä. Menetelmän oikeellisuutta voidaan arvioida myös osallistumalla laboratorioden välisiin pätevyyskokeisiin, jotka järjestetään vuodessa muutaman kerran. Pätevyyskokeiden tarkoituksena on osoittaa, että laboratorio hallitsee menetelmän ja saa sillä oikeita tuloksia. [30.] EN ISO/IEC 17025 -standardi vaatii vertailukokeisiin osallistumisen, jotta menetelmä voidaan hyväksyä laboratorion käyttöön. Hyväksyminen tapahtuu Ruokaviraston sekä FINASin kautta. Pätevyyden ylläpitämiseksi laboratorion tulee suorittaa pätevyyskokeita säännöllisesti.

4.2.3 Mittausepävarmuus

Mittaustuloksiin liittyy aina mittausepävarmuutta. Tulosten luotettavuuden varmistamiseksi tarvitaan luotettavuutta hyväksyttävällä mittausepävarmuuden

tasolla. Epävarmuuden arvioinnissa tulee ensin tunnistaa epävarmuustekijät. Mittaustuloksiin vaikuttaa useita eri tekijöitä, joita ei kuitenkaan aina voi tunnistaa. Kaikki mittaustulokset sisältävät epävarmuutta, jota voidaan kuvata vaihteluvälinä. Vaihteluvälin tavoitteena on taas kuvata tulosten arveltua vaihtelua. [31.]

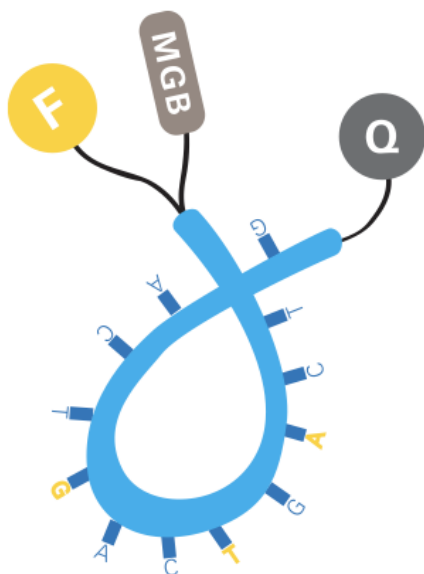
Tuloksiin vaikuttavien tekijöiden tunnistaminen, arvioiminen ja laskeminen auttavat ymmärtämään tuloksiin vaikuttavia vaikutusmekanismeja ja tekijöitä. Mittausepävarmuutta tarvitaan tulosten luotettavuuden ja oikeellisuuden arviointiin, vaatimustenmukaisuuden osoittamiseen, jäljitettävyyteen, tulosten keskinäiseen vertailuun sekä menetelmien keskinäiseen vertailuun ja arviointiin. [31.] Mikäli testausmenetelmälle ei voida määrittää tarkasti mittausepävarmuutta, tulee laboratorion esittää arvio perustuen menetelmän teoreettiseen toimintaperiaatteeseen tai kokemukseen. [28.]

4.3 SureTect qPCR -menetelmä

Thermo Scientific SureTect Salmonella species PCR Assay -menetelmä pohjautuu PCR-tekniikkaan, jossa DNA:ta monistetaan eksponentiaalisesti. Salmonellojen havaitsemisen ja analysoinnin mahdollistaa kitin sisältämät jo valmiiksi optimoidut alukkeet ja koettimet, jotka kykenevät tunnistamaan kohdeorganismien. Menetelmä mahdollistaa salmonellan toteamisen näytteestä jo 20 tunnissa. [32.]

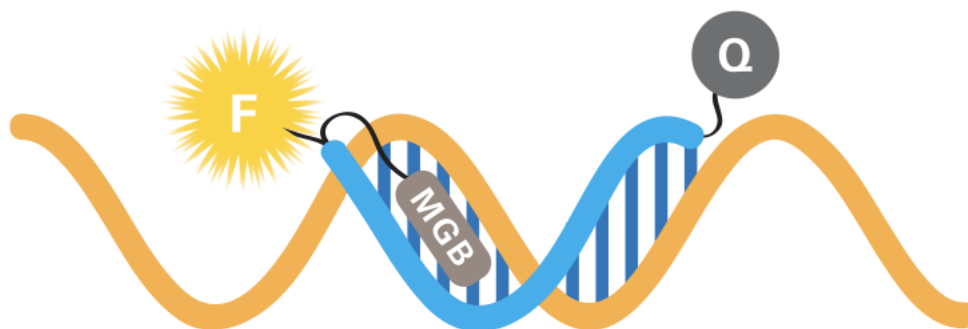
SureTect-menetelmässä ei tehdä varsinaista DNA:n eristystä, vaan rikastetut bakteerit suoralyysataan eli solut hajotetaan yhdistetyllä entsyymaattisella ja kuumennuskäsittelyllä. Lysaatti siirretään PCR-putkeen, jossa lysaatti liuottaa kylmäkuivatun reaktioseoksen. Detektio tehdään qPCR-laitteella, johon on asennettu kaupallinen RapidFinder-ohjelma tulosten tulkintaa varten. Detektio perustuu Solaris qPCR -teknologiaan, joka kykenee havaitsemaan kaikki kohdegeenin silmukoitusvariantit. Teknologia perustuu sen kykyyn tunnistaa konsensussekvenssi, joka on sama kaikilla varianteilla. Solaris-koettimeen liitettävä Minor Groove Binder -molekyyliliitos eli MGB-osa (kuva 3) mahdollistaa

lyhyempien koettimien suunnittelun sekä lisää genomien kattavuutta ja spesifisyyttä. [32.]



Kuva 3. Solaris-koetin, johon on liitetty FAM-reportteri, Eclipse Dark Quencheri sekä Minor Groove Binder -molekyylit [32].

FAM-reportterin tehtävänä on emittoida fluoresenssia, jotta qPCR-laite voi mitata fluoresenssia reaaliaikaisesti ekstensiovaiheen aikana. Kun DNA-polymeraasi syrjäyttää reportterin, se pääsee pois quencherin vaikutusalueesta ja fluoresoi. Quencherillä ja reportterilla on luonnollinen affiniteetti, minkä vuoksi lähekkäin ollessaan reportteri ei fluoresoi. Sitoutuneet väriainemolekyylit fluoresoivat vain heikosti tuottaen taustasignaalia. Matala taustasignaali lämpötilasta riippumatta PCR-sykliolosuhteiden alueella mahdollistaa korkean signaali-taustasuhteen. MGB-osa auttaa quencheriä tuomalla FAM-reportterin lähelle kuvan 4 osoittamalla tavalla. [32.]



Kuva 4. Lähtötilaan palattuun koetin muodostaa kierretyn rakenteen, jotta MGB-osa voi tuoda reportterin ja Quencherin (sammuttimen) lähelle toisiaan vähentäen taustasignaalia [32].

InvA-geeni on invaasioproteiinia koodaava geeni, joka on ominainen salmonellabakteereilla. InvA-geenistä on yli 30 tieteellisestä julkaisua, joissa geeni on todettu salmonellalla noin 99,7 %:lla [33]. SureTect-menetelmässä käytetään invA-geeniä salmonellojen osoittamiseen näytteestä. Geenin olemassaolo voidaan todentaa monistamalla kyseisen geenin tiettyä aluetta (konsensussekvenssi), joka tapahtuu geenialueen monistamiseen suunnitteluiden alukkeiden avulla. Näin voidaan tunnistaa suurin osa salmonellan serotyypeistä.

SureTect qPCR -menetelmä on validoitu valmistajan validoinneissa AOAC- ja AFNOR-validointivaatimusten mukaan laajalle valikoimalle erilaisia elintarvikkeita sekä lemmikkieläinten ruokia. AFNOR-validointi on suoritettu vasten EN ISO 16140-2 -standardia, joten menetelmä soveltuu käytettäväksi zoonoosiasetuksen mukaisiin salmonellan valvontatutkimuksiin. [34.]

Valmistajan teettämät validoinnit mahdollistavat pelkän verifiointin suorittamisen laboratorion sisällä. Menetelmä on validoitu Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 -laitteella sekä kaupallisella RapidFinder™ Analysis Software v1.0 -ohjelmalla. [35.]

4.4 SureTect qPCR -menetelmän virhelähteet

Valmistaja oli SureTect-kittien validoinneissa tutkinut menetelmän mittausepävarmuustekijöitä. Validoinnissa oli tutkittu pipetointimäärän vaikutusta tuloksiin, mutta vaikutusta ei havaittu lyysauspuskurin ohjemäärästä poiketessa $\pm 1 \mu\text{l}$ ja lysaatin poiketessa $\pm 2 \mu\text{l}$. Lisäksi valmistaja oli kokeillut inkubointiajan (16–25 h), inkubointilämpötilan (34–40 °C) sekä lyysauslämpötilan (35–39 °C) vaikutusta tuloksiin. Huomattavaa vaikutusta tuloksiin ei havaittu. [36, s. 515; 37, s. 559.]

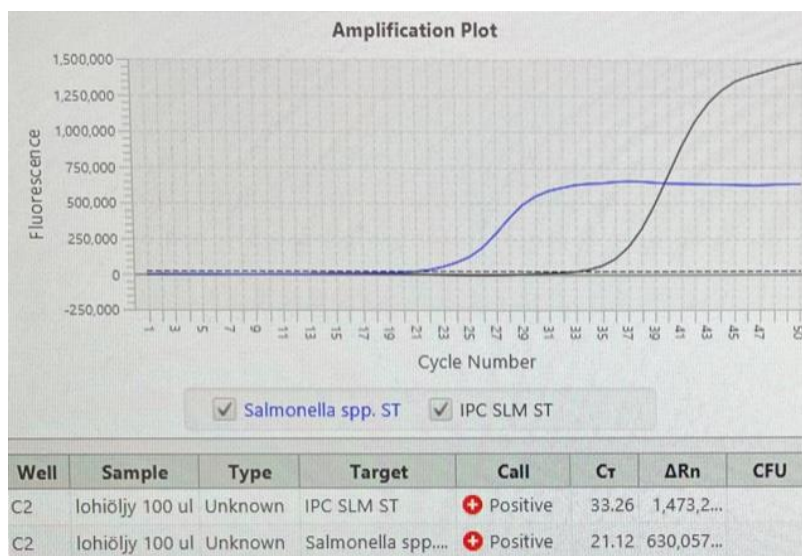
PCR-ajossa mittausepävarmuutta voi aiheuttaa inhibitio, joka johtaa siihen, että DNA ei monistu PCR-ajossa. Inhibition voi aiheuttaa epäoptimaaliset olosuhteet, minkä takia sisäisen kontrollin (IPC) käyttö on suotavaa, koska se antaa positiivisen signaalin, mikäli ajon olosuhteet ovat olleet kunnossa. Inhibitiota voi myös aiheuttaa haasteellinen matriisi. Haasteellisella matriisilla tarkoitetaan rasvaisia ja tummia näytteitä tai näytteitä, joissa esiintyy aineita, jotka voivat esimerkiksi sitoutua DNA-polymeraasiin tai vuorovaikuttaa DNA:n kanssa PCR-ajon aikana estäen halutun sekvenssin normaalin monistumisen [38, s. 40].

Kontaminaatio on suuri riski PCR-analytiikassa, koska menetelmä on todella kontaminaatioherkkä. Kontaminaatio voi tapahtua näytteen esikäsittelyvaiheesta PCR-putkiin pipetoinnin aikana. PCR-ajossa käytetään aina ympäätöntä rikastelientä, jotta voidaan poissulkea välineiden saastuminen. SureTect-menetelmässä käytettävä suojakalvo, jonka läpi pipetoidaan solujen hajotusvaiheen jälkeen, voi lisätä kontaminaatoriskiä.

SureTect-menetelmässä tulee aina tarkistaa, että PCR-reaktioseospelletti on liuennut. PCR-reaktio ei pysty toimimaan eikä RapidFinder-ohjelma pysty analysoimaan tulosta ilman, että pelletti on liuennut. Liukeneminen voidaan havaita värireaktiona eli reaktioseoksen sininen väri muuttuu vihreäksi.

RapidFinder-ohjelma tulkitsee tulokset automaattisesti ja antaa tulokset negatiivinen/positiivinen tai inhiboitunut. Ohjelmisto voi antaa virheellisen

tuloksen, minkä takia fluoresenssikäyrät tulee aina tarkistaa itse. Kuvassa 5 on esitetty, miltä oikea positiivinen tulos näyttää.



Kuva 5. Positiivinen qPCR-tulos, jossa IPC (musta) sekä kohdegeeni (sininen) ovat monistuneet onnistuneesti.

Mikäli tutkittava kohdegeeni eikä IPC monistu, vaikka reaktioseospelletti on liuennut ennen ajoa, kyse on todennäköisesti inhibitiosta. Silloin inhibitiota voi aiheuttaa lyysausputken pohjalta tulleet partikkelit tai näytematriisi. Näyte tulee aina pipetoida lyysausputken pinnalta, jotta häiritsevät partikkelit eivät päädy PCR-ajoon. Rikastetta voidaan myös laimentaa suhteessa 1:10 steriiliin veteen, jos lyysausputken pinnalta pipetoitu näyte on edelleen inhiboitunut.

Huomattavat pipetointivirheet voivat vaikuttaa tulosten oikeellisuuteen ja analyysin onnistumiseen. Pipetoitaessa tulee aina tarkistaa, että pipettiin on asetettu oikea määrä pipetoitavaksi. Erityisesti monikanavaisella pipetillä tulee aina tarkistaa, että pipetti on ottanut kaikista putkista ja määrät kärjissä ovat suhteellisen samat. Lisäksi pipettiä tulee pyyhkiä 70-prosenttisella etanolilla kontaminaatoriskin minimoimiseksi.

Käytetyt elatusaineet sekä reagenssit voivat aiheuttaa epävarmuutta menetelmässä. Rikasteliemen avulla saadaan salmonella esiin näytteestä, joten

rikastusliemellä on todella suuri merkitys varsinkin pienten salmonellapitoisuuksien havaitsemisessa. Samoin novobiosiini-lisäaineen virheellinen valmistus voi vaikuttaa salmonellan kasvuun ja johtaa epätarkkoihin sekä virheellisiin tuloksiin. Optimaalisen pitoisuuden (3 mg/225 ml) käyttäminen tukee salmonellan kasvua ja oikeellisia tuloksia.

SureTect-kitit sisältävät erilaisia reagensseja, jotka voivat aiheuttaa epävarmuutta. Kitti voi olla virheellisesti valmistettu tai analyysiä suorittaessa putkista voi lentää reagenssia ulos. Tämän takia lyysaus- ja PCR-putket tulee aina sentrifugoida niin, että reagenssit painuvat putkien pohjalle. Suojakalvoa poistaessa tulee kiinnittää huomiota, ettei strippi pääse kippaamaan reagensseja ulos. Aina ennen pipetointia olisi vielä hyvä tarkistaa, että kaikissa putkissa on reagenssia. Lisäksi jokainen kittierä tulee tarkistaa positiivisella testikannalla.

Salmonellan todentamisessa qPCR-menetelmällä voi olla riski saada väärä positiivinen tulos, koska qPCR tunnistaa DNA:ta eikä sitä, onko organismi elossa vai kuollut. Eläinperäisissä rehuissa on suuri riski, että raaka-aine on sisältänyt salmonellaa, mutta salmonella on kuollut rehun valmistusprosessin aikana, jolloin qPCR:llä todettu positiivinen tulos on virheellinen. Kuolleesta salmonellasta ei ole haittaa eläinten terveydelle eikä elintarviketurvallisuudelle.

Muutaman päivän kylmäsäilytys ei vaikuta rikastettujen bakteerien PCR-ajoon, vaan saattaa jopa parantaa tuloksia. Ongelmaksi voi kuitenkin nousta positiivisten näytteiden viljelyvarmistus. Tämä voi lisätä riskiä virheellisiin tuloksiin, koska salmonellan pitää pysyä hengissä eikä taustakasvu saa kasvaa salmonellan yli. Salmonellalle optimaalinen lämpötila lisääntyä on +37–42 °C, joten rikasteiden siirtämisen +4 °C:seen pitäisi hidastaa tai pysäyttää salmonellan lisääntyminen.

PCR-tulos ei yksinään riitä todentamaan salmonellan läsnäoloa näytteessä, vaan salmonella pitää saada myös kasvamaan maljalla, jotta siitä voidaan tehdä varmistustestaukset ja mahdollisesti eristää positiivinen salmonellakanta

zoonoosiasetuksen mukaan. Oikeiden pesäkkeiden tunnistaminen maljalla lisää mittausepävarmuutta, koska salmonellan eri serotyypit voivat kasvaa maljalla myös epätyypillisesti tai salmonellan kasvu maljalla voi jäädä muun kasvuston alle.

Vanhassa salmonellan toteamiseen käytetyssä menetelmässä näyte ensin rikastettiin, minkä jälkeen rikastettua bakteeria siirrostettiin selektiivisempään RVS-liemeen. RVS-liemestä viljeltiin edelleen maljoille ja tehtiin API- sekä agglutinaatiotestit. Vanhassa menetelmässä pätee siis osaltaan kaikki samat mittausepävarmuustekijät kuin SureTect qPCR -menetelmässä. SureTect qPCR -menetelmä on nopeampi ja sisältää vähemmän välivaiheita, mutta mittausepävarmuustekijät lisääntyvät. Nämä tekijät on hyvä tiedostaa, jotta menetelmällä saatuihin tuloksiin voidaan luottaa.

4.5 ISO EN 6579-1 -standardi salmonellan serotyypityksessä

Standardi EN ISO 6579-1 määrittelee vaatimukset salmonellan havaitsemiseksi ihmisten ja eläinten ruuista, ympäristönäytteistä elintarviketuotannon ja -käsittelyn osalta sekä alkutuotantovaiheen näytteistä, kuten eläinten ulosteista. Vaatimusten mukaisen menetelmän avulla voidaan havaita suurin osa salmonellan serotyypeistä.

Standardin vaatimille varmistusmenetelmille löytyy vaihtoehtoisia menetelmiä, joita voidaan soveltaa salmonellan biokemiallisessa todentamisessa, joista yleisimmät on esitelty seuraavaksi. Vaihtoehtoisten menetelmien käyttö edellyttää niiden suorituskyvyn varmistamista ennen käyttöä. [39.]

Viljely

Standardi vaatii käytettäväksi kahta erilaista kasvatusalustaa.

Kasvatusalustojen olisi hyvä olla suhteellisen erilaiset, jotta ne voivat kattaa mahdollisimman laajat kasvuolosuhteet salmonellojen kasvuille. Suositeltavaa olisi käyttää toisena kasvatusalustana XLD-agaria. Toinen yleinen selektiivinen

kasvatusalusta salmonellan havaitsemiseen on Rambach-agar. Kahden erilaisen maljan tarkoituksena on saada kaikki eri salmonellan serotyypit esiin. On kuitenkin mahdollista, että salmonellan 2 300 serotyypin joukosta löytyy sellainen, joka ei kasva XLD- tai Rambach-maljoilla.

XLD-agar on selektiivinen sekä differentiaalinen aine, jota käytetään *Shigellan* ja salmonellan primaarisessa eristämisessä. XLD:n sisältämä hiivauute toimii kasvuun tarvittavien ravinteiden ja vitamiinien lähteenä. Natriumdeoksikolaatti toimii selektiivisenä aineena estäen grampositiivisten bakteerien kasvun. Agar sisältää ksyloosia, jota lähes kaikki enterobakteerit, paitsi shigella, fermentoivat mahdollistaen vain sen kasvun. Agarin sisältämän lysiinin tarkoituksena on erottaa salmonellat muista ei-patogeenisista lajeista. Ilman lysiiniä salmonellat fermentoisivat ksyloosia eikä niitä voitaisi erottaa muista ei-patogeenisista lajeista. [40.]

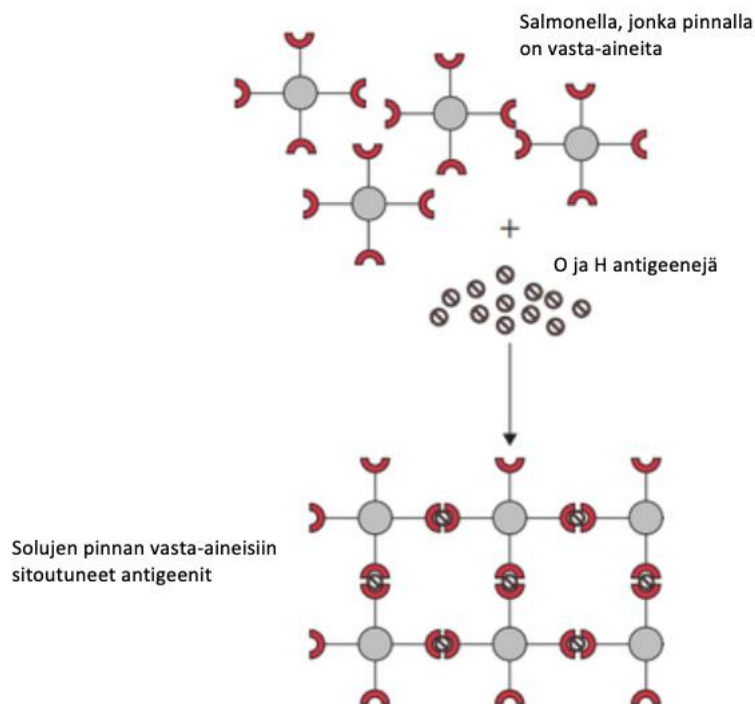
Shigellat eivät pysty fermentoimaan ksyloosia tuottamaan happoa ja sen takia jäävät punaisiksi pesäkkeiksi. Salmonella dekarboksyloi lysiiniä ksyloosin loppumisen jälkeen nostaan pH:ta ja muodostaen punaisia pesäkkeitä. Sen jälkeen salmonella metaboloii tiosulfaattia ja syntyy rikkivetyä, minkä seurauksena punaiset pesäkkeet saavat mustat keskukset. XLD-agarilla shigellat kasvavat punaisina pesäkkeinä ja salmonellat mustina. [41.]

Rambach-agarin sisältämät substraattit suosivat enterobakteerien kasvamista ja agarin sisältämä natriumdeoksikolaatti estää grampositiivisten bakteerien kasvun. Rambach mahdollistaa salmonellojen erottamisen muista bakteereista perustuen agarin sisältämään propeeniglykoliin. Salmonellat tuottavat happoa propeeniglykonin kanssa muodostaen pH-indikaattorin kanssa punaisen värin. Salmonellojen erottamiseksi koliformeista agar sisältää kromogeenin, joka osoittaa β -galaktosidaasin hajoamisen. Kyky hajottaa β -galaktosidaasia on ominaista koliformeille, mutta ei salmonelloille. Koliformit kasvavat sinivihreinä tai sinisen violettisina pesäkkeinä ja salmonellat oranssin punertavina pesäkkeinä. [42.]

Serologinen varmistaminen

Serologinen varmistus voidaan suorittaa virus- ja bakteeriantigeenien sekä vasta-aineiden havaitsemiseksi. Tekniikoita on monia, mutta yleisimpiä ovat ELISA, kemiluminesenssi, agglutinaatio, suora ja epäsuora immunofluoresenssi sekä Western blotting, joista seuraavaksi käsitellään agglutinaatiota, koska se on nopein ja vähäkustanteisin. [43.] Serologinen varmistus on hyvä tehdä ennen biokemiallista varmistamista.

Agglutinaatiotesti perustuu antigeeni-vasta-ainereaktioon, jonka seurauksena solut pakkaantuvat näkyvästi. Antigeenit sitoutuvat solujen pinnalla oleviin vasta-aineisiin kuvan 6 esittämällä tavalla. Antigeenien reagoiessa spesifisten vasta-aineiden kanssa syntyy näkyvää sakkaa. [44.]



Kuva 6. Agglutinaatio perustuu biospesifiseen vuorovaikutukseen antigeenien ja vasta-aineiden välillä [45].

MAST® Assure Antiserum Salmonellan sisältämän antiseerumiliuoksen avulla voidaan tunnistaa O- ja H-antigeenit salmonellan todentamiseen. Näyte muodostaa ryynimäistä sakkua salmonellan läsnäollessa. Seerumi on valmistettu kaneista, jotka ovat hyperimmunisoitu tapettujen organismien standardikannoilla sekä sisältää tunnetut serotyypit tai ryhmäspesifiset antigeenit.

Biokemiallinen todentaminen

Biokemialliset testit lyhentävät mikrobien tunnistamiseen käytettävää aikaa ja pienentävät kustannuksia. Sen takia se on nopeasti kehittyvä suuntaus mikrobien tunnistuksessa. Biokemiallisia testejä on kaupallisena, kuten paperisubstraatteja hyödyntävä Minitek-tunnistusjärjestelmä, kuivajauhesubstraatteja käyttävä API 20 -kitti, entsyymiaktiivisuutta määrittävä PIZYMAN-IDENT, RaPID-ANA-kitti sekä kokonaan automatisoidut tunnistusohjelmat. [46.] Salmonellan tunnistamisessa kaupallisista kiteistä yleisin on API 20E -kitti, joka on standardoitu enterobakteerien sukuun kuuluvien bakteerien toteamiseen ja erottamiseen perustuen niiden biokemiallisiin ominaisuuksiin. [47.]

5 Työn toteutus

5.1 Matriisi ja koejärjestelyt

SureTect Salmonella species PCR Assay -kitin verifiointikokeet suoritettiin *Salmonella enterica subsalamae, serovar Tranoroa* ATCC 700148 -kannalla. Menetelmän toteamisrajan määrittämiseen käytettiin EN ISO 16140-3 -standardin mukaisia ympäryspitoisuuksia sekä rinnakkaisia, jotka on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Rinnakkaisten määrät sekä tavoitepitoisuudet eri pitoisuustasoilla, joita noudatettiin jokaiselle näytetyypille.

Inokulaatiotaso	Korkea taso 9 x LOD ₅₀	Keskitaso 3 x LOD ₅₀	Matala taso 1 x LOD ₅₀	Nolla taso
Rinnakkaisten määrä	1	4	4	1
Tavoitepitoisuus	9 pmy / näyte	3 pmy / näyte	1 pmy / näyte	0 pmy / näyte

Tavoitepitoisuudet vaihtelivat sen mukaan, oliko valmistaja käyttänyt kitin validoinnissa samoja näytetyyppejä ja mikä oli määritetty toteamisraja (LOD₅₀). Mikäli samaa näytetyyppiä ei ollut validoitu valmistajan toimesta, toteamisrajan oletettiin olevan 1 pmy. Verifiointikokeissa kaikkiin näytteisiin pyrittiin ymppäämään samat määrät, jotta arvioituksi toteamisrajaksi (eLOD₅₀) saataisiin määritettyä riittävä ja tuloksia pystyttäisiin vertailemaan.

Laboratoriolla on akkreditoituna SureTect qPCR -menetelmä *Salmonella spp.* -bakteerien toteamiseen elintarvikkeista ja kasviperäisistä rehuista. Eläinten ruuat ja rehut ovat standardin EN ISO 16140-3 mukaan lisämatriiseja, jotka eivät kuulu laajaan elintarvikematriisikategoriaan, joten vaatimukset näytetyypeille ovat erilaiset. Laboratorion tulee valita aina itselleen tarkoituksenmukaisia ja menetelmän kannalta haastavia matriiseja, kuten korkean taustamikrobiston omaavia, rasvapitoisia tai vähäkosteisia näytteitä.

Näiden vaatimusten perusteella päädyttiin valitsemaan seuraavat näytteet.

Eläinperäiset rehunäytteet:

- koiranruoka kuivanappula (Royal Canin, Hypoallergenic)
- lohipuruluutikku (HAU-HAU Champion, Lohipuruluutikku)
- lohiöljy (Avital, Salmon oil)
- koiran märkäruoka (K-menu, Kanapatee)
- vasikan maitojauhe (Josera, Colostrin).

Lisäksi verifiointikokeissa kokeiltiin porsaille tarkoitetun rehun raaka-aineen heran pienin pitoisuus, jonka menetelmä pystyy tunnistamaan. Näytettä ei otettu mukaan verifiointikokeisiin, koska näyte inhiboi salmonellan kasvua voimakkaasti eikä standardin vaatimaa toteamisrajaa olisi pystytty saavuttamaan.

Koejärjestelyiden tavoitteena oli määrittää luotettavasti menetelmälle arvioitu toteamisraja, jonka pohjalta arvioitiin myös mittausepävarmuutta. Tulokset varmistettiin standardin EN ISO 6579-1 mukaisesti jokaisen pitoisuustason yhdeltä rinnakkaiselta. Lisäksi verifioinnin tavoitteena oli menetelmän suorituskyvyn lisäksi osoittaa, että salmonella pystytään osoittamaan näytteestä yhtä luotettavasti vielä viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen jälkeen.

5.2 Näytteiden esikäsittely

Ympäyksiä varten salmonellakanta piti elvyttää, joka tapahtui siirrostamalla muutama pesäke salmonellaa 5 ml:aan BHI-lientä. Bakteeria inkuboitiin 37 °C:ssa 24 h. Kasvaneesta bakteeriliemestä tehtiin laimennossarja ja pipetoitiin rinnakkain PCA-maljoille ja inkuboitiin kuten edellä. Laimennossarjojen tulosten perusteella laskettiin ympättävät pitoisuudet.

Näytettä punnittiin 25 grammaa steriileihin purkkeihin aseptisesti. Näytteisiin pyrittiin ympäämään tavoitepitoisuuksien mukainen määrä salmonellaa. Rikastetta eli puskuroitua peptonivettä lisättiin näytteisiin 225 ml, minkä tarkoituksena on saada pienikin määrä salmonellaa esiin näytteestä, suosimalla salmonellan kasvua viljelmässä. Saannon parantamiseksi näytteisiin lisättiin vielä novobiosiini-lisäainetta 100 µl (3 mg), minkä tavoitteena oli estää grampositiivisten ja joidenkin gramnegatiivisten bakteerien kasvua ja edistää salmonellan kasvua rikasteessa. Vaikka salmonella on gramnegatiivinen bakteeri, se on silti vastustuskykyinen novobiosiinille, minkä takia novobiosiinin läsnäolo hyödyttää salmonellaa vähentämällä kilpailua muiden bakteerien kanssa. Rikasteita inkuboitiin 37 °C:ssa 20 tuntia, jonka jälkeen näytteet voitiin analysoida qPCR-laitteella.

5.3 Näytteiden analysointi

20 tunnin inkuboinnin jälkeen näytteet olivat valmiita analysoitavaksi. PCR-ajoon otettiin mukaan negatiivinen eristyskontrolli, joka oli ympäätöntä rikastetta. Suuren kontaminaatorisikin vuoksi pipetit ja työtasot pyyhittiin 70-prosenttisella etanolilla ennen ja jälkeen työskentelyn.

Suoralyysausputket sisältävät valmiiksi solujen hajotukseen tarvittavat reagenssit. Putkiin lisättiin ensin kitin ohjeiden mukaan 10 µl proteinaasi K:ta (SureTect™ Salmonella Species PCR Assay, REF: A56841), joka auttaa hajottamaan proteiineja ja vapauttamaan salmonellan DNA:ta. Ennen soluhajotuksen kuumennuskäsittelyä, putkiin lisättiin vielä 10 µl näytettä.

Solujen hajotus tapahtui SimpliAmp Thermal Cycler -laitteen avulla. Laite käy läpi valmiin kuumennuskäsittelyohjelman (taulukko 2) vaihdellen lämpötilaa +10 °C:sta 95 °C:seen ja päättäen syklit + 4 °C:seen, jossa näytteitä voitiin tarpeen tullen säilyttää 24 tuntia.

Taulukko 2. SimpliAmp-laitteen kuumennuskäsittelyohjelman vaiheet.

Vaihe	Lämpötila	Kesto
1	+37 °C	10 min
2	+95 °C	5 min
3	+10 °C	2 min
4	+4 °C	∞

Kuumennuskäsittely kesti 19 minuuttia, jonka jälkeen lyysausputkista siirrettiin 20 µl näytettä valmiiksi annosteltuihin PCR-putkiin. Kylmäkuivatun reaktioseospelletin liukeneminen varmistettiin yhdistetyllä sentrifugi/vortex-laitteella. Liennut reaktioseospelletti muuttui sinisestä vihreäksi.

qPCR-ajo suoritettiin Thermo Scientificin Quantstudio™ 5 qPCR -laitteella ja RapidFinder-ohjelmiston avulla. RapidFinder-ohjelmisto analysoi tulokset

positiivinen, negatiivinen tai epäselvä/inhiboitunut. PCR-ajon jälkeen jokaisen pitoisuustason yhdeltä rinnakkaiselta siirrostettiin 10 µl XLD- ja Rambach-agareille varmistustestauksia varten.

Rikasteet siirrettiin kylmään (+4 °C) viiden vuorokauden kylmäsäilytystä varten, jonka jälkeen nollanäytteelle ja kaikille matalimman ympypitoisuuden rinnakkaisille suoritettiin PCR-ajo uudestaan. Tulosten tuli olla yhtenevät aiemman ajon kanssa. Kylmäsäilytysajon jälkeen matalimman ympypitoisuuden jokaisesta rinnakkaisesta viljeltiin XLD- ja Rambach-agareille, mutta API- tai agglutinaatiotestejä ei suoritettu kylmäsäilytetyille näytteille.

Oikeellisuus

Verifiointikokeissa menetelmällä saatujen tulosten oikeellisuutta arvioitiin osallistumalla laboratorioden väliseen pätevyyskokeeseen. Pätevyyskoetta varten laboratorio tilasi näytteen kokeita järjestävältä taholta. Eläinperäisten rehujen ja rehun raaka-aineiden pätevyyskokeeseen laboratorion tuli valita näyte, joka oli mahdollisimman lähellä tutkittavia näytetyyppejä.

Laboratorio osallistui menetelmällä LGC:n rehuvertailukoeierrokselle (AFPS, kierros 54). Pätevyyskoe näyte eli koiran kuivanappula esikäsiteltiin ja analysoitiin samalla tavalla kuin aiemmat näytteet. Näytteelle suoritettiin kaikki varmistustestaukset ja PCR-ajo viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen jälkeen.

5.4 Näytteiden varmistustestaukset

Varmistustestaukset toteutettiin standardin EN ISO 6579-1 ohjeistuksen mukaan. Laboratoriolla on käytössä salmonellan varmistamiseen API 20E -kitti sekä agglutinaatiotesti. Standardi EN ISO 6579-1 vaatii varmistustesteissä käytettäväksi urea-, LDC- sekä TSI-testaukset, jotka löytyvät kaikki API 20E -testistä. Lisäksi standardissa mainitaan vapaavalintaisista β -galaktosidaasin ja indolin tuottotesteistä, jotka sisältyvät myös API 20E -testiin. Verifiointikokeissa

oli tavoitteena osoittaa vaihtoehtoisen kaupallisen API 20E -menetelmän suorituskyky salmonellan biokemiallisessa todentamisessa.

Viljely

Standardin ohjeiden mukaan selektiivisestä liemestä siirrostettiin hajotusviljelmänä XLD-agarille sekä toiselle vapaa valintaiselle selektiiviselle agarille, johon valittiin Rambach-agar. Varmistustestaukset toteutettiin yhdelle rinnakkaiselle jokaiselta pitoisuustasolta. Tavoitteena oli saada salmonella kasvamaan maljalla, jotta pesäkkeistä voitiin tehdä API- ja agglutinaatiotestit.

Agglutinaatiotesti

Agglutinaatiotestaukset suoritettiin MAST® Assure Antiserum Salmonellaliuoksella. Agglutinaatiotestin suorittamiseen tarvittiin objektilasi, silmukka sekä XLD- tai Rambach-malja, joissa on kasvanut tyypillisiä salmonellan pesäkkeitä. Antiseerumiliuosta asetettiin tippa objektilasille, johon siirrostettiin silmukalla pesäke maljalta. Objektilasia keinuteltiin, jotta sakan muodostuminen voitiin havaita positiivissa näytteissä.

API 20E -testi

API-testi suoritettiin Biomérieuxin API 20E -kitillä. API-testin suorittamiseen maljoilta valittiin tyypillisen näköisiä pesäkkeitä, joita siirrostettiin 5 ml:n steriiliä vettä. Putki sekoitettiin huolella ja pipetoitiin kaivoihin varovasti reunaan pitkin välttämällä ilmakuplien muodostuminen. Ilmakupla voi estää liuoksen ja substraatin täydellisen liukenemisen. Alleviivattuihin kaivoihin (ADH, LDC, ODC, H₂S ja URE) lisättiin ennen inkubointia mineraaliöljyä anaerobioosin luomiseksi. Testiliuska siirrettiin 36 °C ± 2 °C:seen 18–24 tunniksi. Tulokset luettiin inkuboinnin jälkeen.

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

6.1 Toteamisrajan määrittäminen

Verifiointin tavoitteena oli saada jokaiselle näytetyypille standardin mukaan hyväksyttävä arvo. MetropoliLabin laboratorio on aiemmissa SureTect-menetelmien verifiointikokeissa saanut elintarvikkeille ja kasvipörsäisille rehuille toteamisrajaksi ≤ 5 pmy/25 g, jota käytetään laboratorion sisäisissä herkkyysmäärittämissä, kun testataan menetelmän herkkyyttä sekä elatusaineiden toimivuutta. Eläinperäisille rehuille oli tavoitteena saada vähintään sama toteamisraja määritettyä jokaiselle näytetyypille.

EN ISO 16140-3 -standardissa käytetään toteamisrajan (LOD_{50}) sijaan arvioitua toteamisrajaa ($eLOD_{50}$), koska LOD_{50} -arvon tarkkaa määrittäystä ei ole mahdollista suorittaa. Tämä johtuu siitä, että EN ISO 16140-3 -standardissa vaadittujen testattavien näytteiden määrä on huomattavasti pienempi verrattuna EN ISO 16140-2 -standardin edellyttämään näytemäärään, jota käytetään laajemmissa validoinneissa, kuten kaupallisten menetelmien validoinneissa. [29.]

Standardi EN ISO 16140-3 antaa positiivisten näytteiden määrän mukaan vertailuarvon, jonka avulla näytteille voidaan määrittää $eLOD_{50}$. Liitteessä 1 on esitetty kuva standardin EN ISO 16140-3 vertailuarvo-taulukosta. Taulukossa 3 on esitetty näytetyypeille saadut positiiviset tulokset ympäristötasoilta sekä määritetty $eLOD_{50}$.

Taulukko 3. Näytteiden eLOD₅₀ määritykset.

Näyte	Korkea taso 9 x LOD ₅₀		Keskitaso 3 x LOD ₅₀		Matala taso 1 x LOD ₅₀		Nollat aso	eLOD ₅₀
	pmy/ näyte	Tulos*	pmy/ näyte	Tulos	pmy/ näyte	Tulos	Tulos	Tulos
Kuivanappula	13	1/1	4,5	3/4	1	2/4	0/1	1,3 pmy
Maitojauhe	7,5	1/1	5,5	4/4	≤ 1	3/4	0/1	≤ 1 pmy
Märkäruoka	7,5	1/1	5,5	4/4	≤ 1	3/4	0/1	≤ 1 pmy
Puruluut	7,5	1/1	3	3/4	1,5	2/4	0/1	1,95 pmy
Lohiöljy	11	1/1	4,5	3/4	2,5	2/4	0/1	3,25 pmy

*Tulosarakeissa on esitetty saadut positiiviset näytteet verrattuna analysoituihin määriin.

Verifiointikokeissa koiran kuivanappulalle saatiin matalimmalla tasolla 2/4 positiivisia tuloksia, kun näytteeseen oli laskennallisesti ympätty 1 pmy.

Keskitasolla on ympätty 4,5 pmy ja saatu 3/4 positiivisia tuloksia.

Nollanäytteestä on aina saatava negatiivinen tulos, koska ilman negatiivista tulosta ei toteamisraja ole oikeellinen.

Standardin antaman vertailuarvon avulla saatiin laskettua arvioitu toteamisraja.

Koiran kuivanappuloille eLOD₅₀-arvoksi saatiin 1,3 pmy, joka laskettiin pienimmän ympätyn pitoisuuden (LIL) sekä standardin antaman vertailuarvon (liite 1) avulla. Koiran kuivaruuuan kaikki tulokset on esitetty liitteessä 2.

Vasikan maitojauheelle ja koiran märkäruualle saatiin täysin samanlaiset tulokset ja määritettyä toteamisrajaksi jopa alle 1 pesäkettä. Lohipuruluista sen sijaan salmonella voitiin havaita alle 2 pmy tarkkuudella. Koiran märkäruuan tulokset on esitetty kootusti liitteessä 3, vasikan maitojauheen liitteessä 4 sekä lohipuruluiden liitteessä 5.

Lohiöljy oli koostumukseltaan täysin erilainen kuin muut näytetyypit. Rasvaisuus ja nestemäinen muoto tekivät siitä haasteellisen näytetyypin menetelmän kannalta. Muissa näytetyypeissä näyte otettiin rikasteen pinnalta, mutta lohiöljyn

kohdalla rikaste oli jakautunut kahteen faasiin, jossa päällä oli rasva. Näyte otettiin alemmasta faasista. Mikäli näyte olisi otettu ylemmästä faasista, PCR-reaktio olisi todennäköisesti inhiboitunut. Rasva ei kuitenkaan inhiboinut PCR-reaktiota, ja lohiöljylle saatiin määritettyä $eLOD_{50}$ -arvoksi 3,25 pmy. Se oli korkein toteamisraja verrattuna muihin näytetyyppeihin. Lohiöljylle saadut tulokset on esitetty liitteessä 6.

Toteamisrajat vaihtelivat $\leq 1-3,25$ pmy, joten eroa tulosten välillä ei juuri ollut. Menetelmän toteamisraja saadaan näytetyyppien toteamisrajojen keskiarvosta, mikä eläinperäisille rehuille on ≤ 2 pmy. Menetelmällä voidaan todeta todella alhaisia pitoisuuksia salmonellaa.

Menetelmän toteamisraja AFNOR-validoinnin (MicroVal Study, 2022LR111) perusteella lemmikkieläinten kuiville ja märkäruuille vaihteli 1–1,3 pmy. Määritettävä arvo $eLOD_{50}$ saa olla korkeintaan neljä kertaa suurempi kuin alkuperäisessä validoinnissa määritetty LOD_{50} -arvo. LOD_{50} -arvo voi olla suurempi kuin yksi, jolloin $eLOD_{50}$ voi olla suurempi kuin 4. Näytetyypeille määritetyn $eLOD_{50}$ -arvon tulee olla alle hyväksyttävyyssrajan, joka määritetään alla olevan kaavan 1 mukaisesti.

$$eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50} \quad (1)$$

Mikäli LOD_{50} -arvoa ei ollut tiedossa näytetyypille eli valmistaja ei ollut tutkinut kyseistä näytetyyppiä menetelmän validoinnissa, oletettiin LOD_{50} -arvon olevan 1 pmy/25 g. Taulukossa 4 on esitetty näytetyyppien $eLOD_{50}$ -arvot ja niiden hyväksyttävyyssrajat.

Taulukko 4. Hyväksyttävyyssrajat.

Näyte	eLOD ₅₀ (pmy)	LOD ₅₀ (pmy)	eLOD ₅₀ ≤ 4·LOD ₅₀ (pmy)
Kuivanappula	1,3	1	1,3 ≤ 4
Vasikan maitojauhe	≤ 1	Ei määritetty, joten 1	≤ 1 ≤ 4
Märkäruoka	≤ 1	1,3	≤ 1 ≤ 5,2
Puruluutikku	1,95	Ei määritetty, joten 1	1,95 ≤ 4
Lohiöljy	3,25	Ei määritetty, joten 1	3,25 ≤ 4

Valmistaja oli koiran kuivanappuloiden toteamisrajaksi saanut määritettyä validoinneissaan 1 pmy. eLOD₅₀-arvo saa olla neljä kertaa suurempi kuin 1 pmy eli näytetyypin hyväksyttävä raja-arvo on 4 pmy. eLOD₅₀-arvo 1,3 pmy on pienempi kuin näytetyypille määritetty hyväksyttävä raja-arvo 4 pmy.

Koiran märkäruualle valmistaja oli validoinneissaan määrittänyt toteamisrajaksi 1,3 pmy, joka verifiointikokeissa saa olla neljä kertaa suurempi. Verifiointikokeissa märkäruualle saatiin kuitenkin määritetty eLOD₅₀-arvoksi ≤ 1 pmy, joka on huomattavasti pienempi kuin näytetyypille määritetty hyväksyttävyyssraja 5,2 pmy.

Valmistaja ei ollut validoinneissaan käyttänyt vasikan maitojauhetta, koiran lohipuruluita eikä lohiöljyä näytetyypeinä, joten LOD₅₀-arvon oletettiin olevan 1 pmy. Vasikan maitojauheelle, puruluille ja lohiöljylle verifiointikokeissa määritetyt eLOD₅₀-arvot olivat pienemmät kuin näytteille määritetyt hyväksyttävyyssrajat. Kaikki näytetyypit alittivat niille asetetut hyväksyttävyyssrajat.

6.2 Mittausepävarmuuden arvioiminen

Mittausepävarmuuden arvioinnissa käytettiin menetelmälle määritettyä toteamisrajaa, joka standardin mukaan on $\leq 4 \times \text{LOD}_{50}$. Koska menetelmä on kvalitatiivinen eli tulokset eivät ole määrällisiä, ei pystytä laskemaan luottamusväliä, joka kuvaisi prosentuaalisesti oikean tuloksen saavutettavuutta. Menetelmän toteamisrajan avulla voidaan kuvata kvalitatiivisen menetelmän mittausepävarmuutta. Tämän määrittelee EN ISO/IEC 17025 -standardi.

$e\text{LOD}_{50}$ -arvot vaihtelivat $\leq 1-3,25$ pmy ja alittivat hyväksyttävyyssrajat. Tulosten keskiarvoksi eli eläinperäisten rehujen toteamisrajaksi saatiin ≤ 2 pmy. Tulos on todella alhainen ja kertoo menetelmän herkkyydestä todentaa salmonellaa. Menetelmälle otetaan kuitenkin käyttöön Metropolilabin aiemmissa salmonellan verifiointikokeissa määritetty toteamisraja ≤ 5 pmy, koska eläinperäiset rehut sisältyvät laajempaan matriisikategoriaan, jolle määritetty tämä ≤ 5 pmy. Lisäksi määritetyn toteamisrajan (≤ 2 pmy) ja käyttöönotettavan toteamisrajan (≤ 5 pmy) väliin jäävä 3 pesäkettä kuvaa menetelmän mittausepävarmuustekijöiden mahdollista vaikutusta tuloksiin. Korkeamman toteamisrajan asettamisella menetelmälle voidaan varmistua sen saavutettavuudesta jokaisella suorituskerralla.

Valmistaja on validoinnissaan määrittänyt, että rikasteet säilyvät ≤ 72 h $+2-8$ °C:ssa. Kylmäsäilytyksen vaikutusta analyysituloksiin tutkittiin analysoimalla matalan tason kaikki näytteet uudelleen viiden vuorokauden jääkaappisäilytyksen ($+4$ °C) jälkeen. Kylmäsäilytyksen jälkeen näytteille oli tavoitteena saada alkuperäisiä tuloksia vastaavat tulokset. Näytteille saatiin yhtenevät tulokset kylmäsäilytyksen jälkeen, eikä viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen todettu vaikuttavan tulosten oikeellisuuteen. Kaikkien näytteiden kylmäsäilytyksen tulokset on esitetty liitteessä 7.

6.3 Oikeellisuuden varmistaminen

Pätevyyskokeiden tavoitteena on saada vertailukoenäytteestä oikea tulos, joka tuli analysoida laboratorion käytössä olevalla menetelmällä. Pätevyyskoenäyte analysoitiin menetelmäohjeen mukaisesti. Näytteestä saatiin positiivinen *Salmonella spp.* -bakteeri tulos qPCR:llä sekä varmistustesteillä 99,8 %:n todennäköisyydellä. Menetelmällä saatu positiivinen tulos oli oikea tulos, joten menetelmällä voidaan luotettavasti saada oikeellisia tuloksia.

6.4 Varmistustestaukset

Viljely

Positiivisesta rikasteesta siirrostettiin 10 µl:n silmukalla hajotusviljelmänä XLD- ja Rambach-maljoille. Kuvassa 7 on esitetty maljat, joissa salmonella kasvaa runsaasti ja tyypillisin pesäkkein.



Kuva 7. Vasemmalla XLD- ja oikealla Rambach-maljaviiljely, joissa molemmissa salmonella kasvaa tyypillisin pesäkkein.

Salmonella kasvaa yleensä XLD-maljalla mustina pesäkkeinä ja Rambach-maljoilla oranssin punertavina pesäkkeinä. Salmonellan kasvu voi jäädä myös muun kasvuston alle, jolloin se jää huomaamatta ja tulos on virheellinen. Kaikkien näytteiden jokaisesta positiivisesta rikasteesta viljelty malja oli positiivinen. Pesäkkeet olivat tyypillisiä salmonellan pesäkkeitä. Kaikkien

näytetyyppien viljelytulokset ovat esitetty liitteissä 2–6 varmistustestien sarakkeissa.

Agglutinaatio

Kallistelemalla objektilasia reagenssit sekoittuivat ja voitiin huomata sakan muodostuminen kuvan 8 esittämällä tavalla.



Kuva 8. Positiivinen agglutinaatiotesti. Positiivinen testi voidaan todeta valkoisen sakan muodostuessa. Parhaiten tuloksen näkee tummaa vasten.

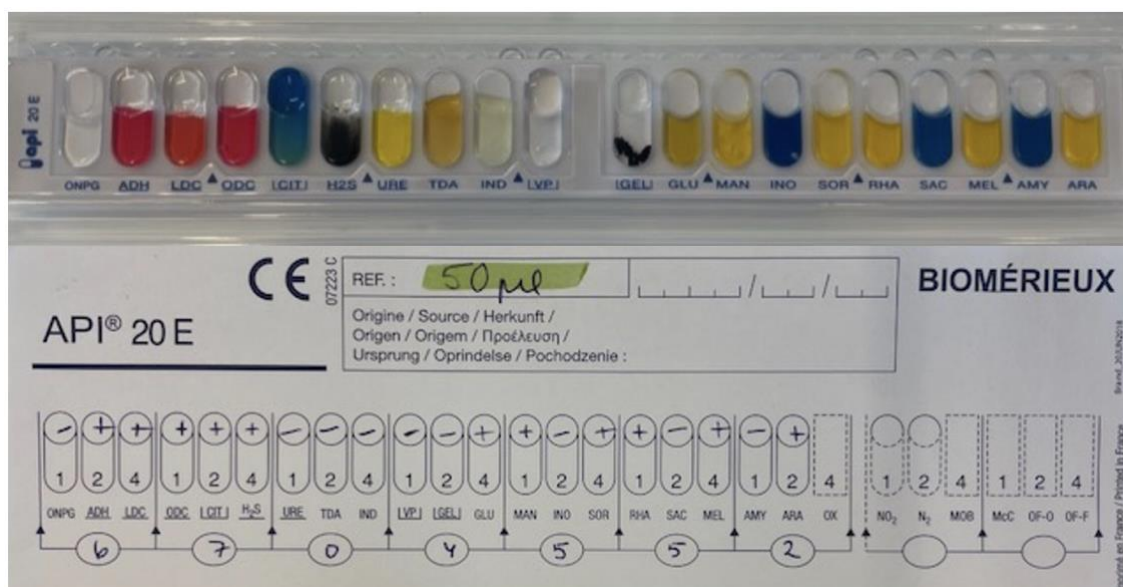
EN ISO 6579-1 -standardi ei vaadi agglutinaation suorittamista, vaan laboratorio voi sen halutessaan suorittaa ennen API-testiä. Mikäli valittu pesäke ei agglutinoi, API-testiä ei suoriteta, koska salmonellan kuuluu agglutinoida. Pelkän positiivisen agglutinaatiotestin perusteella ei voida kuitenkaan virallisesti todeta salmonellan läsnäoloa.

Kaikille varmistustestien näytteille saatiin positiivinen tulos agglutinaatiotesteistä. Näytteet tuottivat selkeän positiivisen reaktion moniarvoisen antiseerumin kanssa. Antiseerumin edustamien O- ja H-ryhmien perusteella voitiin olettaa salmonellan läsnäolo. Suoritettujen

agglutinaatiotestien tulokset on esitetty näytetyypeittäin liitteissä 2–6 varmistustestaukset sarakkeissa.

API 20E -testi

API 20E -testi suoritettiin positiivisille agglutinoiville näytteille. Kuvassa 9 on esitetty positiivinen API-testi *Salmonella spp.* -bakteerille sekä esitetty API-testin tulokset tuloskaavakkeen avulla.



Kuva 9. Salmonellalle positiivinen API-testi ja tulokset. Verifiointikokeissa kaikille näytetyypeille saatiin samanlaiset tulokset API-testistä. Testiliuskaan on lisätty kaikki reagenssit inkuboinnin jälkeen.

Verifiointikokeissa käytetty salmonellakanta API-testin perusteella (kuva 9) kykenee muuttamaan argiinin ornitiiniksi, ammoniakiksi ja hiilidioksidiksi sekä dekarboksyloimaan lysiniä ja ornitiiniä. Salmonellakanta kykenee käyttämään sitraattia ainoana hiilihyaatrin lähteenä ja tuottaa rikkivetyä tiosulfaatista. Lisäksi se kykenee fermentoimaan glukoosia, mannitolia, sorbitolia, ramnoosia, melibioosia sekä arabinoosia. Kaivot olivat väriltään hyvin tunnistettavissa negatiiviseksi tai positiiviseksi. Kuvassa 9 on esitetty myös värinmuutosten tulkintojen tulokset ja pisteytetty tulokset tuloskaavakkeen avulla.

Tulokset tulkittiin käyttäen apuna apiweb™ -tunnistusohjelmaa, joka antaa kuvassa 9 annettujen pisteytysten perusteella prosentuaalisen arvion, mikä bakteeri on kyseessä. Kuvan 9 API-testistä saatiin ID %:ksi *Salmonella spp.* -bakteeri 89,6 %:n todennäköisyydellä. Kaikille suoritetuille näytetyypeille saatiin *Salmonella spp.* -bakteerin ID % sama 89,6. ID %:n tulee olla vähintään 80 %, jotta näytteestä voidaan luotettavasti todeta salmonella. Kaikkien näytetyyppien jokaiselle pitoisuustasolle suoritettujen API-testien tulokset on esitetty liitteissä 2–6 varmistustestien sarakkeissa.

7 Yhteenveto

Verifioinnin tavoitteena oli todentaa kvalitatiivisen qPCR-menetelmän soveltuvuus eläinperäisten rehujen ja rehun raaka-aineiden salmonellavalvontaan. Tarkoituksena oli siirtyä perinteisestä viljelymenetelmästä herkempään ja nopeampaan SureTect qPCR -menetelmään. Verifiointikokeita ohjasi EN ISO 16140-3 -standardi ja varmistustestauksissa noudatettiin EN ISO 6579-1 -standardin ohjeita. Soveltuvuus todennettiin käytettävien parametrien avulla, jotka olivat toteamisraja, mittausepävarmuus ja oikeellisuus.

Verifiointikokeissa määritetyt toteamisrajat vaihtelivat $\leq 1-3,25$ pmy riippuen näytetyypistä. Toteamisraja kertoo menetelmän herkkyydestä havaita pienikin pitoisuus salmonellaa näytteestä. Jopa alle 10 pmy salmonellabakteeria voi aiheuttaa taudin riippuen serotyypistä ja ruuan tyypistä, erityisesti rasvaisissa ruuissa salmonella voi aiheuttaa taudin pienemmissäkin pitoisuuksissa [7]. Verifiointikokeissa näytteisiin ympähtiin laskennallisesti pienimmillään alle 1 pmy salmonellaa, joka saatiin qPCR-menetelmän avulla osoitettua. Lohiöljy oli haastavin näytetyyppi sen rasvapitoisuutensa vuoksi, mikä näkyy myös näytteelle saadussa toteamisrajassa 3,25 pmy. Tulos oli korkeampi kuin muiden näytetyyppien, mutta alitti silti hyväksyttävän raja-arvon (4 pmy).

Hyväksyttävyyksrajat toteamisrajoille vaihtelivat 4–5,2 pmy näytetyypin mukaan. Kaikki näytetyypit alittivat hyväksyttävyyksrajat ja menetelmän toteamisrajaksi

saatiin alle 2 pmy, joka on todella pieni pitoisuus, jonka menetelmä pystyy havaitsemaan näytteestä. Saavutettu tulos kuvaa hyvin menetelmän herkkyyttä todentaa pienikin pitoisuus salmonellaa näytteestä, joten menetelmä soveltuu käytettäväksi salmonellanvalvonta tutkimuksiin eläinperäisistä rehuista.

Vaikka viljelymenetelmä on lähes yhtä herkkä todentamaan salmonellaa, qPCR-menetelmällä tulokset saadaan nopeammin. Alustavat qPCR-tulokset saadaan vuorokaudessa näytteen tutkimuksen aloittamisesta.

Viljelymenetelmällä alustavat tulokset saatiin kolmessa vuorokaudessa. Positiivisten näytteiden lopulliset tulokset saadaan kolmessa päivässä toisin kuin viljelymenetelmällä positiivinen tulos saatiin varmistettua viiden päivän jälkeen. Nopeammalla tulosten toimitusajalla voidaan ehkäistä monen eläimen sairastuminen ja osaltaan turvata elintarviketurvallisuutta sekä saattaa laboratorio kilpailukykyiseksi eläinperäisten rehujen salmonellavalvonnan osalta.

Tulosten toimitusajan lyhentyessä ja välivaiheiden vähetessä virhelähteiden määrä lisääntyi. SureTect qPCR -menetelmässä on enemmän mittausepävarmuutta aiheuttavia tekijöitä verrattuna NMKL 71:1999 -menetelmään, mikä lisää aseptisen ja tarkan työskentelyn merkitystä. Mittausepävarmuutta menetelmässä aiheuttaa myös ulkoiset tekijät, kuten kaupalliset reagenssit.

qPCR-menetelmän varmistustestaukset perustuvat viljelyyn. Näyte vastataan negatiivisena salmonellasta, jos qPCR:llä positiiviseksi todennettua näytettä ei saada kasvamaan maljalla. Tämä johtaa ajatukseen uuden menetelmän oikeasta hyödystä, kun edelleen luotetaan enemmän viljelyyn. Toisaalta negatiivinen tulos PCR:llä on luotettavampi kuin negatiivinen tulos pelkällä viljelyllä, koska salmonella voi viljelyssä peittyä muun taustakasvun alle. Lisäksi alustava tieto positiivisesta qPCR-tuloksesta voi auttaa kaivamaan salmonellan esiin näytteestä. Vanhassa viljelyyn perustuvassa menetelmässä oli suurempi riski, että näytteen muu taustakasvu peitti salmonellan kasvun eikä sitä saatu esiin, koska etukäteen ei tiedetty, sisältääkö näyte salmonellaa.

Lainsäädännön jatkuva kehitys vaatii laboratoriota ja muitakin alan toimijoita muuttamaan toimintatapojaan. NMKL 71:1999 -menetelmä ei kelpaa enää vuoden 2023 jälkeen zoonoosiasetuksen mukaisiin tutkimuksiin, koska menetelmää ei ole validoitu EN ISO 16140-2 -standardin uusimman version mukaan. EN ISO 16140-2 -standardin uusimman version tavoitteena oli parantaa standardin käytettävyyttä, laajentaa soveltuvuutta sekä auttaa laboratorioita suorittamaan menetelmien verifiointi luotettavammin ja vertailukelpoisemmin. Uudistus oli tärkeä elintarviketurvallisuudelle sekä eläinten terveydelle, koska mikrobiologisten analyysimenetelmien merkitys alalla on suuri.

Menetelmän verifiointi onnistui ja menetelmällä osoitettiin luotettavasti, että se kykenee todentamaan salmonellan eläinperäisistä rehuista riittävällä herkkyydellä. Metropolilab Oy voi hakea EN ISO/IEC 17025 -akkreditoinnin muutos päätöstä. Menetelmä voidaan ottaa laboratorion käyttöön vasta, kun akkreditointipalveluita tarjoava FINAS on myöntänyt menetelmän akkreditoiduksi.

Lähteet

- 1 Kotimainen vesi-, elintarvike- ja ympäristölaboratorio. Verkkoaineisto. Metropolilab. <<https://www.metropolilab.fi/fi/yritys>>. Luettu 15.5.2023.
- 2 Salmonella. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/salmonella/>>. Päivitetty 18.7.2022. Luettu 19.5.2023.
- 3 Aarnio, Maria. 2017. Eläköön salmonella vapaa Suomi. Verkkoaineisto. Luonnonvarakeskus. <<https://projects.luke.fi/ruokafakta/yleista-tietoa/salmonellatilanne/elakoon-salmonellavapaa-suomi/>>. 17.5.2017. Luettu 7.6.2023.
- 4 Andino, A. & Hanning, I. 2015. Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. National Library of Medicine. Vol. 520179, s. 1-16.
- 5 Gelderblom, Hans R; Männel, Andrea & Reissbrodt, Rolf. 2014. Salmonella enterica. Robert Koch Institut. <https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Salmonellose_en.html>. Luettu 22.5.2023.
- 6 Bonifield, Heather R. & Hughes, Kelly T. 2003. Flagellar Phase Variation in *Salmonella enterica* Is Mediated by a Posttranscription Control Mechanism. National Library of Medicine. Vol. 185.
- 7 Bedale, Wendy & Milkowski, Andrew L. 2015. Salmonella Fact Sheet. Verkkoaineisto. Meatscience.org. <https://meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/fact-sheets/salmonella-fact-sheet-2015.pdf?sfvrsn=87518eb3_0>. Luettu 22.5.2023.
- 8 Birhanu, Biruk Tesfaye; Park, Na-Hye; Lee, Seung-Jin; Hossain, Md Akil & Park, Seung-Chun. 2018. Inhibition of *Salmonella* Typhimurium adhesion, invasion, and intracellular survivor via treatment with methyl gallate alone and in combination with marbofloxacin. Veterinary Research. Vol 101.
- 9 Kenneth J. Ryan & C. Georgy Ray. 2004. *Sherris Medical Microbiology. An introduction to Infectious Diseases*. 4th ed. New York: McGraw-Hill.
- 10 Wong, Bebe. 2017. Gramvärjäys tutuksi- Oppimateriaali uusille bioanalyttikko-opiskelijoille. Opinnäytetyö. Turun Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.

- 11 Antibioottiresistenssin seuranta. Verkkoaineisto. Ruokavirasto <<https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/elainten-laakitseminen/antibioottiresistenssin-seuranta/>> Päivitetty 28.2.2023. Luettu 1.6.2023.
- 12 Harrel, Jaikin E; Hanh, Mark M; D'Souza, Shaina J; Vasicek, Erin M; Sandala, Jenna L; Gunn, John S & McLachlan, James B. Salmonella Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. National Library of Medicine. Vol. 624622.
- 13 Prinzi, Andrea & Rohde, Rodney E. 2023. The Role of Bacterial Biofilms in Antimicrobial Resistance. Verkkoaineisto. American society for microbiology. <<https://asm.org/Articles/2023/March/The-Role-of-Bacterial-Biofilms-in-Antimicrobial-Re>> Päivitetty 6.3.2023. Luettu 5.6.2023.
- 14 Salmonella Biofilm Formation Process. 2023. Verkkoaineisto. Scholarly Community Encyclopedia. <<https://encyclopedia.pub/entry/40071>> Luettu 5.6 2023.
- 15 Usein kysyttyä rehuista. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/rehut/rehut-ja-rehualan-toimijat/usein-kysyttya-rehuista/>>. Päivitetty 21.4.2022. Luettu 2.7.2023.
- 16 Eläinten salmonellatartunnat. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/usealle-elainlajille-yhteiset-taudit/salmonellatartunnat/>> Päivitetty 15.12.2022. Luettu 6.6.2023.
- 17 Pernu, Noora. 2015. Eläinperäisten zoonoosien esiintyminen koirissa. Licensiaatin tutkielma. Helsingin Yliopisto, Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Helda-tietokanta.
- 18 Eläinten ja ihmisten välillä tarttuvat taudit, Suomen zoonosistrategia 2013–2017. 2013. Verkkoaineisto. Suomen maa- ja metsätalousministeriö. <<https://mmm.fi/documents/1410837/1723887/MMM-TRM-2013-1/b3419885-4c38-4275-8a43-a6d0ce7662a8/MMM-TRM-2013-1.pdf>> Luettu 7.6.2023.
- 19 Rehujen salmonellavalvonta. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/rehut/rehut-ja-rehualan-toimijat/valvonta/rehujen-salmonellavalvonta/>>. Päivitetty 16.3.2021. Luettu 7.6.2023.
- 20 Rehulaki. 2020. 1263/30.12.2020.
- 21 Zoonosiasetus. 2021. 316/2021.

- 22 Toimenpiteet NMKL-menetelmistä luopumiseksi zoonosiasetuksen mukaisessa salmonellavalvonnassa. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/ruokaviraston-hyvaksymat-laboratoriot/ajankohtaista-laboratorioiden-hyvaksynnasta/salmonellavalvonnassa-luovuttava-nmkl-menetelmista/>>. Päivitetty 20.1.2023. Luettu 9.6.2023.
- 23 Eläintautilaki. 2021. 76/2021.
- 24 Laadullinen tutkimus. Verkkoaineisto. Koppa. <<https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/metelmapolkuja/metelmapolku/tutkimusstrategiat/laadullinen-tutkimus>>. Päivitetty 28.10.2021. Luettu 19.6.2023.
- 25 Food Safety Testing: Understanding Microbiological Method Validation, Verification, and Fitness for Purpose. Verkkoaineisto. Eurofins. <<https://www.eurofinsus.com/food-testing/resources/food-safety-testing-understanding-microbiological-method-validation-verification-and-fitness-for-purpose/>> Luettu 9.6.2023.
- 26 Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkoaineisto. VTT research. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. 10/2016. Luettu 25.6.2023.
- 27 Hallanvuo, Salla. 2020. Elintarvikemikrobiologian menetelmien validointi ja verifiointi uudistuvien ISO-standardien mukaisesti. <https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/ruokaviraston-hyvaksymat-laboratoriot/laba-2020-materiaalit/20201007_hallanvuo_validointi-ja-verifiointi-elintarvikemikrobiologiassa.pdf>. 7.10.2020. Luettu 30.6.2023.
- 28 SFS-EN ISO/IEC 17025:2017. Testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. 2017. Yleiset vaatimukset. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 29 SFS-EN ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain. Method validation. 2021. Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 30 Ehder, Tapio. 2005. Kemian metrologian opas. Verkkoaineisto. VTT research. <<https://publications.vtt.fi/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>>. 6/2005. Luettu 28.6.2023.

- 31 Mittausepävarmuus. Verkkoaineisto. Finas.
<<https://www.finas.fi/akkreditointi/jaljittavyys/Sivut/Mittausepavarmuus.aspx>>. Päivitetty 10.6.2023. Luettu 28.6.2023.
- 32 Thermo Scientific Solaris qPCR Gene Expression Assay. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific inc.
<<http://www.ulab360.com/files/prod/manuals/201304/18/450530001.pdf>>. Luettu 28.6.2023.
- 33 Kuronen, Henry. 2019. EURL-*Salmonella* workshop XXIV, 28.-29.5.2019, Amersfoort, Alankomaat. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/vertailulaborat oriotoiminta/eurl-kuulumisia/4-matkakertomus-eurl-salmonella-2019-henry.pdf>>. 5.6.2019. Luettu 28.6.2023.
- 34 Extension of the SureTect™ *Salmonella* Species PCR Assay (MicroVal 2022LR111) for the Detection of *Salmonella* species in Broad Range of Foods. Version 1, March 2, 2023. Yrityksen sisäinen dokumentti. Thermo Fisher Scientific Inc.
- 35 SureTect *Salmonella* Species PCR Assay. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific.
<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PT0100A>>. Luettu 28.6.2023
- 36 Faulds, Nikki; Evans, Katharine; Williams, Jessica; Crabtree, David; Hughes, Annette; Stephenson, Patrick; Leak, Dean; Sohler, Daniele; Palomäki, Jukka-Pekka; Bastin, Benjamin; Benzinger, M. Joseph Jr & Agin, James. Validation of the Thermo Scientific SureTect™ *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* PCR kit for the Detection of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in Raw Poultry and Ready-to-Cook Poultry Products: AOAC Performance Tested MethodSM 012101. Journal of AOAC INTERNATIONAL. Vol. 105, s. 506–520.
- 37 Cloke, Jonathan; Clark, Dorn Jr; Radcliff, Roy; Leon-Velarde, Carlos; Larson, Nathan; Dave, Keron; Evans, Katharine; Crabtree, David; Hughes, Annette; Simpson, Helen; Holopainen, Jani; Wickstrand, Nina & Kauppinen, Mikko. Evaluation of the Thermo Scientific™ SureTect™ *Salmonella* Species Assay. Journal of AOAC INTERNATIONAL. Vol. 97, s. 539–560.
- 38 Vuorisalmi, Venla. 2022. *Cryptosporidium* -alkueläimen esiintyminen rantalaitumilla. Helsingin yliopisto, Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Helda-tietokanta.

- 39 SFS-EN ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain. 2017. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 40 Aryal, Sagar. 2022. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar- Principle, Uses, Composition, Preparation and Colony Characteristics. Verkkoaineisto. Microbiology info. <<https://microbiologyinfo.com/xylose-lysine-deoxycholate-xld-agar-principle-uses-composition-preparation-and-colony-characteristics/>>. Päivitetty 10.10.2022. Luettu 2.7.2023.
- 41 Aryal, Sagar. 2022. XLD Agar-Composition, Principle, Preparation, Results, Uses. Verkkoaineisto. Microbe notes. <<https://microbenotes.com/xylose-lysine-deoxycholate-xld-agar/>>. Päivitetty 7.1.2022. Luettu 5.7.2023.
- 42 Rambach Agar. 2011. Verkkoaineisto. Merck Millipore. <https://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=0CAIQw7AJahcKEwilwdfZaAAxUAAAAAHQAAAAAQAg&url=https%3A%2F%2Fwww.merckmillipore.com%2FINTERSHOP%2Fweb%2FWFS%2FMerck-RU-Site%2Fru_RU%2F-%2FUSD%2FShowDocument-File%3FProductSKU%3DMDA_CHEM-107500%26DocumentId%3D18476.ProNet%26DocumentType%3DTI%26Language%3DEN%26Country%3DNF%26Origin%3DPDP&psig=AOvVaw1zR5fDfo_oLliVg8SZvBai&ust=1689696799564577&opi=89978449>. Luettu 15.7.2023.
- 43 Microbial Serology. Verkkoaineisto. Maryland Department of Health, Laboratories Administration. <<https://health.maryland.gov/laboratories/Pages/-Microbial-Serology.aspx>>. Luettu 17.7.2023.
- 44 Boer, E.de. 2007. Detection and enumeration of pathogens in meat, poultry, and egg product. Verkkoaineisto. Science Direct. <<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/agglutination-test>>. Luettu 17.7.2023.
- 45 Agglutinaatioreaktio-määritelmä, tyypit, mekanismi, sovellukset. Verkkoaineisto. Microbiology notes. <<https://microbiologynote.com/fi/agglutinaatioreaktio/>>. Päivitetty 30.6.2023. Luettu 17.7.2023
- 46 Xuedong, Zhou & Yuing, Li. 2015. Atlas of Oral Microbiology. E-kirja. Elsevier Inc.
- 47 Aryal, Sagar. 2022. API (Analytical Profile Index) 20E Test-Procedure, Uses and interpretation. Verkkoaineisto. Microbiology info.

<<https://microbiologyinfo.com/api-20e-test/>>. Päivitetty 10.10.2022. Luettu 18.7.2023.

EN ISO 16140-3 -taulukko eLOD₅₀-arvon määrittämiseen

Table 6 — Determination of eLOD₅₀ based on the number of positive results per level of contamination using protocol 1

High inoculation level targeted $9 \times \text{LOD}_{50}$ / test portion	Intermediate inoculation level targeted $3 \times \text{LOD}_{50}$ / test portion	Low inoculation level targeted $1 \times \text{LOD}_{50}$ / test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	$< 1,0 \times \text{LIL}^a$
1/1	4/4	3/4	0/1	$= 0,5 \times \text{LIL}$
1/1	4/4	2/4	0/1	$= 0,7 \times \text{LIL}$
1/1	4/4	1/4	0/1	$= 1,0 \times \text{LIL}$
1/1	4/4	0/4	0/1	$= 1,5 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	4/4	0/1	$= 0,7 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	3/4	0/1	$= 1,0 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	2/4	0/1	$= 1,3 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	1/4	0/1	$= 1,7 \times \text{LIL}$
1/1	3/4	0/4	0/1	$= 2,3 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	4/4	0/1	$= 1,1 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	3/4	0/1	$= 1,5 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	2/4	0/1	$= 1,9 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	1/4	0/1	$= 2,6 \times \text{LIL}$
1/1	2/4	0/4	0/1	$= 3,7 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result ^b
1/1	1/4	3/4	0/1	$= 2,1 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	2/4	0/1	$= 2,8 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	1/4	0/1	$= 4,0 \times \text{LIL}$
1/1	1/4	0/4	0/1	$= 6,3 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result ^b
1/1	0/4	3/4	0/1	$= 3,0 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	2/4	0/1	$= 4,3 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	1/4	0/1	$= 6,7 \times \text{LIL}$
1/1	0/4	0/4	0/1	$= 14,0 \times \text{LIL}$

^a LIL = low inoculation level.
^b Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

Kuva 1. Standardin antamat vertailuarvot positiivisten näytteiden mukaan eLOD₅₀-arvon määrittämiseen.

Koiran kuivanappuloiden tulokset kootusti

Taulukko 1. Koiran kuivanappuloiden kaikki tulokset.

PCR-ajo				Varmistustestit		Lopullinen tulos
Kuivanappula	Viljely (pmy)	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Agglutinaatio	API	(+/-)
0 µl	-	-	-			-
10 µl/1	1	-	-			-
10 µl/2	1	+	17,01	+	+	+
10 µl/3	1	-	-			-
10 µl/4	1	+	17,26			+
20 µl/1	4,5	-	-			-
20 µl/2	4,5	+	18,9	+	+	+
20 µl/3	4,5	+	16,26			+
20 µl/4	4,5	+	13,48			+
100 µl	13	+	24,42	+	+	+
				ID %	<i>Salmonella spp.</i>	89,6

Koiran märkäruuan tulokset kootusti

Taulukko 5. Koiran märkäruuan kaikki tulokset.

PCR-ajo				Varmistustestit		Lopullinen tulos
Märkäruoka	Viljely (pmy)	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Agglutinaatio	API	(+/-)
0 µl	-	-	-			-
100 µl/1	≤1	+	17,94	+	+	+
100 µl/2	≤1	+	16,79			+
100 µl/3	≤1	-	-			-
100 µl/4	≤1	+	37,97			- *
20 µl/1	5,5	+	18,41	+	+	+
20 µl/2	5,5	+	18,37			+
20 µl/3	5,5	+	17,56			+
20 µl/4	5,5	+	18,71			+
60 µl	7,5	+	17,98	+	+	+
				ID %	<i>Salmonella spp.</i>	89,6

*Ajon tulos oli myös kylmäsäilytyksen jälkeen (kts. liite 6 taulukko 8) positiivinen, mutta korkeilla cq-arvoilla, eikä salmonella kasvanut maljalla, joten tulos vastataan negatiivisena.

Vasikan maitojauheen tulokset kootusti

Taulukko 3. Vasikan maitojauheen kaikki tulokset.

PCR-ajo				Varmistustestit		Lopullinen tulos
Maitojauhe	Viljely (pmy)	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Agglutinaatio	API	(+/-)
0 µl	-	-	-			-
100 µl/1	≤1	+	14,36	+	+	+
100 µl/2	≤1	+	18,79			+
100 µl/3	≤1	-	-			-
100 µl/4	≤1	+	13,87			+
20 µl/1	5,5	+	15,01	+	+	+
20 µl/2	5,5	+	16,99			+
20 µl/3	5,5	+	16,70			+
20 µl/4	5,5	+	13,61			+
60 µl	7,5	+	16,59	+	+	+
				ID %	<i>Salmonella spp.</i>	89,6

Koiran lohipuruluiden tulokset kootusti

Taulukko 7. Koiran lohipuruluiden kaikki tulokset.

PCR-ajo				Varmistustestit		Lopullinen tulos
Puruluut	Viljely (pmy)	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Agglutinaatio	API	(+/-)
0 µl	-	-	-			-
10 µl/1	1,5	+	17,94	+	+	+
10 µl/2	1,5	-	-			-
10 µl/3	1,5	-	-			-
10 µl/4	1,5	+	19,67			+
20 µl/1	3	-	-			-
20 µl/2	3	+	18,83	+	+	+
20 µl/3	3	+	19,65			+
20 µl/4	3	+	19,08			+
50 µl	7,5	+	18,54	+	+	+
				ID %	<i>Salmonella spp.</i>	89,6

Lohiöljyn tulokset kootusti

Taulukko 9. Koirille ja kissoille tarkoitetun lohiöljyn kaikki tulokset.

PCR-ajo				Varmistustestit		Lopullinen tulos
Lohiöljy	Viljely (pmy)	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Agglutinaatio	API	(+/-)
0 µl	-	-	-			-
10 µl/1	2,5	+	20,85	+	+	+
10 µl/2	2,5	+	21,80			+
10 µl/3	2,5	-	-			-
10 µl/4	2,5	-	-			-
30 µl/1	4,5	+	19,40	+	+	+
30 µl/2	4,5	+	19,78			+
30 µl/3	4,5	-	-			-
30 µl/4	4,5	+	21,37			+
100 µl	11	+	21,12	+	+	+
				ID %	<i>Salmonella</i> spp.	89,6

Kylmäsäilytyksen tulokset

Näytteitä säilytettiin viisi vuorokautta +4 °C:ssa, jonka jälkeen alimmat pitoisuudet ajettiin uudelleen ja viljeltiin XLD ja Rambach maljoille. Tulos ei saanut poiketa kylmäsäilytyksen aikana.

Taulukko 11. Koiran kuivanappuloiden tulokset viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen jälkeen.

PCR-ajo			Varmistustestit	Lopullinen tulos
Kuivanappula	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Viljely (+/-)	Yhtenevä/ ei yhtenevä
0 µl	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/1	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/2	+	17,95	+	Yhtenevä
10 µl/3	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/4	+	17,92	+	Yhtenevä

Taulukko 12. Vasikan maitojauheen tulokset viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen jälkeen.

PCR-ajo			Varmistustestit	Lopullinen tulos
Maitojauhe	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Viljely (+/-)	Yhtenevä/ ei yhtenevä
0 µl	-	-	-	Yhtenevä
100 µl/1	+	19,73	+	Yhtenevä
100 µl/2	+	19,38	+	Yhtenevä
100 µl/3	-		-	Yhtenevä
100 µl/4	+	18,27	+	Yhtenevä

Taulukko 13. Koiran märkäruuan tulokset viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen jälkeen.

PCR-ajo			Varmistustestit	Lopullinen tulos
Märkäruoka	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Viljely (+/-)	Yhtenevä/ ei yhtenevä
0 µl	-	-	-	Yhtenevä
100 µl/1	+	19,29	+	Yhtenevä
100 µl/2	+	19,38	+	Yhtenevä
100 µl/3	-	-	-	Yhtenevä
100 µl/4	+	39,49	-	* Yhtenevä

*Lopputulokset negatiiviset, koska salmonellaa ei saatu kasvamään maljalla. Tämä on huomioitu myös liitteen 3 märkäruuan tulokset taulukossa 4.

Taulukko 14. Koiran lohipuruluiden tulokset viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen jälkeen.

PCR-ajo			Varmistustestit	Lopullinen tulos
Lohipuruluut	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Viljely (+/-)	Yhtenevä/ ei yhtenevä
0 µl	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/1	+	20,15	+	Yhtenevä
10 µl/2	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/3	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/4	+	19,38	+	Yhtenevä

Taulukko 15. Lohiöljyn tulokset viiden vuorokauden kylmäsäilytyksen jälkeen.

PCR-ajo			Varmistustestit	Lopullinen tulos
Lohiöljy	Ajo (+/-)	Cq-arvot	Viljely (+/-)	Yhtenevä/ ei yhtenevä
0 µl	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/1	+	20,39	+	Yhtenevä
10 µl/2	+	20,80	+	Yhtenevä
10 µl/3	-	-	-	Yhtenevä
10 µl/4	-	-	-	Yhtenevä