

Salmonella. Detektion i organ- och träckprover av djur, produktionsmiljöprover och livsmedel med MSRV-metoden

1 Metodreferenser och avvikelser samt bilagor till metoden

Organ- och träckprover av djur och produktionsmiljöprover: ISO 6579:2002 / Amendment 1, 2007, Annex D

Livsmedel: ISO 6579:2002 / Amendment 1, 2007, Annex D; och NMKL 187:2007

(Buffrat peptonvatten 37 °C / 16-20 h, MSRV 41,5 °C / 2 x 24 ± 3 h, XLD-agar och valbar selektiv agar (t.ex. Rambach-agar 37 °C / 24 ± 3 h), L-lysindekarboxylasbuljong, Urea-, TSI- och/eller API 20E; Brolacin-agar (eller XLD eller Rambach) 37 °C / 24 ± 3 h; Maldi-tof som alternativ konfirmering)

Avvikelser från ISO-metoden

- 1) Om man misstänker att orörliga salmonellabakterier är sjukdomsalstrare på djur, ska man utöver anrikningen även odla direkt på nötblodagar och selektiva agar, inkubering i 37 °C / 24 ± 3 h eller minst 48 ± 3 h 37°C; Pullorum och Gallinarum/fåglar
- 2) Urea- och TSI-agar, lysindekarboxylasbuljong samt API testserie kan ersättas med Maldi-tof analys.

Avvikelser från NMKL-metoden:

- 1) Urea- och TSI-agar, lysindekarboxylasbuljong samt API testserie kan ersättas med Maldi-tof analys.

Bilaga 1: Behandling och sammansättning av prover som ingår i programmet för salmonellakontroll

Bilaga 2 – Karakteristiskt för isolering av djurartspecifika salmonellabakterier (endast på finska)

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

ISO-metoden är avsedd för detektion av salmonellabakterier i träck och miljöprover från primärproduktionen. Den används även för undersökning av organprover från djur och livsmedelsprover.

NMKL-metoden är avsedd för detektion av salmonellabakterier i livsmedel, träck och miljöprover från primärproduktionen.

Om man misstänker att orörliga salmonellabakterier (som *S. Gallinarum*) är sjukdomsalstrare på djur, ska man utöver anrikningen även odla direkt på nötblodagar och selektiva agar. Identifieringen görs enligt denna metodbeskrivning.

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 sex underarter (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* och *indica*). Man känner till över 2400 serotyper av salmonella. Salmonellabakterier uppkallas av tradition enligt serotypen, t.ex. *S. Typhimurium*. Ett exaktare namn på denna typ är *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*. Salmonella orsakar olika slags tarminfektioner och allmänna infektioner hos såväl människor som djur.

4 Princip

Metoden för detektion av salmonella indelas i fyra skeden:

Preanrikning. En känd mängd prov preanrikas i icke-selektivt substrat (BPW) i 37 ± 1 °C i 16 - 20 timmar.

Anrikning. En känd mängd preanrikat prov sätts på en selektiv anrikningsplatta (MSRV) och inkuberas i $41,5 \pm 1$ °C i 24 ± 3 timmar samt ytterligare 24 ± 3 timmar, om ingen typisk växt finns på plattan efter 24 ± 3 h inkubering.

Odling på platta. Från anrikningsplattorna överförs växt till fasta selektiva substrat (XLD och Rambach), som inkuberas i 37 ± 1 °C i 24 ± 3 timmar.

Konfirmering. Växt som misstänks vara salmonella ympas på ett lämpligt substrat och konfirmeras

- a) med Maldi-tof
- b) med biokemiska metoder

5 Eventuella felkällor

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

Om djuret har hunnit behandlas med antibiotika före provtagningen är det möjligt att salmonella inte kan detekteras.

Om MSRV-plattornas inkuberingstemperatur är under $41,5 \pm 0,5$ °C, kan vissa enterobakterier (t.ex. *Citrobacter* spp., *E. Coli*) växa också som svärmande kolonier.

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

6 Arbetssäkerhet

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

7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Värmeskåp +37 ±1 °C
- 3) Värmeskåp +41,5 ± 1 °C
- 4) Maldi-tof Biotyper, Bruker

8 Substrat och reagenser

- 1) Buffrat peptonvatten (BPW)
- 2) Modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV)
- 3) Xylos-lysin-deoxycholat-agar (XLD)
- 4) Rambach / annat valfritt
- 5) Nötblodagar
- 6) Brolacin-agar
- 7) Triple sugar iron agar (TSI)
- 8) Urea-agar
- 9) L-lysindekarboxylasbuljong
- 10) API 20E, BioMérieux
- 11) HCCA dosförpackad (cyano-4-hydroxikanelnsyra), Bruker Daltonik GmbH 12)
- 12) Ultrarent vatten
- 13) Dejoniserat, sterilt vatten
- 14) Acetonitril
- 15) Etanol 99,6 %
- 16) FA (myrsyra)
- 17) Standard (Bruker Bacterial Test Standard, BTS)

9 Kontrollstammar

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

10 Förbehandling av prov

Proverna behöver ingen särskild förbehandling (se punkten provtagning för preanrikning).

11 Utförande

Undersökningen av proverna inleds samma dag som de anländer. Om proverna inte kan undersökas genast, förvaras de i enlighet med enheternas instruktioner. När det gäller träckprover som är över tre dygn gamla övervägs särskilt om provet fortfarande går att undersöka. Den ansvariga forskaren beslutar om proverna ska ratas.

11.1 Provtagning för preanrikning

Det buffrade peptonvattnet skall vara rumstempererat innan provet ympas i det.

Träckprover, sockprover, prover av lymfkörtlar, kött och produktionsmiljö enligt det nationella salmonellakontrollprogrammet undersöks enligt arbetsbeskrivning Evira 6002-1.

11.1.1 Organ- och träckprover

Vid undersökning av organ- och träckprover är provmängden cirka 1 g och preanrikningsbuljongens volym 9 ml. Om provmängden är en annan än ovan nämnda ska preanrikningsbuljongens volym väljas så att förhållandet mellan provmängden och preanrikningsbuljongens volym är cirka 1:9 (dvs. provet späds ut i förhållandet 1:10 = en del prov + nio delar preanrikningsbuljong).

Ta sammanlagt cirka 1 g organ (vanligen lever, mjälte och tarm) eller cirka 1 g träck, om möjligt, och sätt i 9 ml buffrat peptonvatten. Blanda provet i preanrikningsbuljongen genom att skaka provkärlet lätt.

11.1.2 Livsmedelsprover

Vid undersökning av livsmedel är provmängden i allmänhet 25 g och preanrikningsbuljongens (vanligen buffrat peptonvatten) volym 225 ml (provet späds ut i förhållandet 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.

Flytande prover blandas i anrikningsbuljongen genom skakning, fasta prover homogeniseras.

Provtagning i anrikningssyfte av livsmedel som kräver avvikande hantering beskrivs i metodbeskrivningarna Evira 3432 och Evira 3543 del A, punkterna 11.1.1–11.1.9.

11.2 Preanrikning

Inkubera preanrikningsbuljongen 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; Davies et al., 2001).

11.3 Anrikning

MSRV-plattorna ska vara rumstempererade före ympning. Plattor som har spruckit eller vars innehåll övergått i flytande form får inte användas. Om preanrikningen har förvarats

i kylskåp (t.ex. över veckoslutet), ska den inkuberas i 37 ± 1 °C / 2 h innan den ympas i anrikningsbuljong för att undvika stora temperaturvariationer.

Ympa 0,1 ml preanrikning i tre droppar på jämnt avstånd på MSRVR-plattan med en engångspipett. När prov tas av preanrikningen är det viktigt att det inte rörs om. Provet tas på ett ställe där det finns så mycket fri vätska som möjligt. Om det finns partiklar på vätskeytan rekommenderas att provet tas djupare ner.

Inkubera MSRVR-plattorna i värmeskåp i $41,5 \pm 1$ °C 24 ± 3 h.

MSRVR-plattorna får inte vändas utan de inkuberas med locket uppåt.

Rörliga salmonellabakterier bildar en växande, ljus, tydligt avgränsad zon kring de ställen där plattan ympats.

Om det inte finns någon typisk växt på MSRVR-plattorna efter 24 ± 3 h inkubering, fortsätt inkubera i ytterligare 24 ± 3 h. Efter 24 eller 48 h inkubering kan MSRVR-plattorna förvaras i kylskåp ($2-8$ °C) i högst 72 timmar om en potentiell odling på selektiva plattor inte kan utföras omedelbart.

11.4 Odling på selektiva plattor

XLD-plattan och den valfria selektiva plattan ska vara rumstempererade före ympningen.

Kolonimaterial till selektiva plattor tas från kanten av svärmzonen. Inokulatet tas med 1 µl ögla från yttre kanten av tillväxtzonen så att inokulatet innehåller så litet agar som möjligt. Till vardera plattan tas prov med en separat steril ögla och odlas till en utspridd odling så att isolerade kolonier tydligt fås fram. Vid användning av en 1 µl ögla är en normalstor platta (90–100 mm) av respektive selektiva agar tillräcklig för att få fram isolerade kolonier.

MSRVR-plattor som är negativa efter 24 h inkubering ska inkuberas ytterligare 24 ± 3 h. Från plattorna i fråga görs vidareodling till selektiva plattor bara om de efter 48 h inkubering är positiva (= svärmzon har bildats).

Inkubera XLD- och Rambach-plattorna i 37 ± 1 °C 24 ± 3 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) 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 och har 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.

11.5.2 Rambach

Salmonella (med undantag av Typhi-serotyper) växer som klarröda kolonier på Rambach-plattor.

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

12 Konfirmeringstester

Typiska/misstänkta kolonier konfirmeras alternativt:

- a) med Maldi-tof
- b) med traditionella biokemiska (TSI- och urea-agar och lysindekarboxylasbuljong; en lämplig kommersiell identifieringstestserie som API 20E) och serologiska metoder (polyvalenta antiserum).

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

12.1 Körning av Maldi-tof

Konfirmera kolonierna genom att köra en direkt ympning enligt arbetsbeskrivning LAB 7085 som två eller 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 av 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**". Detta kan bero på två orsaker. Spektrumet är läsbart, men det finns ingen tillräcklig motsvarighet i biblioteket. Score-värdet är då lågt, mellan 0,000-1,699 och identifikationen lyckas inte. 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 rankningslistan med topp tio för provpunkten. Om *Salmonella sp.* finns på listan ska en snabbextraktion göras av stammen på Maldi-plattans provpunkt: bakteriemassa + 1 ul 70 % FA -> torkning + 1 ul matris. Om resultatet fortfarande uppvisar "**not reliable identification**" men salmonella inte finns på rankningslistan (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 vid behov kompletteras före serotypningen genom konfirmeringar enligt ISO 6579, t.ex. med Omnivalent eller OBIS-test.

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

12.2 Traditionell biokemisk konfirmering och ytterligare konfirmeringar

12.2.1 Urea- och TSI-agar och lysindekarboxylasbuljong eller API 20 E

Välj av båda plattorna som du använt en typisk eller misstänkt koloni för fortsatta undersökningar. Om kolonin är klart isolerad från de andra kolonierna; ympa med samma 1 µl ögla från samma koloni först på urea-agar som ytstryk och på TSI-agar som både ytstryk och "stickodling", sedan i lysindekarboxylasbuljong och slutligen på Brolacin-, XLD- eller Rambach-platta som utspridd odling. Märk! Kolonin vidrörs endast en gång, inte efter varje medium som ska odlas. Täck lysindekarboxylasbuljongen efter odlingen med steril mineral- eller paraffinolja. Inkubera i 37 ± 1 °C / 24 ± 3 h.

Om de valda kolonierna inte var salmonella, ska du ta ytterligare fyra kolonier för fortsatta undersökningar.

Om du på plattan kan urskilja typiska eller misstänkta kolonier som inte växer isolerat ska du fortsätta odla av kolonierna på selektiv agar så, att du får isolerade kolonier. Utför konfirmeringstest på de isolerade kolonierna.

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

Salmonella använder glukos, men inte laktos eller sackaros, samt reducerar sulfat till sulfid, som fälls ut som svart järnsulfid i underlaget. Därmed ändrar **TSI**-agarmediet färg till röd-svart-gul eller rödsvart (kraftig bildning av järnsulfid). Stammar som inte reducerar sulfat till sulfid bildar ingen svart färg. Sådana stammar är sällsynta och de konfirmeras t.ex. med kommersiellt tillgängliga testserier.

Salmonella dekarboxylerar lysin, varför grumlighet och bibehållande av buljongens purpuröda färg i **lysindekarboxylasbuljong** är ett tecken på en positiv reaktion. Ändring av buljongens färg till gul är ett tecken på en negativ reaktion (lysinet har inte brutits ner).

Kontrollera odlingarnas renhet. Salmonella växer som genomskinliga gråaktiga kolonier på **Brolacin**-agar medan 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-lysindekarboxylasbuljong och på Brolacin-agar.

Testerna med urea-, TSI- och lysindekarboxylasbuljong kan ersättas med **testserie API 20 E**.

12.2.2 Ytterligare konfirmeringar

Om du som biokemisk konfirmering odlade TSI-, urea- och lysindekarboxylasbuljong, kan du vid behov göra ytterligare konfirmering med en kommersiellt tillgänglig identifieringstestserie, t.ex. API 20 E.

13 Resultat

Varje enhet som undersöker salmonellaprover besvarar själv resultatet på prov som den konstaterat vara negativt:

Djursjukdomsundersökningar: "Inga salmonellabakterier har konstaterats".
Undersökningar av livsmedel: "Inga salmonellabakterier har konstaterats/25 g eller ml prov eller undersökt provmängd eller yta".

Vid misstanke om salmonella i provet på basis av Maldi-tof eller konventionell biokemisk identifiering och eventuell polyvalent serotypning, kan verksamhetsställena i Helsingfors, Seinäjoki och Uleåborg lämna ett preliminärt svar angående misstanke om salmonella i undersökningen.

När det gäller andra prover än prover som inkommit direkt till Kuopio från Eviras laboratorier samt träckprover av produktionsdjur (nötkreatur, svin, fjäderfä och hästar) som inkommit till Evira, är det Kuopio som lämnar serotypningsresultat direkt till den som beställt undersökningen.

Kuopio registrerar och godkänner serotypningsresultat för livsmedel och patologiska prover i ELMO-systemet. Patologerna lämnar resultat av patologiska prov som gemensamt externt svar till kunder och relevanta informationsmottagare. Resultat av livsmedelsprover lämnas av forskarna vid Forskningsenheten för livsmedels- och fodermikrobiologi. För införande av begränsande föreskrifter angående djur som ingår i det nationella programmet för kontroll av salmonella (nötkreatur, svin, fjäderfä) ger patologerna omedelbart serotypningsresultat som delsvar, även om de övriga undersökningarna inte är avslutade.

Kuopio lämnar fagtypningsresultaten som externt tilläggssvar.

14 Validering av metoden

Om validering av metoden har avfattats separata valideringsrapporter, Evira 6002/Kuronen, 2007 och Evira 6002/kött/Johansson, Pekkanen 2012.

Körning av Maldi-tof som alternativt konfirmeringsförfarande validerades år 2014 för tagande i bruk vid sektionen för foder- och gödslingsmedel. På basis av jämförelsen mellan salmonella serotyper som ingår i valideringsmaterialet och serotyper som förekommer i livsmedel konstaterades att Maldi-tof även lämpar sig för biokemisk konfirmering av salmonellastammar som isolerats från livsmedel.

15 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/> ¹⁾
Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input checked="" type="checkbox"/> ²⁾
Officiell metod (om konfirmering inte görs med Maldi-tof)	<input checked="" type="checkbox"/> ^{1), 2)}
Referensmetod (om konfirmering inte görs med Maldi-tof).	<input checked="" type="checkbox"/> ¹⁾
Intern metod	<input type="checkbox"/>

16 Metoder för kvalitetssäkring

Laboratoriernas inbördes jämförande undersökningar	<input checked="" type="checkbox"/> ^{1), 2)}
Metodjämförelser	<input type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar vid behov	<input checked="" type="checkbox"/> ^{1), 2)}
Ympade prover (i introduktionen)	<input checked="" type="checkbox"/> ^{1), 2)}
Parallella analyser	<input type="checkbox"/>

¹⁾ISO, ²⁾NMKL

17 Referenser

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

ISO 6579:2002 / Amd. 1:2007 (E). Amendment 1, Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.

Davies, R.H., Bedford S., Shankster S. (2001), Enhanced culture techniques for the detection of *Salmonella*, *The Veterinary Record*, April 28, 2001, p. 539-540.

Johansson, T. ja Pekkanen, K. (2012) MSRv–menetelmän (Evira 6002) toimivuus tutkittaessa salmonellaa lihanäytteistä, Validointiraportti

Johansson, T. Salmonellan tunnistaminen Bruker MALDI-TOF Biotyper –laitteella; elintarvikkeet. Validointiraportti, 08.05.2014

Korver H., Mooijman K.A., Nagelkerke, N.J.D, van de Giessen A.W. and Henken, A.M. (2003) EU Collaborative study VI (2002) on bacteriological detection of *Salmonella* spp. RIVM report 330300001/2003. Bilthoven, The Netherlands.

Kuronen H. Validointiraportti 6002, 16.2.2007.

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.

Pelkola, K. Salmonellan tunnistaminen Bruker MALDI-TOF Biotyper –laitteella, eläinten elin- ja ulostenäytteet sekä tuotantoympäristönäytteet. Validointiraportti 10.9.2014.

WHO Collaborative Centre for Reference and Research of *Salmonella* (Institut Pasteur-Paris): Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, Kauffmann-White Scheme supplemented by the formulae approved up to December 31, 2000.

18 Ändringar sedan föregående version

Utarbetad av: Henry Kuronen, Tuula Johansson och Teresa Skrzypczak
17.07.2014 Evira 6002/7 Maldi-tof har lagts till som ett alternativt konfirmeringsförfarande. Maldi-tof och nödvändiga reagenser och tolkning av svaren har lagts till utrustning och reagenser. API 20E har lagts till som ett alternativ till biokemiska tester. Serologisk konfirmering har strukits. Valideringsrapporterna för MSRV-metoden och Maldi-tof samt Maldi-tof valideringsrapport om organ- och träckprover av djur samt produktionsmiljöprover har lagts till referenserna. Anvisningen uppdaterades av: Tuula Johansson och Henry Kuronen

19 Ansvariga

Helsingfors: Teresa Skrzypczak
Kuopio: Henry Kuronen
Uleåborg: Varpu Hirvelä-Koski
Seinäjoki: Mirja Raunio-Saarnisto
Helsingfors/Livsmedelsmikrobiologi: Tuula Johansson