

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Salmonella. Detektion i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover.

Del A. Livsmedel

Del B. Foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover.

1 Metodreferenser och avvikelser

ISO 6579:2002 (E) och ISO 6579:2002/Cor.1:2004(E).

(Buffrat 1 % peptonvatten (BPW) eller steriliserat destillerat vatten + briljantgrönt eller skummad mjölk- näringsbuljong eller buffrat 1 % peptonvatten (+ Triton X-100) / 37 °C / 16-30h, RVS 41,5 °C / 18-27 h och MKTTn 37,0 °C / 18-27 h, XLD- och Rambach-agar 37 °C / 18-27 h, alternativt L-lysindekarboxylasbuljong, Urea- och TSI-agar, alternativt Brofacin-agar 37 °C / 18-27 h, alternativt biokemiska och serologiska konfirmeringstest, alternativt Maldi-tof, serotypning)

Vad gäller livsmedelsundersökningar beskrivs avvikelserna från referensmetoden i **Del A**.

Avvikelserna från referensmetoden för foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover beskrivs i **Del B**.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metoden är avsedd för detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover.

3 Definition(er)

Salmonella är gramnegativa, fakultativt anaeroba stavbakterier som hör till familjen *Enterobacteriaceae*. Släktet *Salmonella* indelas numera i två arter, *S. enterica* och *S. bongori*, och arten *S. enterica* i sin tur i sex underarter (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* och *indica*). Man känner till fler än 2500 serotyper av salmonella. Salmonella uppkallas av tradition enligt serotypen, t.ex. *S. Typhimurium*. Ett exaktare namn för denna typ är *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium.

Salmonella orsakar olika slags tarminfektioner och allmänna infektioner hos såväl människor som djur.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

4 Princip

Metoden för detektion av salmonella indelas i fyra skeden:

Preanrikning. En känd provmängd preanrikas i icke-selektivt medium (BPW). Preanrikning är nödvändig, eftersom salmonellacellerna i proverna kan vara stressade eller skadade, t.ex. på grund av upphettnings- eller s.k. syrabehandling (foder), torkning, djupfrysning, upptining och/eller osmotisk chock. Därtill är koncentrationen av salmonella i provet i allmänhet låg.

Anrikning. En känd mängd preanrikat prov överförs till selektiva anrikningsbuljonger (RVS och MKTTn). Selektiv anrikning är nödvändig, eftersom proverna kan innehålla rikligt med exempelvis andra enterobakterier som försvårar detektionen av salmonella.

Odling på platta. En liten mängd selektiv anrikning breddas ut på fasta selektiva medier (XLD och Rambach), på vilka salmonella kan särskiljas från den övriga tillväxten på basis av typiska kolonier.

Konfirmering. Kolonier som misstänks vara salmonella konfirmeras

a) med Maldi-tof

b) biokemiskt (urea- och TSI-agar och alternativt L-lysindekarboxylasbuljong). Ytterligare konfirmeringar görs serologiskt (omnivalent eller polyvalenta antiserum) och/eller biokemiskt (kommersiell testserie för identifiering, API, och vid behov därtill OBIS).

Odlingar som misstänkts vara salmonella och har konfirmerats sänds till Eviras forskningsenhet för djursjukdomsbakteriologi i Kuopio för serotypning.

5 Eventuella felkällor

Bakgrundsfloran hos i synnerhet organiska gödselselfabrikat och vissa foderråvaror kan försvåra identifiering och isolering av salmonellakolonier.

Salmonella kan vara svår att detektera om provet har förvarats längre i värme före undersökningen (om t.ex. transporttemperaturen har stigit) och/eller om det tagit flera dagar för provet att nå fram till laboratoriet.

Korskontaminering mellan proverna eller med laboratoriets kontrollstam är möjlig. Ett felaktigt positivt resultat kan leda till mycket stora ekonomiska förluster och därför måste man vara särskilt uppmärksam på att laboratoriearbetet utförs omsorgsfullt och adekvat utrustning används.

6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 223 om arbetssäkerhet.

Då det gäller arbetssäkerheten bör beaktas att det är möjligt att detektera en del av stammarna *Salmonella* Typhi och Paratyphi med denna metod. De förekommer ändå mycket sällan, åtminstone i livsmedel.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

För fosfinbehandlade foderprover används andningsskydd med filter som leder in frisk luft samt handskar. Proverna hanteras i dragskåp. Inkubering av proverna är endast tillåten i fosfinlaboratoriets odlingsskåp. Andras tillträde till lokalerna ska förhindras genom en varningsskylt på dörren.

Andningsskydd och handskar ska användas vid uppvägning av enzympreparat, proverna ska vara de sista som vägs upp under arbetsdagen.

Skyddsglas ska användas vid sönderdelning av tuggben och andra hårda prover.

Matrisen för Maldi-tof innehåller acetonitril, arbeta i dragskåp.

7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Värmeskåp 37 ± 1 °C
- 3) Vattenbad eller värmeskåp $41,5 \pm 1$ °C
- 4) Maldi-tof Biotyper, Bruker

8 Substrat och reagenser

- 1) Buffrat 1 % peptonvatten (BPW) (+ Triton X) eller sterilt destillerat vatten + briljantgrönt eller skummad mjölk-näringsbuljong
- 2) Rappaport-Vassiliadis-sojapepton (RVS) anrikningsbuljong
- 3) Müller Kauffmann tetrationsat-novobiocinbuljong (MKTTn)
- 4) Xylos-lysin-deoxycholat-agar (XLD)
- 5) Rambach-agar
- 6) Brolacin-agar
- 7) Triple sugar iron agar (TSI)
- 8) Urea-agar
- 9) L-lysindekarboxylasbuljong
- 10) OBIS-test, Oxoid
- 11) O-antiserum, omnivalent, Mast Group
- 12) API 20E eller API Rapid 20E, BioMérieux
- 13) HCCA dosförpackad (cyano-4-hydroxikanelnsyra), Bruker Daltonik GmbH
- 14) Ultrarent vatten
- 15) Dejoniserat, sterilt vatten
- 16) Acetonitril
- 17) Etanol 99,6 %
- 18) 70 % FA (myrsyra)
- 19) Standard (Bruker Bacterial Test Standard, BTS)

9 Kontrollstammar

Som kontrollstam används den i Finland sällsynta serotypen *Salmonella* Abony EELA 519 (NCTC 6017) för att upptäcka eventuella korskontamineringar. På grund av risken för korskontaminering rekommenderas att kontrollstammar inte används rutinmässigt jämsides med proverna.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödsel­fabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Del A. Livsmedel

Avvikelser från referensmetoden

- 1) Typiska kolonier odlas inte till renodlingar på näringsagar för konfirmeringstester utan direkt på TSI- och urea-agar, L-lysindekarboxylasbuljong och Bro­lacin-agar, ifall kolonierna växer isolerat.
- 2) Vid ympning av RVS- och MKTTn-anrikningar på XLD- och Rambach-agar odlas en "kontrollskål" endast om matrisen/handlaget är sådant att det inte går att få isolerade kolonier.
- 3) Urea- och TSI-rör samt testserien API kan ersättas med Maldi-tof analys.

10 Förbehandling av prov

Proverna behöver i allmänhet ingen särskild förbehandling.

11 Utförande

Undersökningen av livsmedelsprover inleds helst samma dag de anländer. Om proverna inte kan undersökas genast eller om undersökningen kan utföras vid en senare tidpunkt, förvaras proverna i enlighet med enheternas instruktioner. Om ett prov måste ratas, är det den ansvariga forskaren som fattar detta beslut.

11.1 Provtagning för preanrikning

Buffrat peptonvatten (BPW) ska vara rumstempererat innan provet ympas i det.

Provmängden som ska undersökas är i allmänhet 25 g och preanrikningsbuljongens (oftast buffrat peptonvatten) volym 225 ml (utspädningsförhållande 1:10).

Om provmängden är en annan än ovan nämnda ska preanrikningsbuljongens volym väljas så, att förhållandet mellan provmängden och preanrikningsbuljongens volym är 1:9 (dvs. provet späds ut i förhållandet 1:10 = en del prov + nio delar preanrikningsbuljong).

Provet blandas väl och 25 g av provet vägs upp i ett sterilt kärl, i vilket sätts 225 ml buffrat peptonvatten (BPW). Provet kan också vägas upp direkt i en skål med färdigt doserad preanrikningsbuljong.

Ett flytande prov blandas i anrikningsbuljongen genom att det skakas om, ett fast prov homogeniseras.

11.1.1 Rått fjäderfäkött

Om en djupfryst kropp ska undersökas, tas den ur förpackningen och sätts aseptiskt i en Stomacher 3500 påse. Låt kroppen tina i kylskåp i högst ett dygn. Om du undersöker färska, styckade kroppsdelar, ska du väga upp den bestämda mängden (i allmän-

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

het cirka 500 g) i en Stomacher 3500 påse. Sätt 225 ml buffrat peptonvatten i påsen. Skaka kraftigt i tre minuter så, att peptonvattnet sköljer hela kroppen eller de styckade kroppsdelarna. Lyft provet ur påsen. Inkubera hela vätskemängden eller dekantera en lämplig mängd (minst 100 ml) i en steril skål för förinkubation.

11.1.2 Annat rått helt kött

Skär totalt 25 g prov av köttets yta på flera ställen, och sätt det i 225 ml buffrat peptonvatten. Blanda genom att skaka om provkärlet eller Stomacher-påsen lätt. Om ett djupfrost prov ska undersökas, kan det antingen tinas upp i kylskåp i högst ett dygn eller så kan man ta ett prov medan det ännu är fruset om undersökningen är brådskande.

11.1.3 Torrmjölsprodukter

Väg upp 25 g prov i 225 ml buffrat peptonvatten. Blanda inte, utan låt skålen stå i rumsvärme i 60 ±10 min. Skaka därefter om skålen så att provet upplöses helt.

11.1.4 Örter, kryddor och livsmedel som innehåller kraftigt svällande substanser

I stället för det normala utspädningsförhållandet 1:10 kan man använda t.ex. utspädningsförhållande 1:100, för att kunna eliminera effekten av komponenter som förhindrar tillväxt och kunna homogenisera provet väl.

11.1.5 Kasein, ost

Väg upp 25 g prov i en Stomacher-påse. Sätt en del av det i förväg uppvärmda (cirka 40 °C) buffrade peptonvattnet (225 ml) i påsen. Blanda med en Stomacher homogenisator, tills provet är upplöst (1 - 3 minuter). Håll blandningen tillbaka i preanrikningsskålen eller sätt resten av det buffrade peptonvattnet i en Stomacher-påse.

11.1.6 Smör, margariner, oljor, glass, parfait

Väg upp 25 g prov i uppvärmt buffrat peptonvatten (cirka 40 °C). Skaka om. Sätt i värmeskåp (37 °C) och skaka om efter en timme.

11.1.7 Produkter som innehåller kakao

Blanda ett prov på 25 g i 225 ml skummad mjölk-näringsbuljong. Om du undersöker choklad, värm upp buljongen i förväg till cirka 40 °C.

11.1.8 Kokos och liknande produkter med mycket hög fetthalt

Bland ett prov på 25 g i 225 ml buffrat peptonvatten. Tillsätt 2-3 droppar Triton X-100, som minskar på ytspänningen som feta produkter åstadkommer på preanrikningssbuljong.

11.1.9 Sura produkter

Kontrollera att pH inte sjunker under 4,5 under preanrikningen.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

11.2 Preanrikning

Inkubera preanrikningsbuljonger för livsmedel i 37 ± 1 °C / 16–20 h.

Efter inkuberingen kan preanrikningen förvaras i kylskåp (2–8 °C) i högst 72 timmar, om det inte är möjligt att fortsätta med anrikningen omedelbart (Nilsson och Peterz, 1992).

11.3 Anrikning

11.3.1 RVS

Värm upp anrikningsbuljongen (RVS) till inkuberingstemperatur före ympningen. Om preanrikningen har förvarats i kylskåp (t.ex. över veckoslutet), ska den inkuberas i 37 ± 1 °C / 2 h före ympningen i anrikningsbuljong för att undvika stora temperaturvariationer.

Ympa 0,1 ml av BPW-preanrikningen, utan att blanda den, nära ytan i 10 ml MKTTn-buljong.

Blanda RVS-buljongen med provrörsblandare efter ympningen. Inkubera i värmeskåp i $41,5 \pm 0,5$ °C / 24 ± 3 h.

Efter inkuberingen kan RVS-anrikningen förvaras i kylskåp (2–8 °C) i högst 72 timmar, om man inte kan odla omedelbart på plattor (D'Aoust et al., 1983; Nilsson och Peterz, 1992).

11.3.2 MKTTn

Värm upp anrikningsbuljongen (MKTTn) till inkuberingstemperatur före ympningen. Ympa 1 ml av BPW-preanrikningen, utan att blanda den, nära ytan i 10 ml MKTTn-buljong.

Blanda MKTTn-buljongen med provrörsblandare efter ympningen. Inkubera i värmeskåp i $37,0 \pm 1$ °C / 24 ± 3 h.

Efter inkuberingen kan MKTTn-anrikningen förvaras i kylskåp (2–8 °C) i högst 72 timmar, om man inte kan odla omedelbart på plattor (D'Aoust et al., 1983; Nilsson och Peterz, 1992).

11.4 Odling på agarplattor

Blanda RVS- och MKTTn-anrikningarna. Ympa en ögla (10 µl) på XLD- och Rambach-agar som utspridd odling på så sätt, att isolerade kolonier bildas. Ympningen kan alternativt göras utan att blanda anrikningen, nära anrikningens yta.

För att få fram tydligt skilda kolonier kan anrikningarna odlas på två små XLD- och Rambach-plattor efter varandra. Den senare plattan är en s.k. "kontrollplatta" som odlas med samma ögla som användes till att odla den första plattans sista sektor, utan att våta ögla på nytt i anrikningen. Nödvändigheten av att odla en "kontrollplatta" bedöms enligt matrisen och handlaget hos den som utför ympningen.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödsel-fabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

RVS- och MKTTn-anrikningar som har kylförvarats odlas på plattor på samma sätt som anrikningar som har tagits direkt ur värmeskåpet.

Selektiva plattor som odlas dagen före ett veckoslut eller en helgdag, kan förvaras odlade i kylskåp (2–8 °C) i högst 48 timmar och därefter sätts i värmeskåp om man vill avläsa dem färska därpå följande arbetsdag.

Inkubera XLD- och Rambach-plattorna i 37 ± 1 °C / 21–27 h. Inkuberade plattor kan förvaras i kylskåp i 1–3 dygn innan de avläses.

11.5 Avläsning av plattorna

11.5.1 XLD

En typisk salmonellakoloni är rödaktig, rätt genomskinlig och har ett svart centrum. Nästan alltid (i synnerhet i samband med kraftig salmonellatillväxt) ses en bredare eller smalare ljusröd eller röd zon i substratet som omger kolonierna. Svavelvätenegativa salmonellabakterier (t.ex. *S. Paratyphi* A) växer som rödaktiga/ljusröda kolonier med ett mörkare centrum som skiftar från ljusrött till orange. Laktospositiva salmonellabakterier är gula och kan ha ett svart centrum (svavelvätepositiva). Både svavelvätenegativa och laktospositiva stammar är sällsynta.

11.5.2 Rambach

97–99 % av salmonellabakterierna växer som klarröda kolonier på Rambach-agar. *S. Typhi* och *S. Paratyphi* bildar dock färglösa kolonier.

12 Konfirmeringsförfaranden

Typiska/misstänkta kolonier konfirmeras biokemiskt (TSI- och urea-agar samt L-lysindekarboxylasbuljong). Ytterligare konfirmeringar görs serologiskt (omnivalent eller polyvalenta antiserum) eller med en kommersiell testserie för identifiering (t.ex. API 20 E eller API Rapid 20 E).

Ovan nämnda biokemiska och serologiska konfirmeringar kan ersättas med Maldi-tof konfirmeringsmetod.

Den slutliga konfirmeringen och serotypningen utförs i överensstämmelse med metodbeskrivning Evira 6004 vid Eviras forskningsenhet i Kuopio.

Gör konfirmeringarna antingen enligt punkt 12.1 eller 12.2.

12.1 Körning av Maldi-tof

Konfirmera kolonierna genom en direkt ympning enligt arbetsbeskrivning LAB 7085 som körs som tre parallella provpunkter i Maldi-tof.

Score-värdena beaktas vid bedömningen av resultatets pålitlighet. Av resultaten granskas både bästa identifiering (best match) och nästbästa identifiering (second

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

best match). Stammen sänds till Eviras enhet i Kuopio för serotypning om en av identifieringarna ger resultatet "*Salmonella sp*" med ett score-värde om minst 1,700 (grön eller gul färgkod).

Om resultatet för **alla** provpunkter visar "**no peaks found**", ska du göra en snabb extraktion för stammen på Mald-di-plattans provpunkter: bakteriemassa + 1 ul 70 % FA -> torkning + 1 ul matris. Om även detta resultat visar "no peaks found" är stammen inte salmonella.

Körningen kan ge resultatet "**not reliable identification**". Score-värdet är då lågt, mellan 0,000–1,699 och identifikationen lyckas inte. Detta kan bero på två orsaker. Spektrumet är läsbart, men det finns ingen tillräcklig motsvarighet i biblioteket. Det är också möjligt att provpunkten är av dålig teknisk kvalitet.

Om resultatet är "**not reliable identification**" **antingen** i kolumnen för best match **eller** i kolumnen för second best match, ska man se på rankingslistan med topp tio för provpunkten. Om *salmonella sp.* finns på listan ska en snabbextraktion göras för stammen (på provpunkten bakteriemassa + 1 ul 70 % FA -> torkning + 1 ul matris) eller konfirmeringstester i enlighet med ISO 6579.

Om resultatet fortfarande visar "**not reliable identification**" men salmonella inte finns på rankingslistan (topp tio) är stammen inte salmonella. Om salmonella fortfarande finns kvar på listan, tolkas stammen som misstänkt salmonella och en ytterligare konfirmering ska göras genom serotypning. Konfirmeringsförfarandet kan enligt övervägande kompletteras före serotypningen genom konfirmeringar enligt ISO 6579, t.ex. med Omnivalent eller OBIS-test.

Ympa kolonin som enligt körningen av Mald-di-tof misstänktes vara salmonella på en selektiv platta och sänd den till serotypning.

12.2

Som alternativ till Mald-di-tof, konfirmera eventuella salmonellakolonier genom att testa dem biokemiskt i rör med urea- och TSI-agar samt i L-lysindekarboxylasbuljong, dra en "kontrollplatta" på selektiv agar för att kontrollera odlingens renhet. Gör sedan en serologisk konfirmering med omnivalent serum och vid behov en biokemisk konfirmering med OBIS-test. Om omnivalent orsakar utfällning, utför API 20E på kolonin.

Urea- och TSI-agar, L-lysindekarboxylasbuljong och selektiv platta

Välj, av både XLD- och Rambach-plattorna, en typisk eller misstänkt koloni som växer isolerat för fortsatta undersökningar. Om det visar sig att de valda kolonierna inte är salmonella, plocka ytterligare fyra kolonier för fortsatta undersökningar.

Om du på plattan kan urskilja typiska eller misstänkta kolonier som inte växer isolerat, fortsatt odla kolonier på selektiv agar så, att du får isolerade kolonier. Gör konfirmeringstest för de isolerade kolonierna.

Odla av samma isolerade koloni (t.ex. med 1 µl ögla) först på urea-agar som ytstryk och på TSI-agar som ytstryk och som "stick", sedan i lysindekarboxylasbuljong och till sist på Brolacin-agar eller XLD- eller Rambach-agar som utspridd odling. Med Brolacin-agar får man ett snabbare resultat av serotypningen. Lysindekarboxylasbuljong övertäcks med

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

steril mineral- eller paraffinolja efter odlingen. Märk! Kolonin vidrörs endast en gång, inte efter varje medium som ska odlas. Inkubera i 37 ± 1 °C / 24 ± 3 h.

Urea-agar

Salmonella hydrolyserar inte urea utan mediet förblir gult.

TSI-agar

Salmonella producerar syra (100 %) och gas (92 %) av glukos, men producerar inte syra av laktos (99 %) och inte heller av sackaros (99 %), och reducerar sulfat till sulfid (92 %), som fälls ut på substratet som svart järnsulfid. Därmed ändrar den TSI-agens färg till röd (yta) -svart (mellersta delen) -gul (botten) eller röd (yta) svart (botten) (kraftig bildning av järnsulfid). Även då kan i allmänhet den gula färgen urskiljas på rörets botten och/eller i den mellersta delen då man ser mot ljuset. Gasbildning observeras i form av sprickor eller luftbubblor i agarn.

Stammar som inte reducerar sulfat till sulfid bildar ingen svart färg på TSI-agar. Sådana stammar är sällsynta (8 %) och de ska kontrolleras noggrannare biokemiskt, t.ex. med hjälp av kommersiellt tillgängliga testserier, liksom även laktos- och/eller sackarospositiva (1 %) stammar, som ändrar hela TSI-agens färg till gul (t.ex. 26–75 % av S.Arizona-stammarna är laktospositiva).

Tolkning av reaktioner i **TSI**-rör:

Stick:

- | | |
|------------------------------|--|
| - gul | glukospositiv (använder glukos -> producerar syra) |
| - röd eller oförändrad | glukosnegativ (använder inte glukos) |
| - svart | produktion av svavelväte |
| - luftbubblor eller sprickor | gasproduktion av glukos |

Lutande yta:

- | | |
|------------------------|---|
| - gul | laktos- och/eller sackarospositiv (använder laktos och/eller sackaros -> producerar syra) |
| - röd eller oförändrad | laktos- och sackarosnegativ (använder varken laktos eller sackaros) |

En typisk salmonellayta har en alkalisk (röd) lutande yta. Gasbildning kan detekteras i röret. Rörets nedre del är sur (gul) och bildningen av järnsulfid ses i form av en ring som svartfärgas kring sticket (i cirka 90 % av fallen). En kraftig bildning av järnsulfid kan svartfärga rörets hela nedre del.

Lysin-dekarboxylasbuljong

Salmonella dekarboxylerar lysin, varför grumlighet och bibehållande av buljongens purröda färg i lysin-dekarboxylasbuljong är ett tecken på en positiv reaktion. Om buljongens färg ändras till gul påvisar detta ett negativt resultat (lysinet har inte brutits ner).

Selektiv platta

Kontrollera odlingarnas renhet. Salmonella växer som genomskinliga gråaktiga kolonier på **Brolacin**-agar då substratets färg ändras från blågrön till blå (laktosnegativ). Laktospositiva salmonellabakterier och andra laktospositiva bakterier ändrar substratets färg till gul. Om odlingarna inte är rena utan bildar typiska isolerade kolonier, välj en typisk koloni av varje och odla den vidare på TSI- och urea-agar, i L-lysin-dekarboxylasbuljong och på Brolacin-agar.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Ytterligare konfirmeringar

Gör en ytterligare konfirmering av en typisk renkultur antingen serologiskt eller bioke-miskt med en kommersiellt tillgänglig testserie för identifiering.

Gör som serologisk konfirmering ett agglutinationstest med omnivalent antiserum eller polyvalenta antiserum i enlighet med tillverkarens anvisningar. Kontrollera att den stam som undersöks inte autoagglutinerar (= faller ut i NaCl-lösning). Om stammen auto-agglutinerar går det inte att påvisa antigener.

Gör den biokemiska konfirmeringen med testet API 20 E enligt tillverkarens anvisningar.

12.3 Serotypning

Isolerade stammar som misstänks vara salmonella sänds i Brolacin- eller XLD- eller Rambach-agar för serotypning till Eviras laborariesektion i Kuopio.

Serotypningen utförs i överensstämmelse med Kauffmann-White-systemet (Metodbe-skrivning Evira 6004) vid laborariesektionen i Kuopio.

13 Resultat

Laborariesektionen i Kuopio ger resultatet av serotypningen som ett internt svar till laboratoriernas datasystem.

Kuopio laborariesektion ger resultaten av fagtypningen som externt tilläggsvar.

Undersökningsresultaten meddelas enligt följande:

”Salmonella konstaterades inte/konstaterades/25 g eller ml av provet eller undersökt provmängd eller yta. Innan resultatet av serotypningen är klart, meddelar laboratoriet resultatet som misstänkt salmonella.

Dessutom meddelas om undersökning av proverna som ett samlingsprov. Serotypen anges i det slutliga svaret.

14 Validering av metoden

Man har lång och gedigen erfarenhet av ISO 6579-metoden. Metoden användes redan på 1980-talet. Under de senaste 15 åren har dock NMKL 71-metoden använts i första hand, eftersom den är godkänd bland annat för undersökning av prover inom ramen för det nationella programmet för salmonellakontroll. NMKL-metoden använder endast en selektiv anrikningsbuljong (RVS), men metodens sensitivitet motsvarar ISO-metodens. ISO 6579:2002 har validerats genom kollaborativ undersökning (Feldsine, P. et al., 2003). Resultaten av valideringarna presenteras i referensmetoden.

Metoden har använts som referensmetod vid validering av MRSV-metoden för malet kött av nöt på åtgärd av gemenskapens salmonellalaboratorium. Valideringsresultaten presenteras i valideringsrapport Evira 6002 (Kuronen, H., 2007).

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Körning av Maldi-tof som alternativt konfirmeringsförfarande validerades år 2014 för tagande i bruk vid sektionen för foder- och gödslingsmedel.

15 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Metoden ingår i en internationell metodsamling	<input type="checkbox"/>
Officiell metod (om konfirmering inte görs med Maldi-tof)	<input checked="" type="checkbox"/>
Referensmetod (om konfirmering inte görs med Maldi-tof).	<input checked="" type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

16 Metoder för kvalitetssäkring

Laboratoriernas inbördes jämförande undersökningar	<input checked="" type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input checked="" type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar	<input type="checkbox"/>
Ympade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>

17 Referenser

*)ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

*) ISO 6579:2002. Technical corrigendum 1, published 2004-04-01

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

D'Acoust, J.-Y., H.J. Beckers, M. Boothroyd, A. Mates, C.R. McKee, A.B. Moran, P. Sado, G.E. Spain, W.H. Sperber, P. Vassiliadis, D.E. Wagner, and C. Wiberg. (1983) ICMSF Methods Studies. XIV. Comparative study on recovery of *Salmonella* from refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. J. Food Prot. 46:391-399.

Feldsine, P., Lienau, A.H, Leun, S.C, Mui, L.A, Humbert, F, Bohnert, M, Mooijman, K, Schulten, S, Veld, P, Rollier, P, Leuschner, R, Capps, K. (2003) Recovery of *Salmonella* in selected foods by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC International Official Method of Analysis: Collaborative Study. J. AOAC Int. 86:275-294.

Kuronen, H. Validointiraportti 6002, 16.02.2007 MSRV–menetelmän (Evira 6002) toimivuus tutkittaessa salmonellaa uloste-, pöly- ja jauhelihanäytteistä.

Nilsson, A.-C. and Peterz, M. (1992) Collaborative study on recovery of *Salmonella* from refrigerated pre-enrichment and Rappaport-Vassiliadis broth cultures. Proceedings. Posters. *Salmonella* and salmonellosis. September 15-17, 1992. Ploufragan/Saint-Brieuc, France.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödsel­fabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

WHO Collaborative Centre for Reference and Research of *Salmonella* (Institut Pasteur-Paris): Kauffmann-White Scheme supplemented by the formulae approved up to 31st dec. 1983.

Wiberg, C. (1997) Collaborative study of *Salmonella* methods: Revised NMKL no 71 and ISO 6579:1993. Biology Division, National Food Administration, Uppsala, Sweden.

*) Bilaga till den ursprungliga metodbeskrivningen

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödsel­fabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Del B. Foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödsel­fabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover

Metoden är lämpad för detektion av salmonella i foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödsel­fabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover.

Genom att förlänga tiden för preanrikning av vissa provtyper (upphettade, syrabehandlade, torkade etc.) har metoden i synnerhet anpassats för detektion av låga koncentrationer av stressade salmonellaceller. Av proverna odlas parallella plattor för att öka metodens känslighet. Antalet kolonier som plockas för ytterligare konfirmeringar har höjts och för dessa väljs även icke-typiska kolonier för detektering av mera ovanliga serotyper.

Avvikelser från referensmetoden

- 1) Preanrikningstid 20-24 h eller 24-30 h i stället för 16-20 h (pelleterade, upphett­nings- och syrabehandlade foderprover, tuggben samt torkade öron etc.). Anrikningstid 18-24 h i stället för 21-27 h. Inkuberingstid 18-24 h i stället för 21-27 h.
- 2) Förhållandet mellan torra, svällande prover och preanrikning 1:15 eller mer i stället för 1:10. Provet kan delas i två delar (12,5 g + 175 ml/kärl = 1:15). Då ympas RVS-anrikning från det ena och MKTTn-anrikning från det andra.
- 3) Då det gäller tuggben avvikes från 25 g provmängd.
- 4) Då man fortsätter från VIDAS-metoden till ISO-metoden har också MKTTn anrikningsbuljong odlats i 41,5 ± 1 °C.
- 5) Av RVS- och MKTTn-anrikningar odlas två XLD- och två Rambach-plattor parallellt.
- 6) Kolonierna odlas inte på näringsagar som renodling för konfirmeringsprover, utan direkt i urea- och TSI-rör, ifall kolonierna växer isolerat.
- 7) I stället för skilda biokemiska tester används API testserie.
- 8) Gör OBIS-test vid behov som tilläggstest.
- 9) Provserier som innehåller flera positiva delprover, undantagsförfarande avseende antalet serotypningar.
- 10) Urea- och TSI-rör samt testserien API kan ersättas med Maldi-tof analys.

10 Utförande

10.1 Förbehandling och preanrikning av prov

Provet blandas väl och 25 g vägs upp i ett sterilt kärl. Sätt 225 ml rumstempererat buffrat peptonvatten (BPW) i kärlet och blanda väl (utspädningsförhållande 1:10).

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Till ett torrt och kraftigt svällande prov (t.ex. foderblandningar) sätts mera buffrad peptonlösning, för att vidare ympning ska vara möjlig²⁾. Ett prov som väger 25 g kan delas i två delar och 175 ml/skål peptonlösning tillsätts (utspädningsförhållande 1:15). Vid behov kan utspädningsförhållandet ökas.

För bestämning av salmonella i tuggben sågas vid behov en bit av benet. Om hela benet kan sättas i inkubationskärlet (dekanterglas eller liknande), ska det inte sågas eller sönderdelas. Om benen är små sätts flera ben i samma preanrikning. Håll peptonlösning på benet så, att minst hälften av det är täckt. Om provmängden tillåter, görs två³⁾ preanrikningar.

Om provmängden är liten (enzympreparat, processprover etc.) vägs t.ex. 10 g av provet och 90 ml peptonlösning tillsätts men ändå så, att utspädningsförhållandet är 1:10.

Då mjölkpulver analyseras blandas inte prov och BPW utan kärlet får stå i rumsvärme i 60 ± 10 min, så att provet upplöses. BPW tillsätts i ostprover uppvärmt till cirka 40 °C.

Hårda, olösliga prover (exempelvis Betafin S 4 och näringspinnar för blomkrukor) krossas i en mortel, steriliserad kvarn eller motsvarande innan BPW tillsätts.

Då det gäller foderfabrikernas produktionsmiljöprover tillsätts BPW så att provtagningsvampen e.d. täcks. I rör för exempelvis Enviro Swab provtagningspinnar tillsätts ca 20 ml BPW.

Provet inkuberas i 16–24 h¹⁾ $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Inkubationstiden för preanrikning av pelleterade (t.ex. blandningar, melassnitsel) foderprover som behandlats genom upphettning eller är syrabehandlade, samt tuggben och torkade öron etc. är 24–30 h¹⁾.

Den uppvägda mängden och utspädningen antecknas.

10.2 Anrikningar

Anrikningsbuljongerna värms upp till +37 °C före ympningen. Ympa 0,1 ml oblandad preanrikning i Rappaport-Vassiliadis-rör (RVS) och 1,0 ml i Müller-Kauffmann tetratationat-novobiocin-rör (MKTTn). RVS-rören inkuberas i $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ vattenbad (eller i värmeskåp) och MKTTn-rören i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ värmeskåp i 18–24 h¹⁾. Om provet delades i två delar i preanrikningsskedet, ympas RVS-röret från den ena preanrikningen och MKTTn-röret från den andra²⁾.

10.3 Odling på selektiva plattor

Ympa anrikningsbuljong med en ögla på XLD- och Rambach-agar som utspridd odling på så sätt, att klart skilda kolonier uppstår. Av både RVS- och MKTTn-rören ympas parallellt två XLD-plattor och två Rambach-plattor per prov⁵⁾. Allt som allt odlas 8 plattor per prov. Plattorna inkuberas i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 18–24 h¹⁾.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Vid konfirmering av positivt svar med VIDAS-metoden (Evira 3256), påbörjas ISO-metoden med RVS- och MKTTn-rör för VIDAS-metoden som har förvarats i kylskåp. Då har också MKTTn-anrikningsbuljong odlats i $41,5 \pm 1$ °C.⁴⁾

10.4 Avläsning av plattorna

Man lär sig till stor del att identifiera salmonellakolonier genom erfarenhet. Utseendet kan variera något beroende på matrisen och serotypen.

XLD-platta

En typisk salmonellakoloni är rödaktig, rätt genomskinlig och har ett svart centrum. Nästan alltid (i synnerhet i samband med kraftig salmonellatillväxt) syns en bredare eller smalare ljusröd eller röd zon i substratet som omger kolonierna. Svavelvätenegativa salmonellabakterier (t.ex. *S. Paratyphi A*) växer som rödaktiga/ljusröda kolonier med ett mörkare centrum som skiftar från ljusrött till orange. Laktospositiva salmonellabakterier är gula och de kan ha ett svart centrum (svavelvätepositiva). Både svavelvätenegativa och laktospositiva stammar är sällsynta.

Rambach-platta

97 – 99 % av alla salmonella växer i form av röda kolonier. Exempelvis *S. Typhi* och *S. Paratyphi A* bildar ändå färglösa kolonier.

11 Konfirmeringsförfaranden

Välj minst två typiska eller misstänkta kolonier/platta. Om du kan urskilja typiska eller misstänkta kolonier som inte växer isolerat på plattan, ska du först göra utspridda odlingar av kolonierna på selektiv agar (XLD eller Rambach). Om kolonin är tydligt avskild, kan den plockas direkt av selektiv platta⁶⁾ för konfirmering. Gör konfirmeringstest med de isolerade kolonierna. **Gör konfirmeringarna antingen enligt punkt 11.1 eller 11.2.**

11.1 Körning av Maldi-tof¹⁰⁾

Konfirmera kolonierna genom en direkt ympning enligt arbetsbeskrivning LAB 7085 som körs som tre parallella provpunkter i Maldi-tof.

Score-värdena beaktas vid bedömningen av resultatets pålitlighet. Av resultaten granskas både bästa identifiering (best match) och nästbästa identifiering (second best match). Stammen sänds till Eviras enhet i Kuopio för serotypning om en av identifieringarna ger resultatet "*Salmonella sp*" med ett score-värde om minst 1,700 (grön eller gul färgkod).

Om resultatet för **alla** provpunkter visar "**no peaks found**", ska du göra en snabb extraktion för stammen på Maldi-plattans provpunkter: bakteriemassa + 1 ul 70 % FA -> torkning + 1 ul matris. Om även detta resultat visar "no peaks found" är stammen inte salmonella.

Körningen av Maldi-tof kan ge resultatet "**not reliable identification**". Score-värdet är då lågt, mellan 0,000-1,699 och identifikationen lyckas inte. Detta kan bero på två

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

orsaker. Spektrumet är läsbart, men det finns ingen tillräcklig motsvarighet i biblioteket. Det är också möjligt att provpunkten är av dålig teknisk kvalitet.

Om resultatet är "**not reliable identification**" **antingen** i kolumnen för best match **eller** i kolumnen för second best match, ska man se på rankingslistan med topp tio för provpunkten. Om *salmonella sp.* finns på listan ska en snabbextraktion göras för stammen (på provpunkten bakteriemassa + 1 ul 70 % FA -> torkning + 1 ul matris) eller konfirmeringstester i enlighet med ISO 6579.

Om resultatet fortfarande uppvisar "**not reliable identification**" men salmonella inte finns på rankingslistan (topp tio) är stammen inte salmonella. Om salmonella fortfarande finns kvar på listan, tolkas stammen som misstänkt salmonella och en ytterligare konfirmering ska göras genom serotypning. Konfirmeringsförfarandet kan enligt övervägande kompletteras före serotypningen genom konfirmeringar enligt ISO 6579, t.ex. med Omnivalent eller OBIS-test.

Ympa kolonin som enligt körningen av Maldi-tof misstänktes vara salmonella på en selektiv platta och sänd den till serotypning.

- 11.2** Som alternativ till Maldi-tof, konfirmera eventuella salmonellakolonier genom att testa dem biokemiskt i rör med urea- och TSI-agar, dra en "kontrollplatta" på selektiv agar för att kontrollera odlingens renhet. Gör sedan en serologisk konfirmering med omnivalent serum och vid behov en biokemisk konfirmering med OBIS-test. Om omnivalent orsakar utfällning, utför API 20E på kolonin.

11.2.1 Urea- och TSI-agar samt selektiv platta

Ympa från kolonin först på urea-agar som ytstryk, sedan på TSI-agar som ytstryk och som "stick" och till sist en kontrollplatta på en selektiv platta för att säkerställa stammens renhet. (Märk! Kolonin vidrörs endast en gång.)

Inkubera i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 18–24 h¹⁾.

Urea-agar

Salmonella hydrolyserar inte **urea** utan mediet förblir gult.

TSI-agar

Salmonella producerar syra (100 %) och gas (92 %) av glukos, men producerar inte syra av laktos (99 %) och inte heller av sackaros (99 %), och reducerar sulfat till sulfid (92 %), som fälls ut på substratet som svart järnsulfid. På så sätt ändrar den **TSI**-agarns färg till röd (yta) -svart (mellersta delen) –gul (botten) eller röd (yta) svart (botten) (kraftig bildning av järnsulfid). Även då kan i allmänhet den gula färgen urskiljas på rörets botten och/eller i den mellersta delen då man ser mot ljuset. Gasbildning observeras i form av sprickor eller luftbubblor i agarn.

Stammar som inte reducerar sulfat till sulfid (8 %), bildar ingen svart färg på TSI-agar. Laktos- och/eller sackarospositiva (1 %) stammar ändrar hela TSI-agarns färg till gul (t.ex. 26-75% av *S. Arizona*-stammarna är laktospositiva).

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Tolkning av reaktioner i **TSI**-rör:

Stick:

- gul glukospositiv (använder glukos -> producerar syra)
- röd eller oförändrad glukosnegativ (använder inte glukos)
- svart produktion av svavelväte
- luftbubblor eller sprickor gasproduktion av glukos

Lutande yta:

- gul laktos- och/eller sackarospositiv (använder laktos och/eller sackaros -> producerar syra)
- röd eller oförändrad laktos- och sackarosnegativ (använder varken laktos eller sackaros)

Den lutande ytan på en typisk salmonellayta är alkalisk (röd). Gasbildning kan detekteras i röret. Rörets nedre del är sur (gul) och bildningen av järnsulfid ses i form av en ring som svartfärgas kring sticket (i cirka 90 % av fallen). En kraftig bildning av järnsulfid kan svartfärga rörets hela nedre del.

Selektiv platta

Kontrollera odlingens renhet. Om odlingen inte är ren, utan där växer typiska eller misstänkta isolerade kolonier, odla en koloni på TSI- och urea-agar och sedan vidare på en selektiv platta. Om flera kolonier med likadan morfologi, som är renodlingar, har plockats av samma prov är det inte nödvändigt.

11.2.2 Serologisk konfirmering med omnivalent

Om stammen verkar vara salmonella utgående från resultaten av urea- och TSI-rören, ska en serologisk konfirmering göras. Blanda cellmassa från ett TSI-rör i en fysiologisk saltlösning med objektglas för urskiljning av autoagglutinerande stammar. Vänd objektglaset försiktigt 30 - 60 s för att påvisa autoagglutination. Om stammen autoagglutinerar är det inte möjligt att påvisa antigener.

Om stammen inte autoagglutinerar ska den testas med O-antiserum (omnivalent). Salmonellabakterier fälls ut med omnivalent.

11.2.3 Biokemiskt OBIS-test⁸⁾

Även andra bakterier som hör till familjen *Enterobacteriaceae* (t.ex. *Proteus* och *Citrobacter*) kan fälla ut med omnivalent. Efter övervägande kan en koloni innan API testas med OBIS-test⁸⁾, som särskiljer salmonella från *Citrobacter* och *Proteus*.

11.2.4 Kommersiell testserie för identifiering (API 20E)⁷⁾

Om stammen på basis av urea- och TSI-rör samt omnivalent agglutination (och OBIS-test) verkar vara salmonella, gör ett API 20E test med TSI-rör eller kontrollplatta enligt tillverkarens anvisningar.

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödselfabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

Om stammen utgående från API-resultatet eventuellt är salmonella, ska alla kolonier på kontrollplattorna som agglutinerats med omnivalent serum sändas till Eviras forskningsenhet i Kuopio för serotypning.

Om det på plattorna finns flera salmonellabakterier med olika utseende/som har gett en annorlunda biokemisk profil som har misstänkts vara salmonella, sänds alla de som är olika till serotypning. Om det i **provserien** finns väldigt många positiva delprover, och inga skillnader kan observeras i de eventuella salmonellakoloniernas morfologi, räcker det med att sända två stammar till serotypning.

11.3 Serotypning

Serotypning utförs i överensstämmelse med Kauffmann-White-systemet (metodbeskrivning Evira 6004) vid Eviras forskningsenhet i Kuopio.

12 Resultat

Anteckna på arbetspappret antalet kolonier som ska konfirmeras per anrikningsbuljong och typ av platta. Anteckna resultatet av körningen av Maldi-tof på arbetspappret och bifoga rapporten. Bifoga API-resultatremsan till arbetspappret. Anteckna också reaktionerna med OBIS-testet och omnivalent.

Resultaten anges i undersökningsintyget antingen som "Salmonella konstaterades inte i provet" eller "Salmonella konstaterades i provet" i den undersökta provmängden, i allmänhet 25 g. Salmonellans serotyp anges. Om salmonellabakteriens namn inte hittas, antecknas antiserumprofilen som resultat. I analyskommentaren anges att serotypningen har utförts vid Eviras forskningsenhet i Kuopio.

13 Validering av metoden

Metoden har använts länge vid analys av både foder och organiska gödselfabrikat. ISO 6579-metoden har varit i användning sedan 1996, och är ackrediterad sedan år 1997. Körning av Maldi-tof som alternativt konfirmeringsförfarande validerades år 2014 för tagande i bruk vid sektionen för foder- och gödslingsmedel.

14 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input type="checkbox"/>
Referensmetod	<input type="checkbox"/>
Officiell metod	<input type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

Detektion av salmonella i livsmedel, foder, foderfabrikat, kompost, organiska gödsel­fabrikat, biologiska bekämpningsmedel och foderfabrikernas produktionsmiljöprover. Del A och Del B.

15 Metoder för kvalitetssäkring

Laboratoriernas inbördes jämförande undersökningar	<input checked="" type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input type="checkbox"/>
Användning av referensstammar vid behov	<input type="checkbox"/>
Ympade prover (vid inskolning)	<input checked="" type="checkbox"/>
Parallella analyser	<input type="checkbox"/>

16 Ändringar sedan föregående version

Utarbetad av: Tuula Johansson och Satu Hakola

9.5.2014 Evira 3543/8 Tuula Johansson och Satu Hakola. A- och B-delarna: Maldi-tof har lagts till som ett alternativt konfirmeringsförfarande. Maldi-tof och de reagenser som behövs har lagts till utrustning och reagenser. Ändringar i del B: Foderfabrikernas produktionsmiljöprover har lagts till, Vidas-positiv konfirmering med ISO-metoden har ändrats (inga ändringar i utförandet). Användning av API Rapid 20E har tagits bort. Uppläggning och omarbetning av texten. Referensmetod och officiell metod har strukits ur punkt 14. Användning av referensstammar har strukits ur punkt 15.

14.5.2014 ändrades texten i del A så att den är enhetlig med texten i del B. Metodens status vid användning av Maldi-tof har preciserats i del A.

25.7.2014 Delar A och B: Förfaranden med Maldi-tof då den visar "not reliable identification" har preciserats, utförandet har inte ändrats.

14.8.2014 Acetonitril har lagts till matrisen för Maldi-tof under punkten för arbetssäkerhet. Små preciseringar för Maldi-tof analysen, utförandet har inte ändrats.