



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Julia Teleni

Salmonellan toteamis- menetelmän verifiointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

25.5.2021

Tekijä Otsikko	Julia Teleni Salmonellan toteamismenetelmän verifiointi
Sivumäärä Aika	30 sivua + 7 liitettä 25.5.2021
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	mikrobiologi Sofia Seittenranta-Vekkele lehtori Jarmo Palm
<p>Salmonella on gram-negatiivinen sauvabakteeri, joka voi kasvaa sekä hapellisissa että hapettomissa oloissa. Se on suolistobakteeri, ja sitä esiintyy sekä ihmisissä että eläimissä, joiden ulosteen kautta se leviää ympäristöön. Salmonellat ovat patogeenisiä ja aiheuttavat suolistotulehduksia sekä vakavia kuumetauteja.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Kymen Ympäristölaboratorio Oy:lle. Sen tarkoituksena oli ottaa käyttöön uusi, nopeampi ja automatisoidumpi menetelmä salmonellan toteamiseksi elintarvike- ja rehunäytteistä. Menetelmä on jo valdoidu eikä siihen tehdä muokkauksia, joten käyttöönottoa varten tehtiin verifiointi.</p> <p>Menetelmässä näyte rikastetaan peptonivedessä suplementin kanssa ja analysoidaan miniVIDAS-laitteistolla. Analyysi pohjautuu salmonellan antigeneihin, joiden määrää mitataan entsyymivälitteisellä fluoresenssilla. Positiiviset näytteet siirrostetaan kromogeeniselle ChromID Salmonella -agarille ja tyypillisistä pesäkkeistä tehdään jatkovarmennus API 20E -testillä.</p> <p>Verifiointi suoritettiin tekemällä rinnakkaisia analyysejä viljelyihin perustuvan referenssimenetelmän kanssa. Verifiointina analysoitiin luonnollisia elintarvikenäytteitä sekä keinotekoisesti kontaminoituja näytteitä, joihin käytettiin kahta eri pitoisuustasoa. Testattavia matriiseja oli neljä: broileri, liha, juusto ja rehu. Tuloksia arvioitiin verifiointiparametrien mukaan, jotka olivat oikeellisuus, herkkyys, spesifisyys, toteamisraja ja täsmällisyys. Menetelmä on tulosten perusteella toimiva verifioiduille matriisityypeille.</p>	
Avainsanat	Salmonella, miniVIDAS, VIDAS, verifiointi, ELFA

Author Title	Julia Teleni Verification of a <i>Salmonella</i> Detection Method
Number of Pages Date	30 pages + 7 appendices 25 May 2021
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Sofia Seittenranta-Vekkele, Microbiologist Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>Salmonella is a Gram-negative, rod-shaped bacterium that can grow in both aerobic and anaerobic conditions. It is enteric and can be found in both humans and animals, spreading into the environment through their faeces. Salmonellae are pathogenic and cause gastric infections and severe types of fever.</p> <p>This thesis work was carried out for Kymen Ympäristölaboratorio Oy. Its purpose was to adopt a new, faster and more automated method to detect Salmonella in food products and animal feed. As the method had already been validated and did not require alterations, a verification was performed before its introduction.</p> <p>The method consists of enriching the sample in peptone water along with a supplement, after which it is analysed using the miniVIDAS system. The assay is based on salmonella antigens whose quantity is measured through enzyme linked fluorescence. Positive samples are inoculated onto chromogenic ChromID Salmonella agar and typical colonies are further confirmed with an API 20E test.</p> <p>Verification was performed through parallel analyses with a reference method that was based on bacterial cultures. Testing included analyses of natural food product samples and samples that were artificially contaminated at two different concentration levels. Four matrices were studied: chicken, beef, cheese and animal feed. The results were interpreted using verification parameters which were trueness, sensitivity, specificity, limit of detection and precision. According to the results, the method performs well for matrix types included in the verification.</p>	
Keywords	Salmonella, miniVIDAS, VIDAS, verification, ELFA

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	<i>Salmonella</i> -bakteerit	1
2.1	Ominaisuudet	1
2.2	Esiintyvyys ja valvonta	3
3	Salmonellan osoitusmenetelmät	5
3.1	miniVIDAS	5
3.2	Kromogeeniset elatusaineet	9
3.3	Biokemialliset varmistustestit	9
3.4	Referenssimenetelmä	10
4	Mikrobiologisen menetelmän verifiointi	15
4.1	Verifiointiparametrit	16
4.1.1	Toteamisraja	16
4.1.2	Oikeellisuus	17
4.1.3	Herkkyys	17
4.1.4	Spesifisyys	18
4.1.5	Täsmällisyys	18
5	Työn suoritus	18
5.1	Matriisit ja koeasetelma	18
5.2	Näytteiden käsittely ja rikastus	20
5.3	Näytteiden analysointi ja tulosten tulkinta	21
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	23
6.1	Herkkyyskokeet	23
6.2	Vertailukokeet	25
6.3	Kaikki tulokset	27
7	Päätelmät	28
	Lähteet	29

Liitteet

Liite 1. Peptonivesi ja MSR V-agar

Liite 2. X.L.D.-agar ja Önöz-agar

Liite 3. TSI-, urea- ja brolacin-agarit

Liite 4. BHI-liemi

Liite 5. Muut reagenssit

Liite 6. Herkkyyskokeiden tulokset

Liite 7. Vertailukokeiden tulokset

Lyhenteet

ELFA	Enzyme-linked fluorescence assay, entsyymivälitteinen fluoresenssianalyysi
ISO	International Organization for Standardization, Kansainvälinen standardisointijärjestö
MSRV	Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis, muunneltu puolikiinteä Rappaport-Vassiliadis
NMKL	Nordisk Metodikkommitté för Livsmedel, Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate, ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Kymen Ympäristölaboratorio Oy:n mikrobiologian osastolle. Kymen Ympäristölaboratorio on Kuusankoskella sijaitseva yritys, joka toimii kemian, mikrobiologian sekä kemikaalikierron ja prosessikemian alalla. Se on perustettu vuonna 1998 ja sillä on FINAS-akkreditointi, jonka pätevyysalueeseen kuuluu erilaisia vesi- ja elintarvikkeanalyysijä. Yritys on myös Ruokaviraston hyväksymä salmonellan testauslaboratorio.

Opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa käyttöön uusi salmonellan toteamismenetelmä elintarvike- ja rehunäytteiden testausta varten, pois sulkien raakamaidosta valmistetut juustot. Menetelmä hyödyntäisi laboratorion listeriatesteissä jo käytössä olevaa VIDAS-immunoanalyysointia aiemman useita elatusaineita käyttävän NMKL 187:2007 -menetelmän sijaan. Käyttöönoton tarkoituksena oli nopeuttaa tutkimusten valmistumista sekä niihin kuluva aktiivista työaikaa.

Verifiointi toteutettiin vertailemalla saatuja tuloksia korvattavaan NMKL-menetelmään. Vertailuihin käytettiin rinnakkaisia testejä laboratorioon sattumanvaraisesti saapuvasta 30 elintarvikenäytteestä, minkä lisäksi tehtiin matriisikohtaiset herkkyyskokeet kahdella eri pitoisuusalueella lisäämällä näytteisiin tutkittavaa bakteeria. Näytematriisit valittiin laboratorion tyyppisten näytteiden sekä muista poikkeavan käsittelyn perusteella.

2 *Salmonella*-bakteerit

2.1 Ominaisuudet

Salmonellat ovat liikkuvia ja fakultatiivisesti anaerobisia, gram-negatiivisia sauvabakteereja. Ne kuuluvat heimoon *Enterobacteriaceae* ja muodostavat oman suvun, joka koostuu kahdesta lajista, *Salmonella enterica* ja *Salmonella bongori*, joista *S. enterica* jaetaan kuuteen alalajiin. [1.]

Yleensä salmonellakantoja käsitellään serotyypitasolla, jossa ne luokitellaan bakteerin ulkokalvon O-antigeenin ja flagellan pintarakenteen eli H-antigeenin perusteella. Serotyyppejä tunnetaan yli 2 500, joista yli 99 % kuuluu lajiin *S. enterica*. Serotyypit on myös mahdollista jaotella tarkemmin molekyyli- tai faagityypityksellä. [1; 2, s. 112–113.]

Salmonella kykenee kasvamaan 5–46 °C:n lämpötilassa ja 4,5–9,5 asteen pH:ssa, mutta tarvitsee kosteutta eikä lisääny, jos veden aktiivisuus on alle 0,95 tai suolapitoisuus on vähintään 9,0 %. Optimaalinen kasvulämpötila sille on 35–37 °C. Se kuitenkin selviytyy myös ankarammissa olosuhteissa eikä esim. välttämättä kuole pakastettaessa. Salmonella tuhoutuu yleensä noin 70 °C:ssa, mutta voi tuotteen koostumuksesta ja kosteudesta riippuen vaatia jopa 130 °C:n kuumennuksen. [3, s.13, 67.]

Salmonellat ovat eivät muodosta itiöitä. Ne fermentoivat glukoosia, mutta eivät laktoosia, pelkistävät nitraattia nitriitiksi ja ovat oksidaasinegatiivisia. Salmonellat tuottavat rikkiveityä ja pystyvät käyttämään sitraattia ainoana hiilenlähteenä ja lysiniä typenlähteenä. Kooltaan salmonellabakteerit ovat noin 3–4 mikrometriä pitkiä ja 0,4–0,6 mikrometriä leveitä. [1; 2, s. 112.]

Salmonellat ovat patogeenisiä, ja ne aiheuttavat kahta erityyppistä sairautta, joista toinen on systeeminen kuumetauti ja toinen maha-suolistotulehdus. Salmonellan aiheuttamia tauteja kutsutaan salmonelloosiksi. Kuumetauteja aiheuttavat serotyypit *Salmonella* typhi (lavantauti) ja *Salmonella* paratyphi (pikkulavantauti), joita esiintyy vain ihmisillä. Sairastumisia on ollut Suomessa yksittäistapauksina matkailijoilla. Yleisempi muoto on kuumeena ja ripulina ilmenevä vakava suolistotulehdus eli gastroenteriitti, joka paranee itsestään muutamassa päivässä, mutta aiheuttaa 7–15 %:lle sairastuneista jälkitautina niveltulehduksen. Salmonelloosin sairastumisherkkyys on yleisesti suurin lapsilla ja vanhuksilla. [1; 3, s. 68.]

Kehittyvissä maissa huonon hygienian alueilla salmonelloosi aiheuttaa suuren tautitaukan ja sen molempia muotoja esiintyy invasiivisenä infektiona etenkin pienillä lapsilla. Maailmanlaajuisesti salmonellan aiheuttamia gastroenteriittitapauksia raportoidaan noin 180 miljoonaa vuodessa ja taudista johtuvia kuolemantapauksia lähes 300 000. [1.]

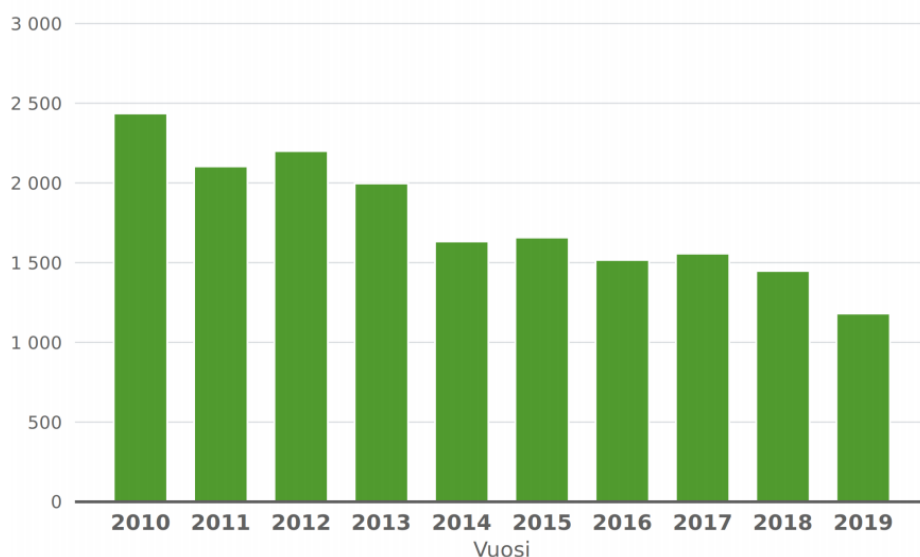
Salmonella elää suolistossa ja voi esiintyä oireettomana nisäkkäissä, linnuissa ja materiaaleissa, joiden ulosteiden kautta se leviää ympäristöön. Ihmistartunnat ovat tavanomaisesti lähtöisin ulosteesta saastuneista elintarvikkeista, jotka voivat ristisaastuttaa muita tuotteita. [1; 3, s. 67.]

Rasvaisia aineksia sisältävät einekset, kuten juusto-, suklaa- tai munatuotteet, aiheuttavat tartunnan useammin, koska niiden koostumus parantaa taudinaiheuttajien selviämistä [2, s. 118]. Salmonellan infektiivinen annos on yleensä 100 000–1000 000 bakteeria, mutta joillain elintarvikkeilla sairastumisia on seurannut huomattavasti pienemmillä annoksilla esim. suklaalla alle 20 MPN/100 g [3, s. 67].

2.2 Esiintyvyys ja valvonta

Suomen salmonellatilanne on ollut hyvä ja salmonellaa esiintyy harvoin ihmisissä, tuotantoeläimissä tai kotimaisessa rehussa. Valtakunnalliseen tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin 2000-luvun alussa 2 000–3 000 salmonelloositapausta vuosittain. Näistä tapauksista alle 20 % oli saatu Suomesta. 2010-luvulla tapausten määrä on laskenut ja vuonna 2019 tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin 1 182 tapausta, kun taas vuosikymmenen alussa määrä oli vuosittain yli 2 000 (kuva 1). [3, s. 68; 4, s. 24.]

Salmonellatapaukset vuosina 2010-2019



Lähde: Tartuntatautirekisteri, THL 2020

Kuva 1. Tartuntatautirekisterin salmonellatapaukset 2010-luvulla [4, s. 24].

Tavallisimmin salmonellatartunta saadaan saastuneen elintarvikkeen kautta. Kotimaisissa elintarvikkeissa salmonellaa on todettu alle 0,5 %:ssa tutkituista näytteissä ja ulkomaalaisissa elintarvikkeissa noin 5 %:ssa, joista eniten lihatuotteissa. Salmonellatartunnan aiheuttaneita elintarvikkeita on listattu alla kuvassa 2. [3, s. 71, 74.]

Välittäjäelintarvikkeita	
Suomessa	Ulkomailla
<ul style="list-style-type: none"> • Idut • Jäävuori- ja muu tuore salaatti • Voileipäkakku • Broileri (ulkomainen) • Varrasporsaat • Pastöroimaton maito • Tuorejuusto • Salamimakkara • Suklaa • Sesammassa • Kananmunat* • Talousvesi 	<ul style="list-style-type: none"> • Kananmunat • Sian-, naudan- ja siipikarjanliha • Maito, maitotuotteet ja jäätelö • Salaatit (majoneesipohjaiset) • Leivonnaiset • Hedelmät ja vihannekset • Idut • Suklaa

*Kotimaiset kananmunat tai munavalmisteet eivät ole vuoden 1995 jälkeen aiheuttaneet sairastumisia.

Kuva 2. Salmonellan välittäjäelintarvikkeita [3 s. 73].

Suomessa on käytössä salmonellan kansallinen valvontaohjelma, jonka tarkoituksena on ollut säilyttää esiintyvyytensä matalana myös EU:hun liittymisen jälkeen. Valvonnan piiriin kuuluvat naudat, siat ja siipikarjaa sekä niistä saatavat liha ja munat. 2000-luvulla Suomessa broilerin ja kalkkunan salmonellaa on löytynyt selvästi alle 1 %:ssa kasvatuseriä. Tutkituissa teurassikanäytteissä osuus on ollut alle 0,2 % ja tutkituissa naudoissa alle 0,4 %. [1; 3 s.74.]

Valvontaohjelman vuoksi muualta EU:sta tuotava liha, elävä siipikarja ja kananmunat testataan lähtömaassaan. Testausta ei vaadita Suomen kaltaista valvontaohjelmaa noudattavilta mailta tai teollisuuden raaka-aineena kuumennettavilta tuotteilta. Elintarvikkeet testataan omavalvontaohjelman ensisaapumispaikoissa eli yrityksissä, jotka ensimmäisenä vastaanottavat tuotteita ja salmonellapositiiviset erät tuhotaan tai palautetaan lähtömaahansa. Viranomaiset tekevät yrityksille myös pistokokeita. [3, s. 74–75.]

EU:n ulkopuoliset elintarvikkeet testataan eläinlääkinnällisillä rajatarkastuksilla, johon kuuluu pistokoeluentoisia salmonellatarkastuksia. Lisäksi kananmunista, jauhelihasta sekä naudan, sian ja siipikarjan lihasta vaaditaan samanlainen salmonellatodistus kuin jäsenmailta. [3, s. 75–76.]

Salmonellan leviämisen estämiseksi Suomessa tehdään myös työntekijöiden terveyden-tilan seurantaa ja tietyillä aloilla vaaditaan selvitys, ettei työntekijä sairasta salmonellaa. Velvoitteen alle kuuluvat mm. vanhusten, lasten, kontaminaatioherkkien elintarvikkeiden ja terveydenhuollon parissa työskentelevät. [3, s. 76.]

3 Salmonellan osoitusmenetelmät

3.1 miniVIDAS

MiniVIDAS on Biomérieux'n valmistama immunoanalyysilaitteisto, jolla voidaan suorittaa useita eri testejä. MiniVIDASin salmonellatestit ovat kvalitatiivisia ja niitä voidaan käyttää salmonellan toteamiseen elintarvikkeista, eläinten rehusta, tuotantoympäristön näytteistä ja alkutuotannon näytteistä. Salmonellan toteaminen laitteistolla perustuu entsyymivälitteiseen fluoresenssianalyysiin eli ELFA:an. [5, s.1.]

MiniVIDAS-laitteessa on kaksi osiota, jossa kummassakin on kuusi paikkaa testiliuskoille ja -kärjille. Laitetta ohjataan sisäisen tietokoneen kautta ja siihen kuuluu tulostin. MiniVIDAS-laitteesta (kuvassa 3 alla) on olemassa myös suurempi versio, jossa on enemmän näytapaikkoja. [6.]

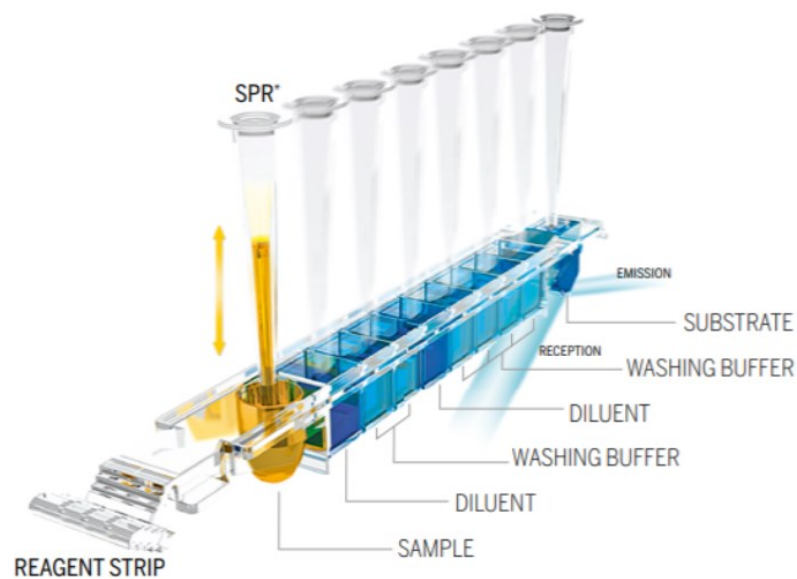


Kuva 3. MiniVIDAS-laitteisto. Näyteliuskat asetetaan kohtaan 3 ja pipetinkärjet kohtaan 2. [6.]

Testauksiin käytetään analyysikohtaisia kittejä. Yksi kitti riittää 60 testiin, ja se sisältää valmiit reagenssiliuskat, pipetinkärjet, standardiliuoksen sekä negatiivisen ja positiivisen kontrollin. Laitteelle kalibroidaan sisäinen standardi aina reagenssierän vaihtuessa ja tämän jälkeen 28 päivän välein standardia ja kontrolleja käyttäen. [5, s. 1, 8.]

VIDAS-laitteiston ELFA-tekniikka toimii samaan tapaan kuin yleiset ELISA-menetelmät, mutta se käyttää tulosten välittämiseen herkempää fluoresoivaa immunoanalyysiä muiden havaitsemistapojen sijaan. Menetelmä vaatii silti näytteiden rikastamisen yön yli, jotta kohdebakteeria olisi todettavissa oleva määrä. [7, s. 140–141.]

Analyysissä tutkittava bakteeri kiinnittyy kiinteään faasiin ja sitä huuhdotaan eri reagensseilla (kuva 4), jotka kiinnittyvät ketjussa bakteeriin sandwich-periaatteella. Ketjun päässä on entsyymi, joka katalysoi mitattavan reaktion eli ELFA:ssa fluoresoivan aineen muodostumisen. Fluoresenssin määrä on suhteellinen entsyymin määrän kanssa ja siten myös tutkittavan salmonellan kanssa. Menetelmä pystyy havaitsemaan sekä motiilit että non-motiilit kannat. [7, s. 141; 5, s.1.]

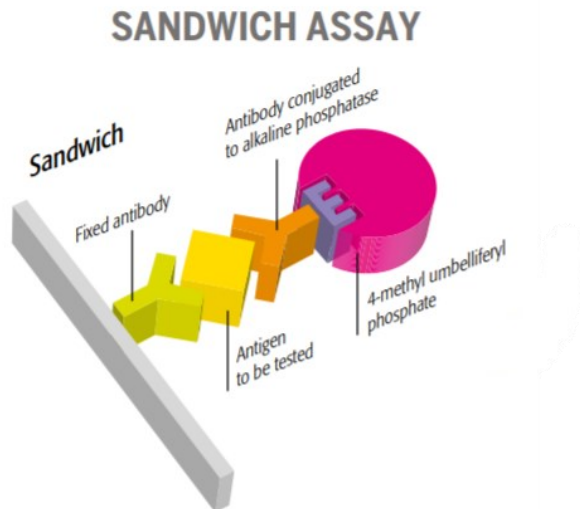


Kuva 4. Reagenssiliuska ja sen kaivojen sisältö. SPR-pipetti siirtyy kaivojen välillä analyysiohjelman ajoituksen mukaisesti, ja fluoresenssi mitataan suoraan liuskan viimeiseltä kaivolta. [8.]

MiniVIDAS-kitissä on salmonellalle spesifeillä vasta-aineproteiineilla päällystetty pipetointimekanismi, jossa pipetin SPR-kärjet toimivat kiinteänä faasina (Solid Phase Receptable). Näyte kiertää SPR:ssä automatisoidussa prosessissa, jolloin salmonellan anti-geeniset reseptorit muodostavat sidoksen SPR:n sisäpinnan anti-salmonella proteiinien kanssa ja muu osuus näytteestä huuhdotaan pois. [5, s. 1.]

Tämän jälkeen kiinnittynyttä salmonellaa huuhdotaan sille spesifien vasta-aineproteiinien ja alkalisen fosfataasin (ALP) muodostamalla konjugaatilla, joka kiinnittyy salmonellan reseptoreihin. Konjugaatin ALP toimii entsyyminä, joka detektiovaiheessa katalysoi fluoresoivan yhdisteen muodostumisen. [5, s. 1.]

Viimeisessä reagenssikaivossa kiinteään faasiin sidotun ALP-konjugaatin kanssa kiertetään 4-metyyliumbelliferyylifosfaatti-substraattia, joka hydrolysoituu ja muodostaa fluoresoivan yhdisteen, 4-metyyliumbelliferonin. Ketju entsyymi-substraatti-reaktioon asti on esitetty alla kuvassa 5. [5, s. 1–2.]



Kuva 5. Sandwich-analyysi. Testattava antigeeni kiinnittyy seinämän vasta-aineeseen ja vasta-aine-entsyymikonjugaattiin. Konjugaatin entsyymi reagoi substraatin kanssa. [8.]

Hydrolyysituotteen fluoresenssi mitataan kahdesti sille ominaisella aallonpituudella 450 nm suoraan viimeisestä, kyvetistä toimivasta kaivosta. Ensimmäinen mittaus on taustalukema, joka otetaan kyvetistä ennen SPR-kärjen tuomista. Toinen mittaus tehdään, kun substraattia on inkuboitu SPR:n sisäpinnalle kiinnittyneellä entsyymillä. [5, s.1–2, 9.]

Kun taustan vaikutus vähennetään näytteen lukemasta, saadaan näytteen oikea fluoresenssiarvo eli RFV (relative fluorescence value). Tietokone vertaa näytteen RFV-lukua tallennettuihin standardiarvoihin kaavan 1 mukaisesti ja ilmoittaa tuloksissa kaikki arvot. [5, s. 1, 9.]

$$Test\ value\ (TV) = \frac{sample\ RFV}{standard\ RFV} \quad 1$$

Tulos on positiivinen, jos TV on 0,25 tai enemmän. Negatiivinen tulos tarkoittaa, että näytteessä ei ollut antigeenejä tai että niiden määrä oli alle määrittämissä. Tulos voi myös olla epäselvä. Tämän syynä voi olla liian suuri taustalukema (mikä viittaa substraatin kontaminoitumiseen), tai puuttuva standardiajo. Menetelmä voi myös antaa ristireaktiosta johtuvan väärän positiivisen tuloksen joillekin *Enterobacteriaceae*-heimon kannoille, mutta nämä reaktiot ovat harvinaisia. [5, s. 9.]

Käytetyt liuskat ja SPR-kärjet hävitetään biovaarallisena jätteenä. Liuskoja hävitettäessä on huomioitava, että substraattikaivo sisältää laimeaa dietanoliamiinia, joka voi vaurioittaa silmiä. [5, s. 2.]

3.2 Kromogeeniset elatusaineet

Positiivinen miniVIDAS-tulos varmistettiin ChromID-hajotusviljelmän kautta alle 72 tuntia vanhasta esirikastusliemestä. ChromID Salmonella on bioMérieux'n valmistama selektiivinen kasvatusmalja, joka on tarkoitettu elintarvikkeiden salmonellatutkimuksiin. Se inhiboi häiritsevää elintarvikemikrobistoa kuten gram-positiivisia kokkibakteereita, hiivoja sekä osaa ei-fermentoivasta Gram-negatiivisesta kasvusta. [9.]

ChromID-malja sisältää kolmea eri kromogeenista ainetta, jotka ovat esteraasin, β -glukosidaasin ja β -galaktosidaasin substraatteja. Salmonellat tuottavat esteraasia, joka reagoi substraattiin ja muodostaa pesäkkeisiin malvanvioletin tai vaaleanpunaisen värin. Muut bakteerit ja hiivat kasvavat vaaleansinisinä (β -glukosidaasia tai β -galaktosidaasia tuottavat) tai värittöminä. Kromogeenisen maljan epäiltävistä pesäkkeistä tehtiin jatkovarmistus API 20E -testillä. [9.]

3.3 Biokemialliset varmistustestit

API 20E on bioMérieux'n valmistama biokemiallisten testien yhdistelmäkitti, jolla voidaan tunnistaa enterobakteereja sekä muita ei-vaativia Gram-negatiivisia bakteereja. Verifioitavassa menetelmässä API-testi oli osa miniVIDAS-tuloksen varmistusta. API 20 sisältää 20 eri standardisoitua pienoiskokoista testiä, minkä lisäksi sen osana tehdään erillinen oksidaasitesti. [10.]

API-testiliuska sisältää kuivattuja reagensseja, jotka nesteytetään uudelleen suolaliuokseen tehdyllä bakteerisuspensiolla. Hapettomat olot vaativia reaktioita varten osa testi-kuopista peitetään steriilillä mineraaliöljyllä ja liuskan olosuhteet pidetään bakteereille kosteina inkubaatiolaatikon pohjan koloihin lisätyn veden avulla. [10.]

Liuskaa inkuboidaan kittiin kuuluvassa laatikossa 18–24 tuntia 37° C:n lämpötilassa tai tarvittaessa 24±2 tuntia lisää, minkä jälkeen bakteerin aineenvaihdunta on aiheuttanut värireaktioita joko suoraan tai reagenssien lisäämisen jälkeen. Reaktiot tulkitaan ohjeen mukaan joko positiiviksi tai negatiiviseksi, joiden arvojen perusteella saadaan numerokoodi nimeltään ”analytical profile index”. Tämän avulla tehdään tunnistus APIweb-ohjelman tietokannasta. [10.]

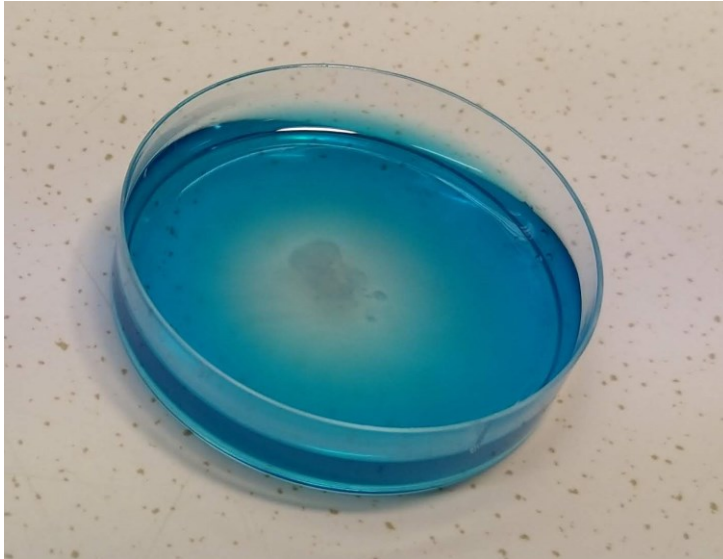
Lopuksi positiiviseksi epäilty, eristetty kanta lähetetään täydellistä serotyypitystä varten referenssilaboratorioon Kuopion Ruokavirastoon ja kanta säilötään pakastimeen.

3.4 Referenssimenetelmä

Käyttöön otettavan menetelmän tuloksia vertailtiin aiemmin käytettyyn sisäiseen ohjeeseen *Salmonella*-bakteerien osoittamiseksi elintarvikkeista MSRv-menetelmällä. Menetelmä perustuu NMKL-metodiin 187:2007 (1. versio).

Menetelmässä näytettä rikastetaan puskuroidussa peptonivedessä 18-24 tuntia 37±1 °C:ssa ja tämän jälkeen MSRv-agarilla (molempien koostumus ja valmistus kuvattu liitteessä 1). Esirikastetta ei sekoiteta, vaan näyte otetaan kohdasta, jossa vapaata nestettä on mahdollisimman paljon. [11.]

Näyte jaetaan kolmeksi pisaraksi huoneenlämpöiselle MSRv-maljalle niin, että kasvustolla on mahdollisimman paljon tilaa levitä, koska alustan toimivuus perustuu salmonellojen kykyyn liikkua siinä muita motiileja bakteereja paremmin [11; 12]. Esimerkki salmonellan kasvusta alla kuvassa 6. Käytetty elatusaine sisältää standardin mukaisesti vain puolikkaan annoksen antibioottia, jotta bakteerien liikkuvuus ei vähentyisi [11; 13].



Kuva 6. Salmonellan kasvua MSRV-agarilla.

Rikastuksen jälkeen tehtiin vyöhykkeen reunasta viljelyt kahdelle selektiiviselle, kiinteälle kasvatusalustalle, jotka olivat XLD ja vaihtoehtoisena alustana Önöz (koostumus ja valmistus liitteessä 2).

XLD on sekä salmonellojen että shigellojen eristämiseen ja esitunnistamiseen käytetty elatusaine, jossa salmonellojen tunnistus perustuu ksyloosin fermentointiin, lyysiinin dekarboksylaatioon ja rikkivedyn muodostamiseen. Tämän lisäksi XLD sisältää selektiivisenä aineena natriumdeoksikolaattia, joka estää koliformisten bakteerien kasvua. [14.]

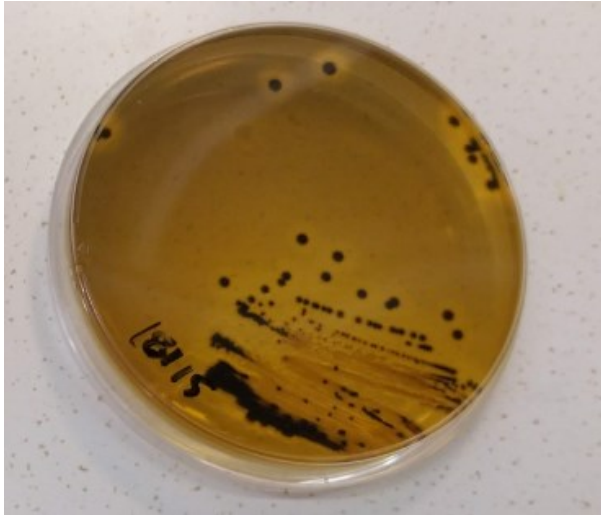
Salmonella käyttää ensin ksyloosin ja dekarboksyloi tämän loputtua lyysiiniä, jolloin loppullinen pH jää emäksiseksi ja fenolipunaindikaattori värjää alustan punaiseksi. Laktoosia hajottavat kannat tuottavat happoa ja kasvavat alustalla keltaisina. Salmonella erotetaan saman emäksisen pH:n aiheuttavasta shigellasta sen kyvystä tuottaa rikkivetyä, joka näkyy pesäkkeissä mustina keskuksina. Esimerkki tyypillisestä positiivisesta kasvusta on esitetty alla kuvassa 7. [11; 14.]



Kuva 7. Salmonellapesäkkeitä XLD-maljalla. Kuvassa rikkivetypositiivinen ja laktoosinegatiivinen kanta.

Önöz on salmonellan eristämiseen ja tunnistamiseen käytetty elatusaine, jonka selektiivisinä aineina toimivat Gram-positiivisten bakteerien kasvua estävät sappihapon suolat, briljanttivihreä ja natriumsitraatti. [15.]

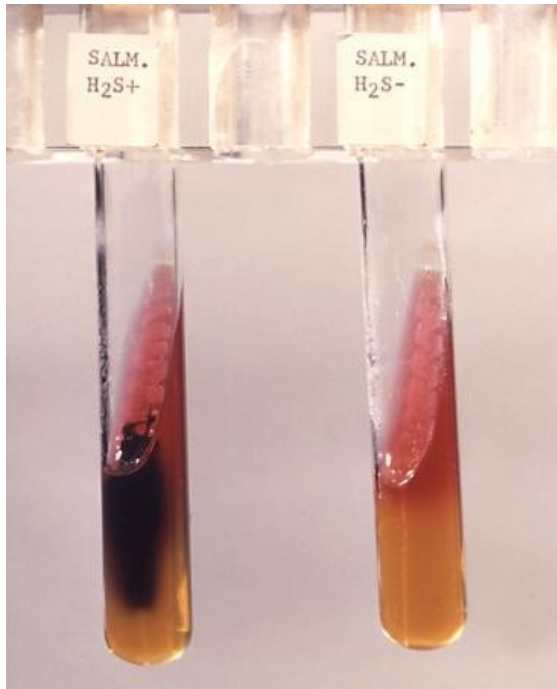
Önöz sisältää laktoosia ja sakkaroosia, joiden fermentoituminen havaitaan neutraalipuna- ja aniliinisini-indikaattoreilla. Salmonellat eivät tyypillisesti hajota kumpaakaan hiilihydraattia, joten ne kasvavat maljalla kellertävinä, kun taas laktoosia fermentoivat pesäkkeet muodostavat ympärilleen tumman alueen. Toisena tunnistuskeinona agar sisältää natriumtiosulfaattia ja rautasitraattia, joista Salmonellat tuottavat rikkivetyä ja siten erottuvan mustan keskuksen pesäkkeisiinsä. Rikkivetynegatiiviset Salmonellat kasvavat maljalla keltaisina. Tyypillinen salmonellapositiivinen malja on esitetty alla kuvassa 8. [11; 15.]



Kuva 8. Salmonellapesäkkeitä Önöz-maljalla. Kuvassa rikkivetypositiivinen ja laktoosinegatiivinen kanta.

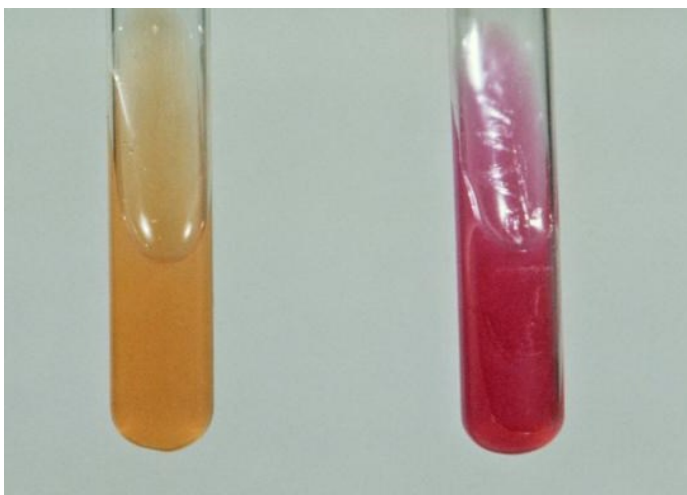
Epäilyttävistä XLD- ja Önöz-pesäkkeistä tehtiin siirrostus TSI- ja ureaputkille (koostumus ja valmistus liitteessä 3). TSI-agar eli kolmoissokerirauta-agar (triple sugar iron agar) on enterobakteerien erottamiseen tarkoitettu elatusaine, jolla testataan mikrobin entsyymitoimintaa glukoosin, laktoosin ja sakkaroosin hajottamisen sekä rikkivedyn tuottamisen osalta. TSI-putken viljely tehdään sekä vinopinnalle että pistämällä agaria, jolloin osa kasvuolosuhteista on hapekasta ja osa verraten hapetonta. [11; 16.]

Salmonella tyypillisesti hajottaa glukoosia, mutta ei laktoosia tai sakkaroosia, joten putken pintaosa jää emäksiseksi ja pohjan pH laskee hajoamistuotteiden vaikutuksesta. Fenolipunaindikaattori värjää putken pohjan keltaiseksi ja pinta jää punaiseksi. Laktoosiposiitivisilla kannoilla putken koko väri on keltainen. Sulfaattia pelkistävät Salmonella-kannat (noin 90 %) muodostavat mustaa rautasulfidia natriumtiosulfaattista ja rautasitraatista. Agarissa voi myös näkyä kaasua, joka on syntynyt glukoosin fermentoinnista. Esi-merkki positiivisesta kasvusta on esitetty alla kuvassa 9. [11; 16.]



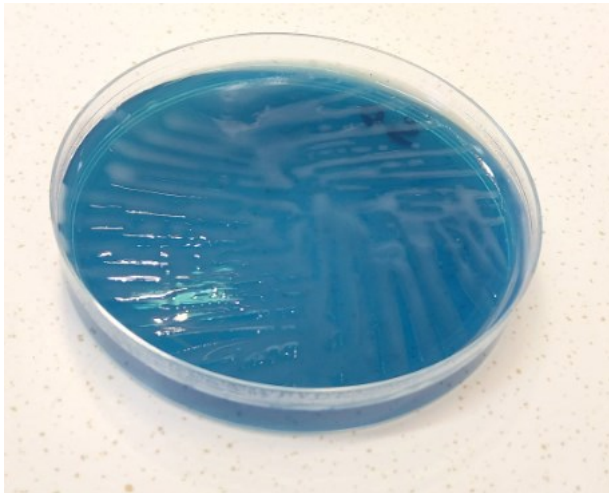
Kuva 9. Rikkivetypositiivinen (vasen) ja -negatiivinen (oikea) salmonellakasvu TSI-agarputkessa [17].

Bakteerin ureaasin tuottokyky todettiin fenolipunaindikaattorin reaktiosta. Urean hajotessa syntyy ammoniakkia, joka muuttaa pH:n emäksisemmäksi ja agarin väri muuttuu kellertävästä voimakkaan vaaleanpunaiseksi. Salmonella ei hajota ureaa, joten värimuutosta ei tapahdu (kuva 10 alla). [18.]



Kuva 10. Ureaasinegatiivinen (vasen) ja ureaasiposiitivinen (oikea) testitulos. Salmonella on ureaasinegatiivinen, eli sen kasvu on vasemman putken mukaista. [19.]

Pesäkkeitä kasvatettiin tarvittaessa brolacin-maljalla (liite 3), joka on monien mikro-organismien kasvua tukeva yleisagar ja hyvä pesäkkeiden ulkomuodon tulkitsemiseen. Maljalla tutkittiin bakteerin kykyä käyttää laktoosia. Laktoosia fermentoivat bakteerit laskevat elatusaineen pH:ta, mikä havaitaan bromotymolisinisen kautta värimuutoksena sinivihreästä keltaiseen. Salmonellat ovat tyypillisesti laktoosinegatiivisia, joten niiden kasvusto on vaaleaa tai sinistä ja agarin väri on sininen (kuva 11). [20.]



Kuva 11. Laktoosinegatiivista salmonellakasvua brolacin-maljalla.

TSI- ja ureatestin ja brolacin-kasvatuksen perusteella varmistusta jatkettiin omnivalentilla antiseerumilla, joka reagoi salmonellan somaattisiin antigeeneihin ryhmissä A-O67. Tämän jälkeen tehtiin vielä tunnistus API20E-kitillä. Todetut *Salmonella*-kannat lähetetään lopuksi Kuopion Ruokavirastoon täydellistä serotyypitystä varten. [11.]

4 Mikrobiologisen menetelmän verifiointi

Käyttöön otettava menetelmä on AFNOR:n eli Ranskan standardointijärjestön validoima EN ISO 16140 -standardin mukaisesti laboratorioden välisessä vertailussa. Validointi oli sisältänyt laajasti eri bakteerikantoja sekä eri elintarvikkeita ja eläinten rehuja. Täten laboratoriossa voitiin tulosten pohjalta tehdä verifiointi, jonka tarkoituksena on osoittaa, että verifioitu menetelmä toimii laboratorion käytössä.

Mikrobiologiassa näyte analysoidaan yleensä häiritsevän materiaalin ja taustan kanssa ja analytti erotetaan vasta kasvualustalla [21, s. 2]. Näiden ominaisuudet lisäävät mikrobiologisen menetelmän epävarmuutta, minkä lisäksi tulokseen vaikuttavat työskentelyerot kuten pesäkkeiden tulkinta. Menetelmissä on usein tekijöitä, joiden vaikutusta on vaikea arvioida. [22, s. 22, 24.]

Analysoitavat mikrobit ovat eläviä organismeja, joten niiden pitoisuus vaihtelee. Niistä ei voida tehdä valmisteita, joiden todellinen pitoisuus tunnettaisiin, vaan oikeaa tulosta arvioidaan keskiarvotuloksen ja referenssimateriaalin hyväksytyjen tulosten lähekkäisyyden kautta. Jotta pesäkkeiden määrä saataisiin laskettavissa olevalle tasolle, joudutaan näytteitä kuitenkin laimentamaan useasti. Tämän seurauksena rinnakkaisanalyysien pesäkemäärissä voi olla suurta vaihtelua. [21, s. 2, 3.]

4.1 Verifiointiparametrit

Verifioinnissa selvitettiin kvalitatiivisen menetelmän parametrejä, jotka ovat oikeellisuus, virhepositiivisuus, virhenegatiivisuus, toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja, spesifisyys ja herkkyys. Näitä tutkittiin yhdistetyssä koejärjestelyssä herkkyyskokeiden kautta, minkä lisäksi tulkittiin soveltuvin osin myös vertailukokeiden tuloksia. [22, s. 14.]

VIDAS-analyysi on kvalitatiivinen, immunologinen kaupallinen testi. Näillä testeillä valmistajien antamat herkkyys- ja spesifisyysluvut ovat yleensä liian hyviä käytännössä saavutettavaksi, joten valmistajan ilmoittamiin arvoja vertailtiin laskennallisten tulosten kanssa, mutta niitä ei asetettu suoranaisiksi tavoitteiksi. [22, s. 14.]

4.1.1 Toteamisraja

Toteamisrajalla tarkoitetaan alhaisinta mikrobipitoisuutta, joka voidaan menetelmällä todeta luotettavasti [22, s. 27]. Mikrobiologisille nestemäisille näytteille määrittämisraja on pintalevityksenä yleensä alle 10 pmy/ml ja kiinteille näytteille alle 100 pmy/g [22, s. 27]. Valmistajan mukaan LOD₅₀ eli taso, jossa menetelmä pystyy toteamaan salmonellan 50 %:ssa tapauksissa, on alle 1,3 pmy 25 grammassa näytettä [23].

Toteamisrajan arviointiin käytettiin siirrostettuja näytteitä, joista pienempien tavoitepitoisuus oli alle 10 pmy/ml ja suurempien tästä kymmenkertainen. Laboratorion elatusaineiden laatuvaatimuksien mukaan salmonellan tulee rikastua menetelmässä käytetyssä peptonivedessä, johon on lisätty 10 pesäkettä.

4.1.2 Oikeellisuus

Oikeellisuudella kuvataan mitattujen arvojen ja vertailuarvojen yhtäläisyyttä hyvin pitkän toistojakson aikana. Verifiointissa oikeellisuutta mitattiin vertaamalla käyttöönotettavaa menetelmää referenssimenetelmään, koska varmennettua vertailumateriaalia ei ollut käytössä. [22, s. 27.]

Menetelmän suhteellista oikeellisuutta kuvattiin virhepositiivisten ja virhenegatiivisten tulosten prosentuaalisilla osuuksilla. Virhepositiivisuus kuvaa menetelmällä saatujen väärin positiivisten tulosten osuutta kaikista menetelmällä positiiviseksi analysoiduista näytteistä. Virhenegatiivisuus kuvaa vastaavasti saatujen väärin negatiivisten osuutta kaikista negatiivisista tuloksista. Laskentamallit on esitetty alla kaavoissa 2 ja 3. [22, s. 38.]

$$\text{virhepositiivisuus} = \frac{VP}{VP+OP} \quad (2)$$

$$\text{virhenegatiivisuus} = \frac{VN}{VN+ON} \quad (3)$$

4.1.3 Herkkyys

Menetelmän herkkyyttä eli sen kykyä havaita näytepitoisuuksien vaihtelut arvioitiin siirrostettujen näytteiden tulosten perusteella. Herkkyys laskettiin jakamalla saatujen ja oletettujen positiivisten tulosten määrä oletettujen positiivisten tulosten määrällä kaavan 4 mukaisesti. Hyvin herkällä menetelmällä virhenegatiiviset tulokset ovat harvinaisia. [22, s. 21, 38.] Validointiraportin mukaan menetelmän herkkyys elintarvikkeille, rehulle ja ympäristönäytteille on 96,4 % [24, s. 20].

$$\text{herkkyys} = \frac{OP}{OP+VN} \quad (4)$$

4.1.4 Spesifisyys

Spesifisyydellä arvioitiin, tuottaako menetelmä vasteen vain tutkittavalle analyylille eli mikrobiologien menetelmän kohdalla löydetäänkö bakteeri näytteen häiritsevistä tekijöistä huolimatta ja löytääkö menetelmä negatiiviset tapaukset näytteistä. Hyvin spesifisellä menetelmällä virhepositiiviset tulokset ovat harvinaisia. [22, s. 30, 38.]

Spesifisyys saatiin laskemalla verifioitavan menetelmän antamien oikeiden negatiivisten tulosten määrä negatiivisten tulosten määrällä (oikeat negatiiviset ja väärät positiiviset). Lasku on esitetty alla kaavassa 5. [22, s. 30, 38.]

$$\text{spesifisyys} = \frac{ON}{ON+VP} \quad (5)$$

4.1.5 Täsmällisyys

Tulosten täsmällisyyttä ilmaisevat sen toistettavuus ja uusittavuus. Toistettavuus tarkoittaa tulosten yhteneväisyyttä, kun samat henkilöt ovat tutkineet samoja näytteitä samalla menetelmällä ja samoissa oloissa lyhyellä aikavälillä. Toistettavuutta tutkittiin herkkyyskokeiden avulla. [22, s. 32.]

Uusittavuus tarkoittaa tulosten yhtäpitävyyttä samalla menetelmällä, mutta muuttamalla jotain muuta oleellista tekijää analyysissä, esim. mittauslaitetta tai suorituspaikkaa, tai tehden mittauksia pitkällä aikaväleillä. Tätä kuvataan tulosten hajonnalla. Laboratoriossa muuttujana käytetään työn suorittajaa ja sitä tutkitaan osallistumalla myöhemmin erillisiin vertailututkimuksiin. [22, s. 32.]

5 Työn suoritus

5.1 Matriisit ja koeasetelma

Verifiointi tehtiin neljälle matriisille näytteistä, joiden salmonellanegatiivisuus oli jo todettu aiemmissa testeissä. Matriiseista kolme oli elintarvikkeita ja yksi rehua. Elintarvikkeina käytettiin juustoa, raakaa naudanlihaa sekä raakaa, nahallista ja luullista broilerinlihaa.

Matriisit valittiin, koska raaka liha (etenkin jauheliha) ja juustot ovat laboratoriolle yleisiä tutkimuselintarvikkeita. Siipikarjan esikäsittely taas poikkesi myös osin muista elintarvikkeista, joten sen menetelmän toimivuus haluttiin erityisesti varmistaa.

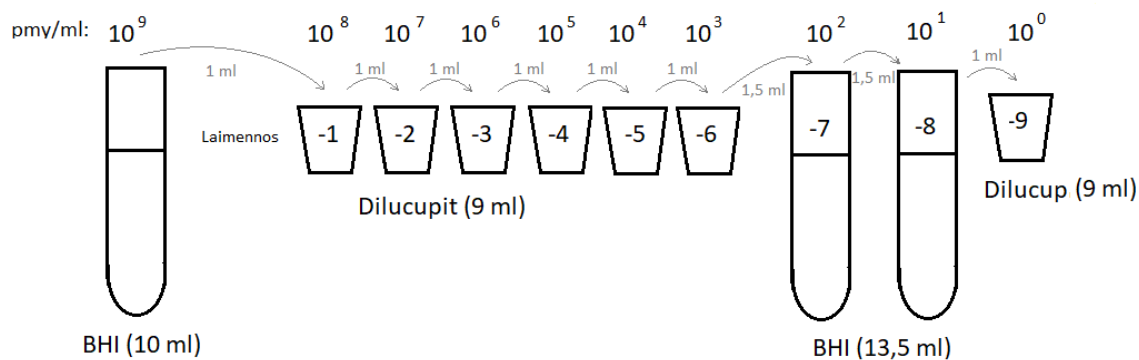
Tämän lisäksi menetelmälle tehtiin 30 sattumanvaraista elintarvikevertailua NMKL-menetelmän kanssa. Vertailut tehtiin laboratorion saamista salmonellanäytteistä.

Herkkyyskokeessa käytettiin kahta eri salmonellalisäyspitoisuutta, joista tehtiin viisi rinnakkaista testiä. Lisäysten määrä oli aina 1000 µl. Lisäksi tehtiin kolme nollanäytettä, poikkeuksena rehumatriisi, jossa käytettiin kahta nollanäytettä rehun riittämiseksi. Näytteet sisältävät luonnostaan mikrobeja, joten taustamikrobeja ei lisätty. Näytejärjestely on kuvattu alla taulukossa 1.

Taulukko 1. Koejärjestelmän näytteet numeroituina. Jokaista matriisia varten analysoitiin 13 näytettä menetelmää kohden.

Näyte	Menetelmä	
	VIDAS	NMKL
nolla 1	01	14
nolla 2	02	15
nolla 3	03	16
pieni pitoisuus 1	04	17
pieni pitoisuus 2	05	18
pieni pitoisuus 3	06	19
pieni pitoisuus 4	07	20
pieni pitoisuus 5	08	21
suuri pitoisuus 1	09	22
suuri pitoisuus 2	10	23
suuri pitoisuus 3	11	24
suuri pitoisuus 4	12	25
suuri pitoisuus 5	13	26

Lisäyksiä varten *Salmonella* Tranaroa -referenssikantaa siirrostettiin 10 ml:n lihalientä. Lientä kasvatettiin 37 °C:ssa 18–24 tuntia, minkä jälkeen sen bakteerimäärä oli arviolta 10⁹ pmy/ml. Tästä tehtiin laimennokset 10⁻⁹ asti. Näytteisiin lisättäviin laimennoksiin käytettiin lihalientä ja muihin 9 ml:n laimennuskuppeja (Dilucup Elegance MRD, LabRobot). Laimennoskaavio on esitetty alla kuvassa 12 ja liemen koostumus liitteessä 4.

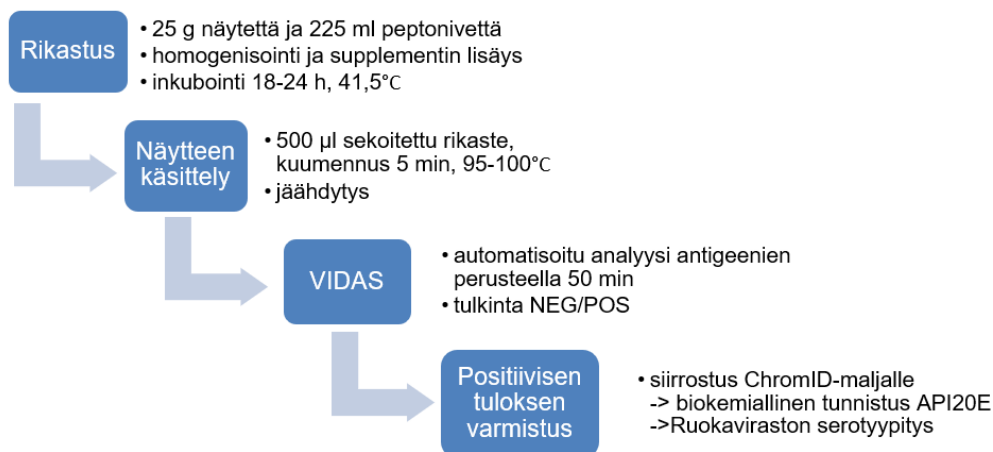


Kuva 12. Salmonellasiirrostuksen laimentaminen ja arvioidut pitoisuudet.

Salmonellabakteerien määrä tarkistettiin viljelemällä laimennokset 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ja 10^{-10} pintalevitystekniikalla XLD-maljoille. Viljelyt 10^{-6} – 10^{-9} tehtiin viljelemällä vastaavaa laimennosta 1000 μ l maljalle ja 10^{-10} viljelemällä 100 μ l laimennoksesta 10^{-9} . Maljoja kuivatettiin tarvittaessa laminaarikaapissa kansi raollaan, minkä jälkeen niitä inkuboitiin 18–24 tuntia 37 asteessa ja pesäkkeet laskettiin. Näytteisiin käytetyt pitoisuudet olivat 10^{-7} ja 10^{-8} . Juustomatriisille tehtiin myös astetta pienempien lisäykset pitoisuuksilla 10^{-8} ja 10^{-9} .

5.2 Näytteiden käsittely ja rikastus

Menetelmässä noudatettiin VIDAS UP *Salmonella* (SPT) -käyttöohjeen standardimenetelmää 25 g:n näytteille eikä vankomysiinilisäyksen sisältävää menetelmää käytetty. Juusto-, liha- ja rehunäytteet käsiteltiin lämpöblokillä (VIDAS Heat and GO, ref. 93554), mutta broilerinäytteiden esikäsittely tehtiin koagulaation takia ohjeen mukaisesti vesihautteen avulla. Menetelmän vaiheet on kuvattu alla kuvassa 13. Tarkemmat tiedot käytetyistä reagensseista on taulukoitu liitteeseen 5.



Kuva 13. VIDAS-menetelmän työvaiheet salmonellaposiitiviselle näytteelle

Edustavaa näytettä punnittiin 25,0–25,4 gramman verkolliseen näytepussiin. Näyte laimennettiin 225 ml:lla huoneenlämpöistä (18–25 °C) puskuroitua peptonivettä ja pussin sisältö homogenisoitiin Stomacher-laitteella keskinopeudella 30 sekunnin ajan. Mahdolliset kovat, terävät näytteet sekoitettiin huolellisesti käsin, jotta sekoituspuski ei hajoaisi. Huoneenlämmössä kovettuviin rasvoihin, kuten kookosöljyyn, käytettiin n. 47 °C:seen lämmitettyä peptonivettä, jotta homogenisointi onnistuisi.

Sekoittamisen jälkeen näytteeseen lisättiin Biomérieux'n Salmonella-supplementitabledetti (SLM SUPPL TABLET, ref. 421202). Tabletin annettiin hajota itsekseen vähintään minuutin, minkä jälkeen pussin sisältö homogenisoitiin käsin puristelemalla. Rikastusliettä kasvatettiin 41,5±1 °C:ssa lämpökaapissa suljettuna 18–24 tuntia.

5.3 Näytteiden analysointi ja tulosten tulkinta

Näytteet analysoitiin joko heti inkuboinnin päätyttyä tai rikastetta voitiin vaihtoehtoisesti säilyttää myöhempää käyttöä jääkaapissa, 2–8 °C:ssa enintään 72 tuntia. Positiivisen VIDAS-tuloksen varmistustesti tehtiin myös jääkaapissa säilytetystä liemestä enintään 72 tuntia inkuboinnin lopettamisesta. Rikastusliemi sekoitettiin huolellisesti käsin puristelemalla ja käsiteltiin kuumentamalla ennen VIDAS-ajoa.

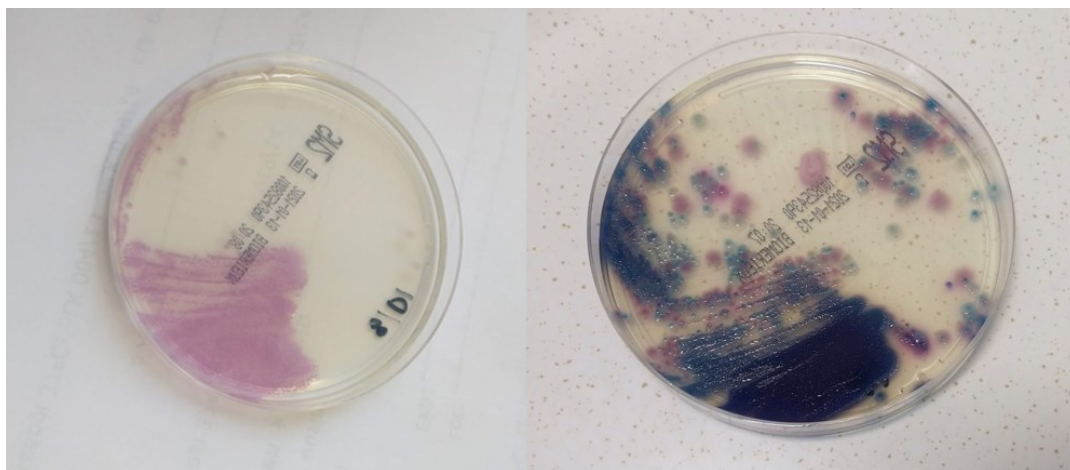
SPR-pipettikärjet ja näyteliuskat otettiin huoneenlämpöön ja annettiin temperoitua vähintään 30 minuuttia. Liuskojen kuumentamiseen käytettävän Heat and Go -lämpöblokin annettiin lämmitä tasaiseen lämpötilaan. Näyte valmisteltiin VIDAS-ajoon pipetoimalla 500 µl rikastuslientä näyteliuskalle, jota lämmitettiin 105 °C lämpöblokillä 5±1 minuuttia. Tämän jälkeen liuskan annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi vähintään 10 minuuttia.

Siipikarjanäytteitä ei kuumennettu lämpöblokillä, vaan niitä kuumennettiin 5±1 minuuttia 95–100 °C:ssa vesihauteessa. Sekoitettua rikastuslientä otettiin 2–3 ml tai suurempi määrä sopivaan putkeen, joka suljettiin ja laitettiin hauteeseen. Liemen annettiin jäähtyä ja se sekoitettiin vorteksoimalla, minkä jälkeen sitä pipetoitiin 500 µl näyteliuskalle. Tämän jälkeen analyysia jatkettiin normaalisti.

Näyteliuska ja SPR-kärjet asetettiin miniVIDAS-laitteeseen (Biomérieux, ref. 410416). Laitteelta valittiin oikea analyysi, näytepaikat nimettiin ja analyysiohjelma aloitettiin käyttöohjeen mukaisesti. MiniVIDAS suoritti testin automaattisesti 48 minuutissa, minkä jälkeen se ilmoitti tuloksen positiivisena, negatiivisena tai epäselvänä (invalid).

Epäselvät testit uusittiin ja positiiville tuloksille tehtiin jatkovarmennus. Negatiivisten näytteiden analyysia ei jatkettu ja lopulliseksi tulokseksi saatiin, ettei salmonellaa todettu 25 g:ssa näytettä. Positiiviset tulokset varmistettiin tekemällä hajotusviljely selektiiviselle agarille. Hyvin sekoitettua esirikastuslientä siirrostettiin 10 µl:n silmukalla ChromID Salmonella -maljoille, joita inkuboitiiin ylösalaisin 18-24 tuntia lämpötilassa 37±1 °C.

Vaaleanpunaisina tai malvanpunaisina kasvavista salmonellapesäkkeistä tehtiin tämän jälkeen API20E-testi. Esimerkki positiivisten maljojen ulkonäöstä alla kuvassa 14. Tarvittaessa ChromID-maljan pesäkkeistä voitiin myös tehdä puhdasviljely esim. XLD- tai brolacin-agarille.



Kuva 14. Salmonellan tyypillistä vaaleanpunaista ja malvanpunaista kasvua ChromID-agarilla. Vasemmassa maljassa kasvu on lähes puhdasta. Oikeassa näkyy muiden bakteerien sinistä kasvua.

Herkkyyskokeiden kohdalla ei tehty API-testiä, vaan tunnistukseksi riitti positiivinen ChromID-viljely. Mikäli näytteen taustamikrobiston kasvu oli erityisen voimakasta, tehtiin osin myös viljely brolacin-maljalle ja serologinen varmistustesti omnivalentilla salmonella-antiseerumilla (Salmonella As Omnivalent, M92537, Mast).

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

6.1 Herkkyyskokeet

Herkkyyskokeisiin käytetyt oikeat bakteerimäärät olivat odotettua pitoisuusluokkaa. Broileri- ja juustomatriiseilla osa maljoista oli levinnyt, joten todellinen määrä arvioitiin muiden laimennosten perusteella. Siirrostuksiin käytettyjen laimennosten tulokset on kuvattu alla taulukossa 2.

Taulukko 2. Salmonellalaimennosten pitoisuudet XLD:ltä laskettuna. Näytteet kontaminoitiin 1000 µl:lla laimennosta.

Matriisi	Laimennos	pmy/ml
rehu	10 ⁻⁷	149
	10 ⁻⁸	15
liha	10 ⁻⁷	114
	10 ⁻⁸	11
broileri	10 ⁻⁷	n. 125
	10 ⁻⁸	5
juusto 1	10 ⁻⁷	levinnyt
	10 ⁻⁸	8
juusto 2	10 ⁻⁸	10
	10 ⁻⁹	1

Broilerimatriisin laimennoksien 10⁻⁶ ja 10⁻⁷ viljelyt olivat kasvaneet reunoilta yhteen, joten pesäkearviot olivat epätarkkoja. Laimennos 10⁻⁸ oli kuitenkin laskettavissa. Juustomatriisin suurempien laimennosten ("juusto 1") 10⁻⁶ ja 10⁻⁷ maljat eivät olleet laskettavissa, mutta pienempi lisäys oli 8 pmy. Suuremman herkkyyskokeen arvioitiin täten olevan noin 80 pmy.

Yli 1 pesäkettä sisältävien siirrostuksien tulokset täsmäsivät referenssimenetelmän kanssa kaikilla matriiseilla. Vain juustomatriisille tehdyt n. 1 pmy/25 g sisältävät näytteet antoivat VIDAS-menetelmällä poikkeavia virhenegatiivisia tuloksia. Herkkyyskokeiden tulokset on esitetty yhdessä alla taulukossa 3 ja yksittäin liitteessä 6.

Taulukko 3. Herkkyyskokeiden tulokset kaikille matriiseille.

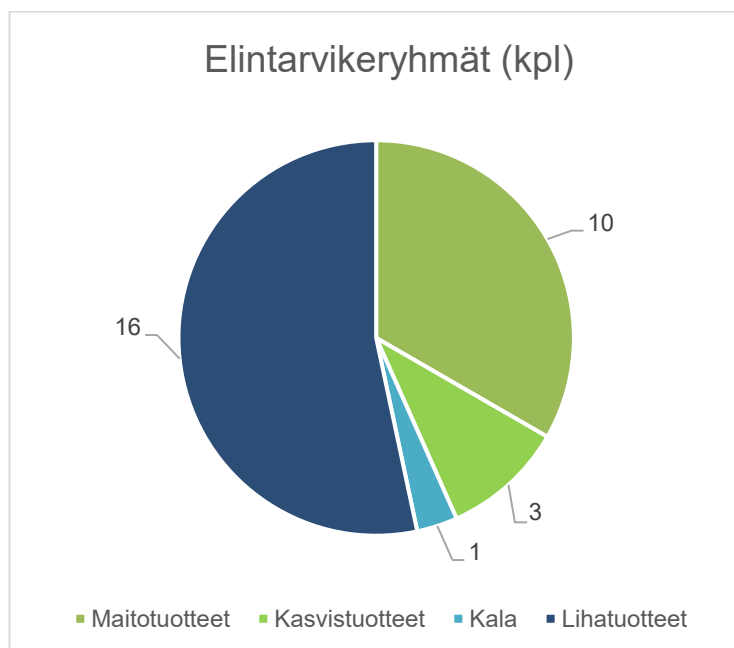
Verifioitava menetelmä	Referenssimenetelmä		
	Positiivinen	Negatiivinen	Yhteensä
Positiivinen	48	0	48
Negatiivinen	2	14	16
Yhteensä	50	14	64

Tuloksia pidettiin järkevinä, sillä 1 pmy näytteessä on menetelmän toteamisrajan tasoa ja pesäkkeiden oikea määrä näytteessä vaihtelee. Referenssimenetelmä pystyi osoittamaan salmonellan tälläkin pitoisuudella, vaikka menetelmien herkkyys on valmistajan mukaan lähes sama. VIDAS-menetelmän arvioitiin vertailun perusteella olevan vähemmän herkkä menetelmä pienillä bakteeripitoisuuksilla.

Ero saattaa johtua VIDAS-menetelmän rikastusvaiheesta, sillä rikastusliemestä ei kehittynyt kasvua Chromid-maljoille viljeltynä, kun taas referenssimenetelmän jatkokasvatukset olivat tyypillisiä. Tämä saattaa liittyä VIDAS-menetelmän rikastusvaiheessa lisättyyn, koostumukseltaan tuntemattomaan supplementtiin, joka on voinut haitata salmonellan kasvua. Referenssimenetelmä ei käytä ensimmäisessä rikastusvaiheessa antibioottia ja toisessa vain puolitettua määrää.

6.2 Vertailukokeet

Vertailukokeisiin valikoitu lihatuotteita, kalatuotteita, maidosta tehtyjä valmisteita sekä kasvis- ja hedelmävalmisteita. Erityyppisten tuotteiden osuudet on kuvattu alla kuvassa 15 ja tarkemmin liitteessä 7, joka sisältää myös yksittäiset tulokset.



Kuva 15. Valikoituneitten elintarvikkeiden päätyypit määrineen

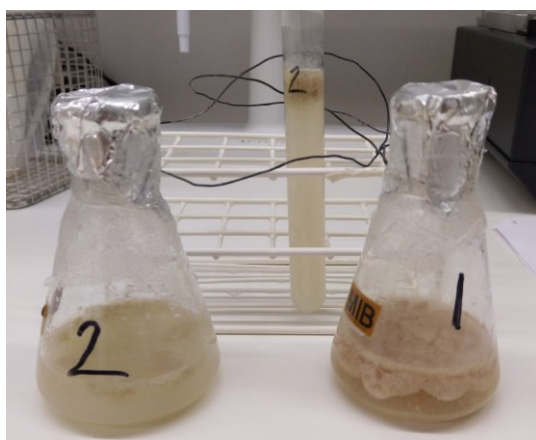
Analysoiduista näytteistä 29 oli negatiivisia ja yksi positiivinen. Verifioitavalla menetelmällä näistä 30:n todettiin olevan negatiivisia ja ei yhdenkään positiivisia. Tulokset kuvataan alla taulukossa 4.

Taulukko 4. Vertailukokeiden tulokset

Vertailukokeet			
Verifioitava menetelmä	Referenssimenetelmä		
	Positiivinen	Negatiivinen	Yhteensä
Positiivinen	0	0	0
Negatiivinen	1	29	30
Yhteensä	1	29	30

Menetelmät vastasivat toisiaan lukuun ottamatta salmonellapositiiviselle raa'alle broilerille tehtyä analyysiä, jossa salmonellaa ei todettu VIDAS-menetelmällä, vaikka se havaittiin referenssimenetelmällä. Tämä johtui mahdollisesti näytteen rikastusliemen koaguloitumisesta, sillä näyte todennäköisesti kuumennettiin SPR-liuskalla lämpöblokkissa eikä siipikarjaa koskevan ohjeen mukaisesti erikseen vesihautteessa.

Osassa näytteissä havaittiin selvää koagulaatiota myös tavanomaiseen esikäsittelyyn kuuluvissa näytetyypeissä. Tällaiset näytteet olivat joko rasvaisia, raakoja lihatuotteita tai rikastuksessa käytettävän suodatuspussin läpäiseviä MSM-tuotteita eli mekaanisesti eroteltua lihaa tai kalaa (esimerkki alla kuvassa 16).



Kuva 16. Lämpöhauteessa koaguloituneita MSM-lohinäytteitä (numero 2). Oikealla myös kuumennettu siipikarjanäyte.

Toisaalta referenssimenetelmän huomattiin herkkyyskokeissa havaitsevan pienempiä bakteeripitoisuuksia kuin VIDAS, joten saatu väärä negatiivinen on voinut johtua myös salmonellan vähäisyydestä. Herkkyyskokeissa salmonella todettiin kaikilla 5 pesäkettä sisältävistä broilerinäytteistä.

6.3 Kaikki tulokset

Molempien koejärjestelyjen tulokset koottiin yhteen (taulukko 5 alla), jolloin saatiin vaihtelevammin sekä positiivisia että negatiivisia tuloksia analysoitavaksi. Vertailukokeiden virhenegatiivinen broilerinäyte on sisällytetty mukaan.

Taulukko 5. Kaikki saadut tulokset.

Herkkyy- ja vertailukokeet			
Verifioitava menetelmä	Referenssimenetelmä		
	Positiivinen	Negatiivinen	Yhteensä
Positiivinen	48	0	48
Negatiivinen	3	43	46
Yhteensä	51	43	94

Tuloksille laskettiin herkkyys-, spesifisyys- ja oikeellisuusarvot, jotka on esitetty alla taulukossa 6. Herkkyyden arvo oli huonompi kuin vertailukokeissa ja väärin negatiivisten osuus oli pienempi.

Taulukko 6. Herkkyy- ja vertailukokeiden tuloksista laskettuja arvoja

Herkkyy- ja vertailukokeet	
Herkkyy	94,1 %
Spesifisyys	100,0 %
Virhepositiivisuus	0,0 %
Virhenegatiivisuus	6,5 %

Menetelmä on spesifi ja virhepositiiviset tulokset ovat tulosten perusteella harvinaisia. Menetelmä ei siis tuota vastetta häiritseville tekijöille. Menetelmän herkkyys on alle 95 %, mutta lähellä valmistajan ilmoittamaa tasoa. Virhenegatiivisten osuus oli 6,5 %. Virhenegatiivisia tuloksia aiheuttivat analyytin hyvin pieni pitoisuus, minkä lisäksi yksi näyte oli mahdollisesti koaguloitunut. Tulosten oikeellisuus oli hyvä korkeammilla pitoisuuksilla. Menetelmän toteamisrajan arvioitiin olevan lähes ilmoitettua tasoa ja riittävä laboratorion käyttöön.

Herkkyykokeiden rinnakkaiset määritykset vastasivat toisiaan valmistajan antaman toteamisrajan ylittävillä näytteillä. Menetelmän tulokset ovat siis toistettavia. Laboratorio jatkaa menetelmän täsmällisyyden arviointia.

7 Päätelmät

VIDAS-menetelmän toimivuutta testattiin referenssimenetelmää vasten neljällä matriisilla sekä satunnaisilla elintarvikenäytteillä. Menetelmien tulokset olivat yhteneväisiä hyvin pieniä pitoisuuksia lukuun ottamatta. VIDAS-menetelmän arvioidaan olevan vähemmän herkkä näillä pitoisuuksilla referenssimenetelmään verrattuna. Verifiointin perusteella menetelmän voidaan todeta toimivan laboratorion käytössä testatuilla matriisityypeillä.

Laboratoriossa käytössä oleva referenssimenetelmän toimivuus on painottunut tyyppisiin *Salmonelloihin* eli serotyyppeihin, joiden motiilius on hyvä ja jotka ovat laktoosinegatiivisia ja rikkivetypositiivisia. Uusi menetelmä todennäköisesti vähentää poikkeavien pesäkkeiden varmistamiseen kuluva työtä, aikaa ja virheitä, vaikkei sen herkkyys ole aivan yhtä hyvä.

Näytteen käsittelyssä huomattiin tapahtuvan koagulaatiota valmistajan mainitsemien tuotteiden eli siipikarjan ja kananmunien, lisäksi joillain liha- ja kalatuotteilla. Näytteiden käyttäytyminen kuumennettaessa kannattaa siis varmistaa, jotta tulokset ovat luotettavia ja laitteen pipetointimekanismi ei tukkeudu. Koaguloituvat näytteet on tarvittaessa mahdollista käsitellä vesihauteessa.

VIDAS SPT:lle on haettu verifiointin jälkeen akkreditointia, ja vuonna 2021 menetelmä lisättiin laboratorion pätevyysalueeseen Salmonellan toteamiseksi maidosta ja siitä tehdyistä valmisteista, lihoista ja niistä tehdyistä valmisteista sekä kasviperäisistä rehuista. Tarvittaessa pätevyysaluetta voidaan laajentaa lisäverifiointilla. Pätevyysalue kuitenkin toistaiseksi kattaa yleisimmät elintarvike- ja rehunäytteet laboratorion salmonellatestauksessa.

Lähteet

- 1 Kantele, Anu & Salmenlinna, Saara & Hakanen, Antti. 2020. Salmonella. Teoksessa Terho Heikkinen et al. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1, Mikrobiologia. E-kirja. Kustannus Oy Duodecim.
- 2 Labbé, Ronald G. & García, Santos (toim.). 2013. Guide to Foodborne Pathogens. E-kirja. John Wiley & Sons, Incorporated
- 3 Hallanvuo, Saija & Johansson, Tuula. 2010. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat. Pdf-dokumentti. Evira. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/julkaisut/julkaisusarjat/julkaisuja/elintarvikkeiden_mikrobiologiset_vaat.pdf.
- 4 Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2020. Tartuntataudit Suomessa 2019. Pdf-dokumentti. <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/seurantajarjestelmat-ja-rekisterit/tartuntatautirekisteri/tartuntatautien-esiintyvyystilastot/tartuntatautien-esiintyvyyssuomessa-raportit>>.
- 5 BioMérieux SA. 2017. VIDAS UP *Salmonella* (SPT). REF 30 707.
- 6 BioMérieux SA. 2005. VIDAS Instrument User's Manual. REF 99 762.
- 7 Toldrá, F. 2007. Advances in Food Diagnostics. E-kirja. Hoboken: John Wiley & Sons, Incorporated.
- 8 BioMérieux SA. Verkkoaineisto. <https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/doc/brochure-vidas-format-us2-1.pdf>. Luettu 27.2.2021.
- 9 BioMérieux SA. ChromID™ *Salmonella* Agar. REF 04920.
- 10 BioMérieux SA. 2002. API 20 E. REF 20 100 / 20 160.
- 11 Salmonella osoittaminen elintarvikkeista MSRV-menetelmällä. 2019. Yrityksen sisäinen dokumentti. Kymen Ympäristölaboratorio Oy.
- 12 Oxoid Limited. Novobiocin Selective Supplement. Verkkoaineisto. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0181&sec=&org=&c=UK&lang=EN>. Luettu 28.1.2021.
- 13 Oxoid Limited. Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) Medium Base. Verkkoaineisto. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0910&c=UK&lang=EN>. Luettu 28.1.2021.

- 14 Oxoid Limited. X.L.D. Agar. Verkkoaineisto.
<http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469&c=UK&lang=EN>. Luettu 28.1.2021.
- 15 HiMedia Laboratories. Salmonella Agar, ÖNÖZ. 2011. Pdf-dokumentti.
<<http://www.himedialabs.com/TD/M573.pdf>>.
- 16 Oxoid Limited. Triple Sugar Iron Agar. Verkkoaineisto.
<http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0277&cat=&c=UK&lang=EN>. Luettu 28.1.2021.
- 17 CDC/M. M. Galton. 1966. ID# 5158. Kuva. Public Health Image Library (PHIL).
<<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=5158>>.
- 18 Oxoid Limited. Urea Agar Base. Verkkoaineisto.
<http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0053&cat=&c=UK&lang=EN>. Luettu 29.1.2021.
- 19 CDC. 1976. ID# 6711. Kuva. Public Health Image Library (PHIL).
<<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=6711>>.
- 20 Merck. 2010. BROLACIN Agar (Bromothymol-blue Lactose Cystine Agar). Pdf-dokumentti. <https://www.merckmillipore.com/Web-FI-Site/en_US/-/EUR/Show-Document-Pronet?id=18442>.
- 21 Valvonta 13/1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Kirja. Helsinki: Elintarvikevirasto.
- 22 Hägg, Margareta (toim.). 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Kirja. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy.
- 23 Biomérieux Industry. 2019. VIDAS® UP Salmonella (SPT) Ultra Performance Summary. <https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/vidas_spt_performance_8.5x11.pdf>.
- 24 ADRIA Développement. 2015. EN ISO 16140 validation study of the VIDAS® UP Salmonella method (VIDAS ® SPT) for the detection of Salmonella spp. 2015. Verkkoaineisto. <https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/03/Synt-BIO-12-32-10-11_en.pdf>. Päivitetty 22.12.2015. Luettu 3.1.2021.

Peptonivesi ja MSRV-agar

Peptonivesi

Difco Buffered Peptone Water, BD, 218105, lot 9197744.

Ainesosat	
Peptoni	10,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Natriumvetyfosfaatti	3,5 g
Kaliumvetyfosfaatti	1,5 g
Tislattu vesi	1000 ml

Steriloidaan autoklavoimalla 15 minuuttia, 121 °C. Valmiin liemen pH tarkistetaan, sallittu väli $7,2 \pm 0,2$.

MSRV-agar

MODIFIED SEMI-SOLID RAPPAPORT VASSILIADIS (MSRV) MEDIUM BASE, CM0910, lot 2919040.

Ainesosat	
Tryptoosi	4.59 g
Kaseiinihydrolysaatti	4.59 g
Natriumkloridi	7.34 g
Kaliumdivetyfosfaatti	1.47 g
Magnesiumkloridi (vedetön)	10.93 g
Malakiittivihreä oksalaatti	0.037 g
Agar	2.7 g
Tislattu vesi	1000 ml

Lisäksi MSRV-supplementti.

MSRV SELECTIVE SUPPLEMENT, Oxoid, SR0161, lot 2998141.

Novobiosiini	10,0 mg
--------------	---------

Kiehautetaan ja jäädytetään vesihauteessa (lämpötila n. 50 ° C). Lisätään aseptisesti 1 ampulli MSRV-supplementtia, joka on liuotettu 2 ml:aan steriiliä tislattua vettä, sekoitetaan ja valetaan maljoiksi. Maljoja kuivataan vähintään tunti laminaarikaapissa. Valmiin alustan pH tarkastetaan, sallittu väli $5,4 \pm 0,2$.

X.L.D.-agar ja Önöz-agarXLD-agar

X.L.D. Medium, Oxoid, CM0469, lot 2938625

Ainesosat	
Hiivauute	3,0 g
L-lysiinihydrokloridi	5,0 g
Ksyloosi	3,75 g
Laktoosi	7,5 g
Sakkaroosi	7,5 g
Natriumdeoksikolaatti	1,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Natriumtiosulfaatti	6,8 g
Ammoniumrautasitraatti	0,8 g
Fenolipuna	0,08 g
Agar	12,5 g
Tislattu vesi	1000 ml

Kiehautetaan, jäähdytetään vesihauteessa (lämpötila n. 50 ° C) ja valetaan maljoiiksi.

Valmiin alustan pH tarkastetaan, sallittu väli 7,4 ± 0,2.

Önöz-agar

Salmonella Agar, Önöz; HiMedia; M573-500G; lot 0000428651.

Ainesosat			
Peptisesti pilkottu eläinkudos	6,80 g	Natriumvetyfosfaatti, 2H ₂ O	1,00 g
Hiivauute	3,00 g	Rauta(III)sitraatti	0,50 g
Lihauute	6,00 g	Magnesiumsulfaatti	0,40 g
Laktoosi	11,50 g	Briljanttivihreä	1,66 mg
Sakkaroosi	13,00 g	Neutraalipunainen	0,022 g
Sappihappojen suoloja	3,825 g	Aniliinisininen	0,25 g
Trinatriumsitraatti, 5H ₂ O	9,30 g	Alitsariinikeltainen GG	0,47 g
Natriumtiosulfaatti	4,25 g	Agar	15,00 g
L-fenyylialaniini	5,00 g	Tislattu vesi	1000 ml

Kiehautetaan, jäähdytetään vesihauteessa (lämpötila n. 50 ° C) ja valetaan maljoiiksi.

Valmiin alustan pH tarkastetaan, sallittu väli 7,1 ± 0,2.

TSI-, urea- ja brolacin-agaritTSI-agar

Triple Sugar Iron Agar, Oxoid, CM0277, lot 1822288.

Ainesosat	
"Lab-Lemco" -naudanlihauutejauhe	3,0 g
Hiivauute	3,0 g
Peptoni	20,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Laktoosi	10,0 g
Sakkarooosi	10,0 g
Glukoosi	1,0 g
Rauta(III)sitraatti	0,3 g
Natriumtiosulfaatti	0,3 g
Fenolipuna	0,024 g
Agar	12,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Liutetaan ja steriloidaan autoklavoimalla 15 minuuttia, 121 °C. Valetaan vinoputkiksi ja valmiin alustan pH tarkastetaan, sallittu väli 7,4 ± 0,2.

Tehdään 95 ml:n annoksina, jolloin kuivaelatusainetta punnitaan n. 6,175 g.

Urea-agar

Urea Agar Base, Oxoid, CM0053, lot 1694661.

Ainesosat	
Peptoni	1,0 g
Glukoosi	1,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Natriumvetyfosfaatti	1,2 g
Kaliumdivetyfosfaatti	0,8 g
Fenolipuna	0,012 g
Agar	15,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Lisäksi urea-ampulli.

Urea 40%, Oxoid, CM0053, lot 1694661.

Liutetaan 2,4 g reagenssia 95 ml:aan vettä ja steriloidaan autoklavoimalla 115 °C, 20 minuuttia. Jäähdytetään 50 °C:en ja lisätään aseptisesti 1 ampulli urealiuosta. Sekoitetaan ja valetaan vinoputkiksi. Valmiin agarin pH tarkistetaan, sallittu väli 6,8±0,2.

Brolacin-agar

BROLACIN agar (C.L.E.D. agar), Merck, 1.01638.0500, lot VM751038 628.

Ainesosat	
Peptoni	7,0 g
Hiivauute	2,0 g
Lihauute	2,0 g
L-kystiini	0,128 g
Laktoosi	10,0 g
Bromotymolisinen	0,03 g
Agar	12,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Liutetaan ja steriloidaan autoklavoimalla 15 minuuttia, 121 °C. Jäähdytetään vesihau-
teessa (n. 50 °C) ja valetaan maljoiksi.

Valmiin alustan pH tarkastetaan, sallittu väli $7,3 \pm 0,2$.

BHI-liemi

Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth), Scharlau Microbiology, 02-599-500, lot 108037.

Ainesosat	
Aivouute	12,5 g
Sydänuute	5,0 g
Peptoni	10,0 g
Dekstroosi	2,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Natriumvetyfosfaatti	2,5 g
Tislattu vesi	1000 ml

Steriloidaan autoklavoimalla 15 minuuttia, 121 °C. Valmiin liemen pH tarkastettava, sallittu väli 7,4 ± 0,2.

Muut reagenssit

VIDAS QVC-kitti	Biomérieux lot 1008201370 exp 2021-07-08
S. Tranaroa	NCTC10252 lot 1087-09-9
ChromID Agar	Biomérieux lot 1008254390 exp 2021-01-13
Dilucup Elegance MRD	Labrobot batch 1645 exp 18May2022

	VIDAS SPT	SLM supp tab
Rehu, Juusto 1	lot 1007640450 exp 2020-12-21	lot 0000007 exp 2021-03-14
Liha	lot 1007715500 exp 2021-01-21	lot 0000007 exp 2021-03-14
Broileri	lot 1008102860 exp 2021-08-05	lot 0000007 exp 2021-03-14
Juusto 2	lot 1008102860 exp 2021-08-05	lot 0000009 exp 2022-05-06

Herkkyykskokeiden tulokset

Matriisi	Taso	Lisäys (pmy)	VIDAS-tulos	NMKL-tulos	
JUUSTO 1	nolla1	0	neg.	neg.	
	nolla2	0	neg.	neg.	
	nolla3	0	neg.	neg.	
	pieni1	8	pos.	pos.	
	pieni2	8	pos.	pos.	
	pieni3	8	pos.	pos.	
	pieni4	8	pos.	pos.	
	pieni5	8	pos.	pos.	
	iso1	80	pos.	pos.	
	iso2	80	pos.	pos.	
	iso3	80	pos.	pos.	
	iso4	80	pos.	pos.	
	iso5	80	pos.	pos.	
	REHU	nolla1	0	neg.	neg.
		nolla2	0	neg.	neg.
pieni1		15	pos.	pos.	
pieni2		15	pos.	pos.	
pieni3		15	pos.	pos.	
pieni4		15	pos.	pos.	
pieni5		15	pos.	pos.	
iso1		149	pos.	pos.	
iso2		149	pos.	pos.	
iso3		149	pos.	pos.	
iso4		149	pos.	pos.	
iso5		149	pos.	pos.	
LIHA		nolla1	0	neg.	neg.
		nolla2	0	neg.	neg.
		nolla3	0	neg.	neg.
	pieni1	11	pos.	pos.	
	pieni2	11	pos.	pos.	
	pieni3	11	pos.	pos.	
	pieni4	11	pos.	pos.	
	pieni5	11	pos.	pos.	
	iso1	114	pos.	pos.	
	iso2	114	pos.	pos.	
	iso3	114	pos.	pos.	
	iso4	114	pos.	pos.	
	iso5	114	pos.	pos.	

BROILERI	nolla1	0	neg.	neg.	
	nolla2	0	neg.	neg.	
	nolla3	0	neg.	neg.	
	pieni1	5	pos.	pos.	
	pieni2	5	pos.	pos.	
	pieni3	5	pos.	pos.	
	pieni4	5	pos.	pos.	
	pieni5	5	pos.	pos.	
	iso1	125	pos.	pos.	
	iso2	125	pos.	pos.	
	iso3	125	pos.	pos.	
	iso4	125	pos.	pos.	
	iso5	125	pos.	pos.	
	JUUSTO 2	nolla1	0	neg.	neg.
		nolla2	0	neg.	neg.
nolla3		0	neg.	neg.	
pieni1		1	pos.	pos.	
pieni2		1	pos.	pos.	
pieni3		1	neg.	pos.	
pieni4		1	pos.	pos.	
pieni5		1	neg.	pos.	
iso1		10	pos.	pos.	
iso2		10	pos.	pos.	
iso3		10	pos.	pos.	
iso4		10	pos.	pos.	
iso5		10	pos.	pos.	

Vertailukokeiden tulokset

Näytekoodi	Matriisi	Matriisiryhmä	VIDAS-tulos	NMKL-tulos
709-1	porsaan kasler, raaka	LIHA	-	-
817	jauheliha	LIHA	-	-
1646-3	broilerin rinta	LIHA	-	+
1646-6	broileri, kokonainen	LIHA	-	-
1740	juusto	MAITO	-	-
1741	juusto	MAITO	-	-
1742	juusto, sulate	MAITO	-	-
1743	juusto, vege	KASVI	-	-
1745	juusto	MAITO	-	-
1746	juusto, vege	KASVI	-	-
2050	ruokakerma	MAITO	-	-
3208	jauheliha	LIHA	-	-
5063	jauheliha	LIHA	-	-
5185-1	kalkkuna MSM, raaka	LIHA	-	-
5185-2	lohi, raaka (MSM)	KALA	-	-
5185-3	naudan elimet	LIHA	-	-
5185-4	kalkkunan koipi, raaka	LIHA	-	-
5185-5	broileri, kypsä	LIHA	-	-
5213	juusto	MAITO	-	-
5222-1	hevosen silppu, raaka	LIHA	-	-
5618-1	jauheliha	LIHA	-	-
5646-1	sian silppu, raaka	LIHA	-	-
5662	luujauho	LIHA	-	-
5663	jauheliha/lihamurske	LIHA	-	-
5736-2	naudan palapaisti, raaka	LIHA	-	-
5724	juusto	MAITO	-	-
5725	juusto	MAITO	-	-
5729-1	juusto, sulate	MAITO	-	-
5471	juusto	MAITO	-	-
5723-1	kookosöljy	KASVI	-	-
Yhteensä	30	Negatiivisia	30	29
		Positiivisia	0	1