



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 8261/ IDF 122: 2001

ISO 6887, Parts 1-4; Part 1, 1999; Part 2, 2003; Part 3, 2003; Part 4, 2003

- 1) Standardissa ISO 8261/ IDF 122:2001 mainittuja lasihelmiä ei käytetä vanukkaiden ja jälkiruokien sekoittamiseen.
- 2) Voinäytteitä punnitaan 25 g/21 ml. Rasvakerrosta ei imetä pois, vaan pipetoidaan rasvakerroksen alta.
- 3) Laimennusliuosta voidaan esilämmittää 45 ± 1 °C vesihautessa helpottamaan rasvaisten tuotteiden liukenemistä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu maidolle ja maitovalmisteille (ISO 8261/IDF 122: 2001) sekä muille elintarvikkeille (ISO 6887: 1-4) ja rehuille laimennussarjan osalta. Muut esikäsittelyohjeet ovat menetelmäkohtaisia.

3 Määritelmä(t)

Esikäsittelyn tarkoituksena on saada näytteestä edustava osanäyte tutkimusta varten mahdollisimman aseptisesti. Laimentamisen tarkoituksena on laimentaa mikrobien määrä tilavuusyksikköä kohti sopivaksi mikrobiologiseen tutkimukseen.

4 Periaate

Yleensä 10 g näytettä homogenoidaan 90 ml:aan tai 90 g:aan laimennusliuosta, jolloin saadaan ensilaimennos. Homogenoinnin avulla mikrobit saadaan jakautumaan mahdollisimman tasaisesti liuokseen.

Jatkolaimennokset saadaan sekoittamalla tietty tilavuus ensilaimennosta 9-kertaiseen määrään laimennusliuosta (esim. 1 ml + 9 ml) sekä toistamalla tämä menettely jokaisesta näin saadusta laimennoksesta. Tavoitteena on saada laimennettua alkuperäinen näyte sellaiselle alueelle, että laimennussarjasta viljelyiltä maljoilta pystytään laskemaan pesäkkeitä.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

5 Mahdolliset virhelähteet

Dikaliumvetyfosfaattiliuoksen (8.5) käyttö renniinikaseiinien laimentamisessa voi haitata kaseiinijyvästen liukenemistä. Jyväset voivat haitata mikrobipitoisuuden määrittystä PCA+L-agarilla.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher-pusseja
- 3) Vortex ja steriilit laboratorioastiat (putket)
- 4) Tasoravistelijä
- 5) Vesihaude 30 ± 1 °C
- 6) Vesihaude 37 ± 1 °C
- 7) Vesihaude 45 ± 1 °C
- 8) Vaaka
- 9) Steriilejä veitsiä, pinsettejä, saksia ja muita apuvälineitä kuten pora ja vasara
- 10) Sauvasekoitin ja hienonnusastia (Pesty hienonnusastia steriloidaan 70 % etanolissa yön yli. Etanoli kaadetaan pois ja astian päälle asetetaan avattu Stomacher-pussi steriilipuoli astiaan päin. Annetaan etanolin haihtua ennen näytteen lisäämistä astiaan.)
- 11) Jääkaappi 2-8 °C

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Laimennusliuos, peptoni (0,1%)-suola (0,85%)-liuos (PEPSU)
- 2) Dikaliumvetyfosfaattiliuos pH $8,4 \pm 0,2$, happamalle heralle
- 3) Dikaliumvetyfosfaattiliuos pH on $7,5 \pm 0,2$, juustolle, valssijauheelle (roller-dried milk), fermentoidulle maidolle, kaseinille ja smetanalle
- 4) Dikaliumvetyfosfaattiliuos pH $8,4 \pm 0,2$ + vaahdonesto, happo- ja maitokaseiinille
- 5) Dikaliumvetyfosfaattiliuos pH $7,5 \pm 0,2$ + vaahdonesto, juoksetekaseinille
- 6) Natriumsitraattiliuos pH $7,5 \pm 0,2$, juustolle ja kuivalle maidolle
- 7) Puskuroitu peptonivesi (BPW), pH $7,0 \pm 0,2$
- 8) Laimennusliuos + bromikresolipuna, happamille tuotteille
- 9) Fosfaattipuskuriliuos pH $7,0 \pm 0,2$, gelatiinille
- 10) BPW + Tween 80
- 11) NaOH 1 M (40 g/l)
- 12) α -amylaasiliuos
- 13) Tripolyfosfaattiliuos, vaihtoehto heikosti liukenevalle renniinikaseiinille



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

9 Kontrollikannat

Kontrollikantoja ei käytetä.

10 Näytteen esikäsittely ja ensilaimennuksen tekeminen

Käsittelyn aikana näytteen, ensilaimennoksen tai laimennussarjan lämpötila ei saa ylittää 20 °C, ellei toisin ole mainittu. Jotta äkillinen lämpötilavaihtelu ei vahingoittaisi mikrobeja, laimennusliuoksen lämpötilan on yleensä oltava suunnilleen sama kuin näytteen.

Ensilaimennos on suspensio, joka saadaan sekoittamalla näyteosa 9-kertaiseen määrään laimennusliuosta. Jos ensilaimennoksessa on suuria partikkeleita, tulee niiden antaa laskeutua ennen jatkosiirrostuksia.

Tutkittaessa näytettä rikastamalla (esim. *Salmonella*), tarvitaan erityismenettelyitä, jotka on kuvattu kyseisessä menetelmästandardissa.

Osa tutkittavista maitotuotteista on lämpökäsitelty tai niitä on hapatettu, joten niissä olevat mikrobit ovat stressaantuneet. Jotta tällaiset mikrobit lähtisivät kasvamaan mahdollisimman hyvin, inkuboidaan ensilaimennosta 20-25 °C lämpötilassa 45 min ennen laimennossarjan tekoa ja viljelyä.

Laimennussarja tulisi tehdä 30 min kuluessa ensilaimennoksen tekemisestä ja viljellä maljoille 45 min kuluessa.

Pakastettua näytettä sulatetaan, kunnes näytteenotto on mahdollista. Sulatus tapahtuu joko huoneenlämmössä, jolloin sulatusaika on enintään 3 h, tai 2-8°C lämpötilassa enintään 24 h (pakastettua kalaa sulatetaan enintään 48 h ja lihaa enintään 18 h). Sulaneet näytteet tulee tutkia viivyttämättä.

11 Jatkolaimennukset

11.1 Periaatteet

Jatkolaimennusten valmistamiseen käytetään aina laimennusliuosta (8.1).

Kaikissa vaiheissa käytetään steriiliä pipettiä (otetaan uusi kertakäyttöpipetti tai vaihdetaan pipetin kärki). Pipetti ei saa tyhjennettäessä koskettaa laimennusliuoksen pintaa.

11.2 Jatkolaimennosten valmistaminen

Mikäli näytteen mikrobipitoisuuden oletetaan olevan pieni, tutkitaan mikrobien esiintymistä 0,1 ml:ssa tai 0,1 g:ssa näytettä eikä lisälaimennoksia tarvita.

Mikäli näytteen mikrobipitoisuuden oletetaan olevan suuri, tarvitaan lisälaimennoksia. Tällöin siirrostetaan steriilillä pipetillä 1 ml ensilaimennosta 9 ml laimennusliuosputkeen tai suurempia määriä tarvittaessa 10 ml ensilaimennosta pulloon, jossa on 90 ml laimennusliuosta.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Siirrostaessasi viskoosista ensilaimennoksesta tai renniinikaseiinista huuhtelee pipetti, jolla siirät ensilaimennosta, useita kertoja laimennusliuosputkessa siirrostamisen jälkeen. Sekoita laimennusliuos ravistelemalla.

12 Maito ja maitovalmisteet

12.1 Maito ja nestemäiset maitotuotteet

Sekoita näyte hyvin kääntämällä näyteastiaa nopeasti 25 kertaa ylösalaisin. Varo vaahtoamista. Näyteosa on otettava kolmen minuutin kuluessa sekoituksesta.

Pipetoi 1 ml näytettä steriilillä pipetillä 9 ml:aan laimennusvettä (8.1) (tai 10 ml 90 ml:aan laimennusvettä). Laimennosta sekoitetaan huolellisesti sekoittimella 5-10 sekunnin ajan.

12.2 Maitojauhe, makea herajauhe, hapan herajauhe, kirnumaitojauhe ja laktoosi

Sekoita näyte kääntelemällä tai ravistelemalla pakkausta. Jos alkuperäinen pakkaus on liian täynnä sekoittuakseen kunnolla, siirrä sisältö sekoitusta varten suurempaan steriiliin astiaan ja sekoita näyte. Avaa pakkaus, ota steriilillä lusikalla tai spaattelilla näyteosa ja sulje pakkaus.

Lämmitä 90 ml laimennusliuosta (8.1) 45 °C vesihauteessa.

Käytä vaikeasti liukenevalle happamalle herajauheelle omaa laimennusliuosta (8.2), jonka pH on $8,4 \pm 0,2$, ja valssijauheelle (roller-dried milk) omaa laimennusliuosta (8.3), jonka pH on $7,5 \pm 0,2$. Punnitse 10 g näytettä steriiliin astiaan ja lisää esilämmitettyä laimennusliuosta.

Jotta jauhe liukenisi hyvin, lisää ensin osa laimennusliuoksesta ja sekoita heilutellen astiaa. Lisää loput laimennusliuoksesta ja ravista sitten 25 kertaa n. 30 cm:n edestakaisella liikkeellä n. 7 s. Siirrä astia 45 °C:n vesihauteeseen 5 minuutiksi ja ravistelee silloin tällöin.

12.3 Juusto

Punnitse 10 g näytettä Stomacher-pussiin. Lisää pussiin 90 ml 45 °C vesihauteessa esilämmitettyä laimennusliuosta (8.3).

Homogenoi Stomacherilla kunnes näyte on tasaisesti sekoitunut liuokseen eli 1-3 minuuttia. Anna vaahdon laskeutua.

12.4 Happokaseiini, maitokaseiini, renniinikaseiini ja kaseinaatti

Sekoita pakkauksen sisältö kääntelemällä ja ravistelemalla.

Käytä erilaisille näytteille laimennusliuoksia seuraavasti:

Happo- ja maitokaseiini, dikaliumvetyfosfaattiliuos + vaahdonesto pH 8,4 (8.4)



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Kaseinaatti, dikaliumvetyfosfaattiliuos pH 7,5 (8.3)

Renniinikaseiini, dikaliumvetyfosfaattiliuos + vaahdonesto pH 7,5 (8.5)

12.4.1 Normaalisti liukenevat

Punnitse 10 g näytettä Stomacher-pussiin. Lisää 90 ml huoneenlämpöistä laimennusliuosta. Sekoita hyvin ja anna seistä 15 minuuttia huoneenlämmössä. Homogenoi 2 minuuttia Stomacherilla. Käytä rakeisille tuotteille kahta pussia päällekkäin. Anna seistä 5 minuuttia.

12.4.2 Heikosti liukenevat renniinikaseiinit

Jauha kuiva kaseiini ennen näytteen ottamista. Ota esimerkiksi noin 20 g näytettä sopivaan astiaan ja jauha se välttämättä lämmön nousua.

Punnitse 5 g jauhettua näytettä steriiliin 250 ml pulloon, jossa on lasihelmiä sekoittamista varten. Lisää 95 ml 37 °C esilämmitettyä tripolyfosfaatti-liuosta (8.13). Sekoita tasoravistelijassa 15 minuuttia. Siirrä astia 37 °C vesihauteeseen 15 minuutiksi ja ravistele silloin tällöin.

12.5 Voi

Punnitse 10 g näytettä näyteastiaan. Siirrä astia 45 °C vesihauteeseen ja anna sen lämmetä kunnes koko näyte on sulanut. Lisää 90 ml 45 °C esilämmitettyä laimennusliuosta ja homogenoi Stomacherilla.

Vaihtoehtoisesti voidaan tutkia vain näytteen vesifaasi. Punnitse 25 g näytettä (tämä sisältää 4 g vettä) ja lisää 21 ml 45 °C esilämmitettyä laimennusliuosta. Analyysiherkyttä voidaan tarvittaessa parantaa lisäämällä vähemmän vettä. Siirrä astia 45 °C vesihauteeseen ja anna lämmetä, kunnes voi on sulanut. Sekoita kunnolla. Anna seistä enintään 15 minuuttia kerrosten erottamiseksi. Pipetoi tutkittava näyte rasvakerroksen alta vesikerroksesta. 1 ml vesikerroksesta vastaa 1 ml alkuperäistä laimentamatonta näytettä.

12.6 Pakastetut maitotuotteet

Punnitse 10 g näytettä näyteastiaan. Siirrä astia 30 °C vesihauteeseen. Anna lämmetä kunnes koko näyte on sulanut ja sekoita. Kaada näytteen päälle 90 ml laimennusliuosta (8.1), sekoita ja homogenoi Stomacherilla.

12.7 Vanukkaat, jälkiruoat, kerma

Punnitse 10 g näytettä pulloon. Lisää 90 ml huoneenlämpöistä laimennusliuosta (8.1) ja ravista, kunnes näyte liukenee.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

12.8 Hapanmaitotuotteet

Punnitse 10 g näytettä Stomacher-pussiin. Lisää 90 ml huoneenlämpöistä laimennusliuosta (8.3), jonka pH on $7,5 \pm 0,2$. Homogenoi Stomacherilla.

12.9 Maitopohjaiset jauhemaiset lastenruoat

Sekoita suljetun pakkauksen sisältö kääntelemällä ja ravistelemalla. Jos alkuperäinen pakkaus on liian täynnä sekoittuakseen kunnolla, siirrä sisältö suurempaan astiaan sekoittamista varten ja sekoita näyte. Avaa pakkaus, ota näyte steriilillä lusikalla tai spaattelilla ja sulje pakkaus.

Lämmitä 90 ml laimennusliuosta 45 °C vesihauteessa.

Punnitse 10 g näytettä 90 ml:aan 45 °C esilämmitettyä laimennusliuosta. Jotta jauhe liukenisi hyvin, lisää ensin osa laimennusliuoksesta ja sekoita heilutellen astiaa. Lisää loput laimennusliuoksesta ja ravista sitten 25 kertaa n. 30 cm:n edestakaisella liikkeellä n. 7 s. Siirrä purkki 45 °C :n vesihauteeseen 5 minuutiksi ja ravistele silloin tällöin.

Näytteissä, joissa on paljon tärkkelystä, voi olla liian korkea viskositeetti ensilaimennuksessa. Käytä α -amylaasiliuosta (8.12) tai kaksinkertaista määrää laimennusliuosta. Ota tämä huomioon tuloksia laskettaessa.

13 Liha ja lihatuotteet

13.1 Pintasivelynäytteet

Pintasivelynäytteitä laimennettaessa on otettava huomioon pinta-ala, jolta näyte on pyyhitty. Esim. 25 cm^2 laimennetaan 25 ml:aan laimennusliuokseen, jolloin 1 ml edustaa 1 cm^2 aluetta.

13.2 Tuore liha, lihatuotteet

Käytä koko näyte ensilaimennuksen valmistamiseen, mikäli näytettä on enintään 50 g.

13.2.1 Näytepala tai ruho

Ota pinta ja/tai syvänäyte. Pintanäyte voidaan ottaa sivelynäytteenä (käyttäen vanuikkkoa tai taitosta), jolloin näyte ei tuhoudu.

13.2.2 Viipale tai pala lihasta tai kypsennetystä lihasta

Ota näyteeksi siivu keskeltä palaa.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

13.2.3 Lihatuotteet, joissa on kuori (makkarat)

Desinfioi synteettisessä kuoressa olevista kypsytetyistä tai raakamakkarosta kuori avaamiskohdasta ja poista se steriileillä pinseteillä. Leikkaa tuote viipaleiksi ja edelleen paloiksi steriilillä veitsellä. Kypsistä raakamakkarosta ei poisteta kuorta.

13.2.4 Prosessoidut lihatuotteet

Poista tai avaa pehmeä pakkaus saksilla tai kirurgiveitsellä. Kovat pakkaukset, kuten lasipurkit, desinfioidaan ensin ulkopuolelta 70% etanolilla ja avataan sitten aseptisesti välttämättä näytteen kontaminoitumista. Näyte voidaan homogenoida alkuperäisessä pakkauksessa.

13.3 Kovat ja kuivat lihatuotteet

Homogenoi näyte joko sauvasekoittimella, jauhamalla tai hienontamalla. Lämpötilan nousun välttämiseksi jauha tai hienonna näytettä enintään 1 min. Sauvasekoitinta käytettäessä sekoitusaika on enintään 2,5 min kerrallaan.

13.4 Nestemäiset, ei-viskoosit lihatuotteet

Sekoita näytettä ravistamalla 25 kertaa 25 cm kaareissa, jotta mikrobit saadaan jakautumaan tasaisesti. Punnitse näyte esim. Stomacher-pussiin, lisää laimennusliuosta suhteessa 1+9 ja homogenoi.

13.5 Heterogeeniset lihatuotteet

Heterogeenisiä tuotteita ovat esim. pakatut, esikypsennetyt ateriat.

Ota näytteeseen osia tuotteen jokaisesta komponentista siinä suhteessa kuin niitä on tuotteessa. Vaihtoehtoisesti homogenoi koko näyte ja ota siitä osa näytteeksi. Tarvittaessa näytteen voi hienontaa tai jauhaa. Lämpötilannousun välttämiseksi hienonna tai jauha enintään 1 min.

Punnitse näyte Stomacher-pussiin, lisää laimennusliuosta suhteessa 1+9 ja homogenoi.

13.6 Happamat lihatuotteet

Punnitse näyte steriiliin Stomacher-pussiin.

Happamien tuotteiden laimennossarjaa tehtäessä on ensilaimennoksen pH saatava neutraaliksi. Kaada näytteen päälle suhteessa 1+9 laimennusliuosta, jossa on pH-indikaattori (8.8). Neutraloi suspension pH NaOH:lla (8.11). Kun väri muuttuu violetiksi, ensilaimennoksen pH on neutraali.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

13.7 Rasvaiset tuotteet (yli 20% massasta rasvaa)

Käytä laimennusliuosta (8.10), johon on lisätty 1-10 g/l sorbitaanimonoleaattia (Tween 80) saman verran kuin näytteessä on rasvaa. Esim. rasvaa 40 %, lisätty 4 g/l Tween 80. Tämä käsittely parantaa näytteen emulsoitumista.

14 Kala ja kalatuotteet

14.1 Raaka kala, äyriäiset, simpukat

14.1.1 Kokonainen tuore kala

Älä kosketa kiduksia, sisäelimiä tai peräaukkoa, koska niissä on runsaasti bakteereita. Ota näytepalanen selkälihaksesta, paloittele ja jauha se laimennusliuokseen (8.1).

14.1.2 Viipaloitu kala, fileet ja pihvit

Punnitse näyte Stomacher-pussiin ja lisää 9-kertaiseen määrään laimennusliuosta (8.1). Homogenoi Stomacherilla. Ensilaimennoksen ollessa liian sakeaa tai viskoosia tee suurempi laimennos. Tämä on otettava huomioon tuloksia laskettaessa.

Anna ensilaimennoksen seistä tarvittaessa suurien partikkelien laskeutumiseksi, kuitenkin enintään 15 min.

14.1.3 Kokonaiset kovakuoriset äyriäiset kuten ravut

Käytä vasaraa, pihtejä ja pinsettejä kuoren ja saksien rikkomiseen. Näin saadaan otettua ulos enemmän lihaa analyysiin. Leikkaa näyte paloiksi kaksinkertaiseen Stomacher-pussiin, lisää laimennusliuosta suhteessa 1+9 ja homogenoi Stomacherilla.

14.1.4 Äyriäiset kuten katkaravut, jokirapu, hummerit

Poista pää ja pyrstö ennen lihan analysointia. Kuori äyriäinen ja paloittele liha (Ei koske pienimpiä äyriäisiä) Stomacher-pussiin. Homogenoi näyte Stomacherilla ja lisää laimennusvettä (8.1) suhteessa 1+9.

14.1.5 Elävät simpukat

Säilytä näyte + 4 °C ± 2 °C. Simpukoiden tulisi olla elossa. Poista simpukat, joiden kuori on rikki tai auennut.

Riittävä määrä simpukoita on avattava, jotta saadaan tutkimusmenetelmään tarvittava määrä lihaa ja nestettä. Edustavassa näytteessä on vähintään 10 kpl ostereita tai 15 kpl sinisimpukoita tai 30 sydänsimpukoita, jotta näytemäärä olisi 75-100 g (25 g pienille eliöille). Simpukoita tutkittaessa tutkitaan sekä liha että sisällä oleva neste.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Pese ja harjaa jokainen kuori juoksevan veden alla, varsinkin sarana- ja avautumiskohdasta. Valuta puhdistetut simpukat, desinfioi 70% alkoholilla ja aseta ne lautaselle. Peitä imupaperilla.

Avaa kuori, mutta älä revi lihasta, vaan leikkaa tarvittaessa steriileillä saksilla tai veitsellä ennen avaamista. Kerää liha ja kuorensisäinen neste steriiliin Stomacher-pussiin. Laita kaksi Stomacher-pussia päällekkäin. Simpukat, joissa ei ole nestettä läppien välissä, voidaan käyttää, mikäli ne olivat avattaessa elossa. Purista Stomacher-pussista ilma pois ja homogeneroi 2-3 min. Ota 50 g homogenaattia toiseen Stomacher-pussin ja lisää n. 100 ml laimennusliuosta valmiiksi mitatusta 450 ml:sta. Homogeneroi Stomacherilla vielä 2-3 min. Lisää homogeneroinnin jälkeen jäljellä oleva laimennusliuos, jotta ensilaimennoksen suhteeksi saadaan 1+9, ja sekoita hyvin.

14.1.6 Muut merenelävät

Mustekala-, kotilo-, merisiili-, merikurkku- ja merivuokkonäytteet esikäsitellään ja laimennetaan standardin ISO 6887-3 mukaan.

14.2 Prosessoidut kala-, äyriäis-, simpukka- ja muut tuotteet

14.2.1 Suola- ja etikkatuotteet

Ota suikaleita näytteen lihasta, jotta saadaan homogeeninen näyte. Hyvin suolaiset tuotteet tulee laimentaa enemmän kuin 1+9.

14.2.2 Kuivattu kala, kuivattu suolakala

Leikkaa saksilla paloja kalasta sekä nahasta. Punnitse näyte Stomacher-pussiin ja valmista laimennos 1+2 laimennusliuokseen. Anna liota tarvittaessa huoneenlämmössä (18-27 °C) enintään 60 min ja homogeneroi Stomacherilla. Lisää suspensioon laimennusliuosta (8.1) siten, että saadaan lopullinen ensilaimennos 1+9.

14.2.3 Kokonainen savukala, viipaleet ja fileet

Kokonaisena syötävästä kalasta näytteeseen tulee ottaa myös nahkaa. Näyte otetaan selkäalueelta ja liha leikataan ja pilkotaan aseptisesti. Näyte punnitaan steriiliin Stomacher-pussiin, lisätään laimennusliuos (8.1) ja homogeneroidaan Stomacherilla.

14.2.4 Marinoidut tuotteet

Kuten happamat lihatuotteet, ks. kohta 13.6



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

14.2.5 Leivitetty kala-, surimi-, äyriäis- ja simpukkatuotteet

Kuten rasvaiset elintarvikkeet, ks. kohta 15.2

14.2.6 Kala-, äyriäis- ja simpukkaruoat

Ota osia näytteen joka komponentista ottaen komponenttien suhteet huomioon. Vaihtoehtoisesti koko näyte voidaan homogenoida ja ottaa näyte seoksesta.

14.2.7 Kokonaiset tai kuorelliset kypsennetyt äyriäiset ja simpukat

Kuten kypsentämättömät, ks. kohta 14.1

14.3 Pakastettu kala, pakastetut äyriäiset, simpukat ja muut pakastetuotteet

14.3.1 Kuorelliset ravut palana

Sulata näytettä, kunnes saat palan rikotuksi. Erottele ravut ja ota lihasta paloja pinseteillä.

14.3.2 Kokonaiset ravut palana

Sulata 1 h huoneenlämmössä (18-27 °C), jotta saat palan rikotuksi. Ota ravut pinseteillä ja kuori ne. Homogenoi näyte Stomacherilla.

14.3.3 Hiutaloitu ravunliha palana

Ota näyte pakastetusta palasta poralla tai sulata 1 h huoneenlämmössä ja ota paloja pinseteillä.

14.3.4 Kokonaiset mustekalat palana

Sulata 1 h huoneenlämmössä ja leikkaa paloja saksilla tai suurella terävällä veitsellä.

14.3.5 Esikypsennetyt etanat, simpukat palana

Kuten ravunliha

14.3.6 Kalafileet palana

Ota näyte kairalla pakastetusta palasta, käytä apuna pinsettejä. Vaihtoehtoisesti voit sulattaa fileitä huoneenlämmössä, kunnes ne ovat tarpeeksi pehmeitä leikattaviksi. Sulata näytteitä kuitenkin enintään 3 h. Ota paloja isolla veitsellä ja pinseteillä.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

14.3.7 Suuret kalapalat esim. tonnikalafilee

Sulata kalapaloja huoneenlämmössä, kunnes ne ovat tarpeeksi pehmeitä leikattavaksi. Sulata näytteitä kuitenkin enintään 3 h. Leikkaa siivuja palan keskeltä isolla terävällä veitsellä. Pienemmät kalapalat käsitellään sulatuksen jälkeen kuten tuore tuote.

14.3.8 Kokonainen pakastettu kala

Sulata pakastettua kalaa huoneenlämmössä enintään 3 h tai jääkaapissa 0-4 °C enintään 48 h. Leikkaa sulaneesta kalasta veitsellä pala lihasta nahan alta tai ota näyte sulattamattomasta kalasta poralla välttämättä ruotoja.

15 Muut elintarvikkeet

15.1 Happamat tuotteet

Kuten happamat lihatuotteet, ks. kohta 13.6

15.2 Rasvaiset elintarvikkeet, paitsi margariinit ja levitteet

Käytettävä laimennusliuos (8.10):

Lisätään laimennusliuokseen sorbitaanimonooleaatia (Tween 80) 1-10 g/l parantamaan emulsoitumista. Tween 80:ä lisätään näytteen rasvapitoisuuden perusteella, esim. 40% rasvaa, 4 g/l Tween 80.

15.3 Jauhot, viljan jyvät, viljan sivutuotteet, rehut,

Sekoita kuivat jauheet ravistamalla pakkausta hyvin ennen näytteen punnitsemista. Punnitse 1 osa näytettä ja lisää 9 osaa laimennusliuosta, esim. 1g 9 ml:aan, ja sekoita.

Anna seistä 20-30 min huoneenlämmössä.

Jos suspension viskositeetti on liian suuri eikä näyte sekoitu hyvin, lisää vielä yhtä suuri tilavuus laimennusliuosta kuin aikaisemmin. Uusi ensilaimennossuhde on 1:20. Ota laimennos huomioon laskuissa.

Homogenoi näytettä 1 min Stomacherilla. Kovia näytteitä, kuten jyviä, homogenoitaessa laita kaksi Stomacher-pussia päällekkäin.

Viljaa ja muita heterogeenisiä tuotteita analysoitaessa näytemääräksi suositellaan 50 g. Laimennokseksi suositellaan 1+4, jolloin näytteeseen lisätään 200 ml laimennusliuosta. Homogoinnin jälkeen laimennokset tehdään 1+1.

15.4 Kovat tuotteet



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Raasta, leikkaa tai murra näyte-erä aseptisesti pienemmiksi paloiksi steriilissä Stomacher-pussissa. Käytä tarvittaessa vasaraa.

Lisää 1 osa näytettä 9 osaan laimennusliuosta ja sekoita.

Anna seistä huoneenlämmössä 20-30 min. Homogenoi Stomacherilla.

15.5 Gelatiini

Punnitse 20 g näytettä aseptisesti 500 ml steriiliin pulloon.

Lisää 180 ml fosfaattipuskuriliuosta (8.9) ja sekoita rakeiden liuottamiseksi. Laimennussuhde on 1:10. Jätä suspensio turpoamaan 60 minuutiksi huoneenlämpöön.

Siirrä pullo 45 °C vesihauteeseen enintään 30 minuutiksi ja sekoita gelatiinin liuottamiseksi.

15.6 Margariinit ja levitteet

Poista ensin näytteen pinnasta 3-5 mm paksu kerros ja ota sitten näyte. Punnitse näytettä steriiliin pulloon. Lisää pulloon rasvan osuutta vastaava tilavuus laimennusliuosta. Esim. 40 g näytettä, jossa 82% rasvaa: $40 \times 0,82 = 33$ ml laimennusliuosta. Tällöin vesifaasin tilavuus vastaa alkuperäistä laimentamatonta näytettä eli 1 ml = 1 g.

Laita pullo 45 °C vesihauteeseen, kunnes näyte on kokonaan sulanut, enintään 20 minuutiksi.

Sekoita ravistelijassa 2-5 minuuttia, kunnes saadaan homogeeninen emulsio.

Laita pullo seisomaan huoneenlämpöön, jotta rasva- ja vesikerros erottuvat kunnolla. Tee jatkolaimennos vesifaasista suhteessa 1+9.

15.7 Kuivatut tuotteet

Tähän ryhmään kuuluvat seuraavat tuotteet:

- kuivattu liha ja kasvikset; kuivatut keitto- ja kastikeaineet,
- jauhemaiset juomat: tee, kaakao ja suklaapohjaiset tuotteet, kahvi ja kuivattu hedelmämehu
- raaka selluloosa, liukeneva selluloosa, dekstriinit, sorbitoli, sokerit, glukoosi, glutamaatti
- yrtit, mausteet, maku- ja väriaineet
- polysakkaridipohjaiset hyytelöimisaineet, kumi jne.
- kookos, hiiva-uute, suklaakonvehdit (patukat tai makeiset), kuivattu kananmuna tai kananmunanvalkuainen

Sekoita jauhemaiset tuotteet ravistelemalla pakkausta. Riko tai leikkaa muut tuotteet pienemmiksi osiksi steriileillä välineillä ennen näytteenottoa.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

15.7.1 Jauhemaiset, täysin liukenevat

Punnitse 1 osa näytettä ja lisää 9 osaa laimennusliuosta (8.1) Stomacher-pussiin. Ei tarvita mekaanista homogenointia.

15.7.2 Muut ei-jauhemaiset tuotteet

Punnitse 1 osa näytettä ja lisää 9 osaa laimennusliuosta (8.1) Stomacher-pussiin. Homogenoi Stomacherilla.

15.7.3 Vedessä turpoavat tuotteet

Punnitse näyte ja lisää laimennusliuosta esim. 1:20, 1:50 tai 1:100, jotta saadaan käyttökelpoinen laimennos.

Jos pienet mikrobipitoisuudet ovat todennäköisiä, viljele ensilaimennoksesta useampia maljoja rinnakkain, jotta määritysraja saadaan alhaisemmaksi.

Joidenkin näytteiden liukenemista voidaan edistää lisäämällä entsyymiliuosta puskuroituun peptoniveteen (8.7), esim. gamanaasientsyymiä carob- ja guar-pohjaisiin tuotteisiin tai sellulaasientsyymiä karboksimeetyyliselluloosalle.

15.7.4 Antimikrobisia aineita sisältävät ruokamatriisit

Tietyt elintarvikkeiden lisäaineet, esim. mausteet, sisältävät inhiboivia yhdisteitä. Tällaisia lisäaineita ovat mm. sipulijauhe, valkosipuli, oregano, pippurit, tietyt teet ja kahvit.

Tee antimikrobisen aktiivisuuden vähentämiseksi suuremmat laimennokset, esim. 1:100 kanelille ja oreganolle ja 1:1000 neilikalle, tai vaihtoehtoisesti lisää K_2SO_4 puskuroituun peptoniveteen (8.7) niin, että sen lopullinen pitoisuus on 0,5%.

15.7.5 Suklaa ja suklaakonvehdit

Esilämmitä laimennusliuos vesihauteessa 40 °C:ssa.

Punnitse näyte laimennusliuokseen ja sekoita välittömästi.

Jätä huoneenlämpöön liukenemaan 20-30 min ja sen jälkeen homogenoi Stomacherilla.

15.8 Kananmunat ja -tuotteet

15.8.1 Kokonaiset kananmunat

Mikrobiologiseen analyysiin käytettävissä kananmunissa ei saa olla näkyviä halkeamia. Kananmunat voidaan tutkia yksittäin tai useamman munan yhdistelmänäytteenä. Tutkittavien munien kuori voidaan puhdistaa ja steriloida ennen tutkimusta tai munat voidaan tutkia puhdistamatta ja steriloida.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Haluttaessa tutkia ainoastaan kananmunan sisustaa on kuori aina steriloitava. Tutkittaessa patogeeneja, jotka voivat olla myös kuoren ulkopuolella, esim. salmonellat, ei kuoren sterilointi ole aina tarpeen.

Tutkimusvaihtoehtoista on sovittava tutkimuksen tilaajan kanssa.

15.8.2 Kuoren desinfiointi

Poista lika ja ulosteet kostealla paperilla tai pumpulilla ja kuivaa.

Käytä steriilejä käsineitä ja pyyhi kananmunan koko pinta 70% metyloituun teollisuusviinaan tai isopropanoliin kostutetulla liinalla.

Anna kanamunien kuivua täysin. Vältä kontaminoimasta kuoria.

15.8.3 Kuoren kokonaismikrobipitoisuus

Tutkittaessa kuoren kokonaismikrobipitoisuutta on munaa aina käsiteltävä aseptisesti.

15.8.4 Kuoren huuhtelumenetelmä

Huuhtele kananmunaa useita kertoja käännellen rikkomatta sitä. Käytä huuhteluun mahdollisimman pieni tunnettu tilavuus laimennusliuosta (8.1). Astiaan kerätty kuoren huuhteluneste on näytteen ensilaimennos.

Kokonainen kananmuna voidaan myös laittaa Stomacher-pussiin, jossa on tunnettu tilavuus laimennusliuosta ja huuhdella kuorta pussia käännellen. Poista lopuksi kananmuna.

15.8.5 Kuoren hankausmenetelmä

Hankaa kananmunan kuori huolellisesti steriilillä sideharsolla/liinalla, joka on kostutettu laimennusveteen tai kasvatusliemeen.

Laita sideharso tunnettuun tilavuuteen laimennusliuosta tai kasvatuslientä analyysiä varten.

15.8.6 Kuoren liotusmenetelmä

Riko kananmuna. Laita kuoret Stomacher-pussiin, jossa on tarvittava määrä laimennusvettä tai kasvatuslientä. Murskaa kuori pussiin ja käytä syntyvä suspensio.

15.8.7 Sisällön kokonaismikrobipitoisuus

Käytä steriilejä käsineitä ja riko/avaa kananmunan kuori aseptisesti.



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Jos keltuainen ja valkuainen analysoidaan erikseen, erota ne laittamalla erillisiin steriileihin astioihin/Stomacher-pusseihin.

Lisää keltuaisen joukkoon laimennusliuosta (8.1) suhteessa 1+9 ja valkuaisen joukkoon suhteessa 1+39, jolloin luonnollisesti esiintyvä lysotsyymi-inhibiittori laimenee.

Jos analyysi tehdään koko kananmunan sisällöstä, laita se suoraan steriiliin astiaan, jossa on 180 ml puskuroitua peptonivettä (8.7) tai sopivaa rikastuslientä.

15.8.8 Kananmunamassa, valkuaisia ja/tai keltuaisia (pastöroidut/pastöroimattomat)

Laimenna munamassa suhteessa 1+9 puskuroituun peptoniveteen (8.7).

Käytä valkuaiselle puskuroitua peptonivettä (8.7) suhteessa 1+39, jolloin luonnollisesti esiintyvän lysotsyymien inhibiatiovaikutus vähenee.

15.8.9 Kuivattu kananmuna tai valkuainen

Käsittele kuten kuivatut tuotteet ks. kohta 15.7

15.8.10 Kokonaismikrobipitoisuus (kuori + sisus)

Riko aseptisesti kananmunan kuori ja laita kuori ja sisus Stomacher-pussiin. Homogenoi ravistelemalla ja murskaamalla. Punnitse tarvittava määrä seosta ensilaimennoksen tekoon.

15.9 Fermentoidut tuotteet (sis. eläviä mikrobeja)

Probioottiset tuotteet eivät kuulu tähän ryhmään. Tarkoitus on tutkia tuotteessa olevia vieraita mikrobeja, joita ei ole käytetty tuotteen fermentoinnissa.

Laimennosten tekoon käytetään laimennusliuosta, jossa on bromikresolipurppuraa (8.8). Kun suspension indikaattorin väri muuttuu, lisää 1 M NaOH-liuosta (8.11) pH:n neutraloimiseksi, (pH 7,0 ± 0,2, 25° C). Neutraali liuos on violettiä.

Jos fermentoinnissa on käytetty hiivaa, voidaan kasvatusalustaan lisätä antifungisidisia yhdisteitä (esim. sykloheksimidiä 50 mg/kg tai nystatiinia 50 mg/kg tai amfoterisiinia 10 mg/kg).

Muissa tapauksissa on suositeltavaa lisätä kasvualustaan antibiootteja tuotteen fermentoinnissa käytettyjen mikrobien kasvun estämiseksi. Käytetty antibiootti ja sen pitoisuus on mainittava tulosraportissa.

15.10 Leivonnaiset



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Leivonnaiset ja kakut ovat yleensä makeita ja valmistettu jauhosta, voista, kananmunista ja muista aineksista kuten maito- tai hedelmätuotteista.

Pakattujen esipaistettujen tuotteiden pehmeät pakkaukset avataan saksilla tai veitsellä aseptisesti. Kovat pakkaukset, kuten lasiastiat, desinfioidaan ensin ulkopuolelta esim. etanolilla ja avataan steriilisti kontaminoimatta tuotetta.

Ota näytteeseen osia joka komponentista ottaen huomioon niiden suhteet tuotteessa. Koko tutkittavaksi tarkoitettu näyte voidaan myös ensin homogenoida ja sitten ottaa näyte tästä seoksesta.

Keksit käsitellään kuten kuivatut tuotteet (ks. kohta 15.7)

16 Menetelmän status

- | | |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|
| Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Virallinen menetelmä | <input type="checkbox"/> |
| Sisäinen menetelmä | <input type="checkbox"/> |

17 Laadunvarmistusmenetelmät

- | | |
|---------------------------------------------|--------------------------|
| Laboratorioiden väliset vertailututkimukset | <input type="checkbox"/> |
| Menetelmävertailut | <input type="checkbox"/> |
| Vertailukantojen/kontrollikantojen käyttö | <input type="checkbox"/> |
| Siirrostetut näytteet | <input type="checkbox"/> |
| Rinnakkaismääritykset | <input type="checkbox"/> |
| Valvontakortit | <input type="checkbox"/> |

18 Viitteet

*) ISO 8261/ IDF 122: 2001. Milk and milk products- General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination

*) ISO 6887, Parts 1-4. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination

Part 1, 1999: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution

Part 2, 2003: Specific rules for the preparation of meat and meat products



Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten

Part 3; 2003: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

Part 4, 2003: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products

*) Kopio alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä huoneessa B214 (Evira, Helsinki)

19 Muutokset edelliseen versioon

Ylätunnisteeseen vaihdettu yksikön uusi nimi sekä numerointi muutettu nykyisen käytännön mukaiseksi. Tekninen päivitys

Tämän ohjeen laadinta: Johansson Tuula, Nuppunen Maija, Teresa Skrzypczak

4.9.2018 Siirryttäessä IMS toimintajärjestelmään, versiointi aloitettu alusta (v1).

Tekninen päivitys

1.1.2019 Organisaatiomuutoksen mukaiset ylätunnistetiedot. Tekninen päivitys.