

Zoonosynk

Ringtester för *Salmonella* spp. och *Listeria monocytogenes* i livsmedel

av Ramiyeh Molaei

Förord

I arbetet med att uppskatta sjukdomsbördan, förstå smittvägar och införa kostnadseffektiva interventioner krävs korrekt information om förekomst och halter av smittämnen i hela kedjan från jord till bord. Hur är situationen för våra sex vanliga och allvarliga zoonoser: campylobacterios, listerios, salmonellos, kryptosporidios, yersinios och EHEC? Dessa är anmälningspliktiga sjukdomar och månadsvis statistik samlas och presenteras av Folkhälsomyndigheten. Hur pålitliga är dessa data? Vad är förekomsten av dessa zoonotiska smittämnen i djur och livsmedel? Kvalitetssäkrat mikrobiologiskt analysförfarande som ger samma resultat oavsett utförare är en grundförutsättning för framtagandet av korrekt basfakta.

Hur harmoniserade och kvalitetssäkrade de mikrobiologiska analyserna är inom sektorerna längs livsmedelskedjan är huvudfrågan i projektet Zoonossynk.

Projektet leds av Statens veterinärmedicinska anstalt och finansieras med medel från anslag 2:4 krisberedskap och omfattar diagnostik av ovanstående zoonoser.

I denna rapport som är en del i Zoonossynk beskrivs utförda tester för undersökning av svenska officiella livsmedelslaboratoriernas förmåga att påvisa Salmonella och Listeria i livsmedel. Trovärdiga analyser av livsmedel är en förutsättning för privat och offentlig sektors framtagande av en riktig situationsbild över livsmedels bidrag till problemet zoonoser.

Hans Lindmark
Avdelningschef, avdelningen för biologi

Livsmedelsverket

Innehåll

Förkortningar.....	4
Sammanfattning	5
Summary.....	6
Inledning.....	7
Salmonella spp.....	7
Smittämne	7
Sjukdom hos människor	7
Analys.....	7
Listeria monocytogenes.....	8
Smittämne	8
Sjukdom hos människor	8
Analys.....	8
Syfte	9
Metod	10
Tillverkning av provmaterial	10
Salmonella	10
Listeria	11
Utskick	11
Resultat.....	12
Salmonella	12
Listeria monocytogenes.....	13
Diskussion	15
Salmonella	15
Listeria	16
Slutsats.....	18
Tack!	19
Referenser	20
Bilaga 1	21

Förkortningar

Substrat

ALOA	Agar för <i>Listeria</i> enligt Ottaviani och Agosti
BA	Blodagar
BriS	Brilliance Salmonella-agar
BPV	Buffrat peptonvatten
LMBA	<i>Listeria monocytogenes</i> Blood Agar
MKTTn	Muller-Kauffmann tetrathionat/novobiocin-buljong
RVS	Rappaport-Vassiliadis soja-pepton-buljong
XLD	Xylos-lysin-desoxycholat-agar

Organisationer

FoHM	Folkhälsomyndigheten
ISO	International Organization for Standardization
NMKL	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler
SLV	Livsmedelsverket
SVA	Statens Veterinärmedicinska Anstalt

Sammanfattning

Projektet har undersökt förmågan hos officiella livsmedelslaboratorier att påvisa låga halter av Salmonella och Listeria i livsmedel. Även laboratoriernas förmåga att haltbestämma Listeria i livsmedel undersöktes. För testet med Salmonella fick de nio deltagande laboratorierna 22 prover med köttfärs som innehöll olika koncentrationer av *Salmonella* Enteritidis eller *Salmonella* Dublin.

Resultatet för proverna med *S. Enteritidis* var bra och samtliga laboratorier bedöms ha god sensitivitet. För proverna med *S. Dublin* var skillnaderna större mellan laboratorierna för proven med lägst koncentration, vilket antyder en viss skillnad i sensitivitet. Inga skillnader i resultat var direkt kopplade till val av metod.

För testet med *L. monocytogenes* fick de sex deltagande laboratorierna 16 prov av färskost för kvalitativ analys och 17 prov för kvantitativ analys. För kvalitativ analys av *L. monocytogenes* var resultaten goda utom för ett laboratorium som rapporterade nio falska resultat. Även för kvantitativ analys var resultaten goda utom för samma laboratorium som hade problem med kvalitativ analys. Detta laboratorium rapporterade falskpositiva svar för de fem prover som innehöll en blandning av *L. ivanovii* och *L. seeligeri*. Orsaken till de falskpositiva svaren var att laboratoriet inte utfört samtliga konfirmeringssteg i metodbeskrivningen. De rapporterade halterna var jämnt fördelade och inget laboratorium rapporterade värden som klassades som extremvärden. Någon skillnad i halter mellan de använda metoderna (NMKL 136 och Rapid L mono) förelåg inte.

Det här testet av mikrobiologisk analysförmåga skiljer sig från Livsmedelsverkets ordinarie program för kompetensprovning genom att istället för glasvialer med frystorkade definierade blandningar av mikroorganismer så fick laboratorierna analysera relevanta spikade livsmedelsmatriser innehållande en naturlig bakgrundsflora. Antalet prov per laboratorium var också betydligt fler, vilket ger ett bättre bedömningsunderlag. Förutom ett laboratorium som Livsmedelsverket har följt upp särskilt så var resultaten goda från båda testerna och således bedöms analyser av Salmonella och Listeria från svenska officiella livsmedelslaboratorier vara trovärdiga.

Summary

The current project investigated the ability of Swedish official laboratories to detect low levels of Salmonella and Listeria in food as well as the ability to determine low concentrations of Listeria in food.

For the Salmonella ring test, all nine participants received 22 minced meat samples inoculated with various concentrations of *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Dublin. The results indicate that the laboratories have high sensitivity for detecting *S. Enteritidis* and lower sensitivity for detecting the lowest concentrations of *S. Dublin*.

For the *L. monocytogenes* ring test, all six participants received 16 soft cheese samples for qualitative analysis and 17 samples for quantitative analysis. All laboratories except one, which reported nine false results, reported good results for detection of *L. monocytogenes*. The results were also satisfactory for quantitative analysis except for one laboratory. This was the same laboratory as that which had a problem with the detection of *L. monocytogenes*. This laboratory reported false positive results for those five samples that were inoculated with a mixture of *L. ivanovii* and *L. seeligeri*. These results occurred because the laboratory did not perform all the confirmation steps required by the analytical method. Reported concentrations were evenly distributed between the laboratories, and none of the results were classified as an extreme value. Furthermore, no significant difference was found between the two methods (NMKL 136 and Rapid L mono) used for quantitative analysis.

The current microbial ring test differs from the regular proficiency testing programme provided by the Swedish National Food Agency. Instead of glass vials containing freeze-dried microbial mixtures, laboratories received spiked food samples containing natural background flora. The number of samples was also significantly higher and provided better analytical material. With the exception of one laboratory, which was specifically followed up by the Swedish National Food Agency, all laboratories reported satisfactory results. Therefore, Salmonella and Listeria analyses performed by Swedish public laboratories are considered to be reliable.

Inledning

Salmonella spp.

Smittämne

Salmonella tillhör familjen *Enterobacteriaceae* och delas upp i två arter, *Salmonella enterica* och *Salmonella bongori*. Arten *Salmonella enterica* delas upp i sex underarter; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* och *indica*. Underarterna delas i sin tur upp i serotyper. *Salmonella enterica* underart *enterica* delas upp i över 2500 olika serotyper. De flesta zoonotiska serotyper såsom *S. Enteritidis* och *S. Dublin* ingår i underarten *enterica*. I underarten *enterica* ingår också de sjukdomsframkallande och icke zoonotiska serotyperna Typhi och Paratyphi (1).

Salmonella överlever bra i miljön men trivs bäst i tarmen hos människor och djur. Bakterien tillväxer inom ett relativt brett temperatur- och pH-intervall och är tålig mot kyla, uttorkning, saltning och rökning (1).

Salmonella är vanligt förekommande hos många djur såsom nötkreatur, grisar, hönsfåglar, vilda fåglar och sällskapsdjur men några serotyper är värdjursspecifika, exempelvis är *S. Dublin* anpassad till nötkreatur (1).

Sjukdom hos människor

Salmonellainfektion förekommer i två typer; tarminfektion och systemisk infektion (3). Den förstnämnda är den klart vanligaste i Sverige och vanliga symptom är illamående, kräkningar, magkramper, diarréer, feber och huvudvärk som vanligtvis varar några dygn. Systemisk infektion är numera ovanlig i Sverige och orsakas främst av *S. Typhi* och *S. Paratyphi* (1,2).

Inkubationstiden är oftast ett till tre dygn och infektionsdosen är relativt hög (ca 10^5 bakterier). Bärarskap varar vanligtvis mellan fyra till sex veckor men ibland upp till ett år (1).

Salmonellainfektion är en smittspåringspliktig sjukdom och sjukdomsfall anmäls till smittskyddsläkaren i aktuellt landsting, till Folkhälsomyndigheten och även till miljö- och hälsoskyddsförvaltningen i aktuell kommun vid misstänkt smitta från livsmedel. I Sverige rapporteras årligen 2000 – 3000 fall av Salmonellainfektion hos människa (1). Enligt Folkhälsomyndighetens statistik har antalet rapporterade Salmonellafall i Sverige halverats från 2007 till 2016 (1).

Analys

Enligt förordning (EG) nr 2073/2005 är EN/ISO 6579 ”Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the Detection of Salmonella spp.” referensmetoden för analys av Salmonella i livsmedel. Alternativa analysmetoder som är validerade mot referensmetoden får användas i offentlig kontroll. Dessutom får en rättsligt skyddad metod användas om den certifierats av tredje part i enlighet med det protokoll som fastställts i EN/ISO standard 16140 eller andra liknande internationella protokoll. Livsmedelsverket bedömer att NMKL-metod 71 ”Salmonella. Påvisning i livsmedel” kan användas som alternativ till referensmetoden.

Listeria monocytogenes

Smittämne

Listeria monocytogenes tillhör släktet *Listeria* tillsammans med sju andra arter; *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshmeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* och *L. marthii*. *Listeria monocytogenes* är en vanligt förekommande bakterie i vår omgivning. Bakterien finns i jord, vatten, organiskt material samt hos många däggdjur. Bakterien tål låga temperatur (ner mot 0 °C), höga salthalter (10 % NaCl), varierande pH-värden (pH 4,4 – 9) och låg vattenaktivitet. Dessutom kan den tillväxa i kylskåpstemperatur och även i livsmedel förpackade i modifierad atmosfär eller vakuum. *L. monocytogenes* kan bilda biofilm på ytor och utrustning i kontakt med livsmedel och därmed bli mer resistent mot rengörings- och desinfektionsmedel. Bakterien är relativt värmetålig men dör snabbt vid tillagning av mat till 70 °C (4).

Sjukdom hos människor

L. monocytogenes ses som en förhållandevis ofarlig bakterie eftersom många kan vara bärare utan att bli sjuka. Den kan dock vara farlig för gravida kvinnor, nyfödda barn, äldre personer och människor med nedsatt immunförsvar på grund av exempelvis HIV/AIDS, alkoholism, transplantation eller viss cancerbehandling. Listeriainfektion förekommer i två typer; icke-invasiv gastrointestinal listerios och invasiv listerios. Icke-invasiv listerios orsakar typiska symptom på magsjuka (feber, mag-tarmsymptom och muskelvärk). Invasiv listerios kan leda till blodförgiftning eller hjärnhinneinflammation hos vuxna människor med nedsatt immunförsvar och nyfödda barn samt för tidig födsel eller fosterdöd vid graviditet. Dödligheten varierar mellan 5 och 30 procent (4).

Inkubationstiden vid listerios varierar mellan 3 och 70 dagar (median 21 dagar) (4). Infektionsdosen är okänd, men utbrottsutredningar och experimentella studier på djur indikerar att den är $>10^4$ CFU/g livsmedel. Den kan dock variera mellan 30 och $1,6 \times 10^9$ CFU/g livsmedel (4, 5).

Listeriainfektion är en smittspåringspliktig sjukdom och inträffade fall anmäls till smittskyddsläkaren i landstinget, till Folkhälsomyndigheten och även till Miljö- och hälsoskyddsförvaltningen i kommunen vid misstänkt smitta från livsmedel. Enligt Folkhälsomyndighetens statistik finns en uppåtgående trend av listerios från 1983 till 2016, med 15 procent ökning per fem år (6).

Analys

Enligt förordning (EG) nr 2073/2005 är EN/ISO 11290 ”Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method” och ”Part 2: Enumeration method” kvantitativ respektive kvalitativ analys av *L. monocytogenes* i livsmedel. Alternativa analysmetoder som är validerade mot referensmetoden får användas. Dessutom får en rättsligt skyddad metod användas om den certifierats av tredje part i enlighet med det protokoll som fastställts i EN/ISO standard 16140 eller andra liknande internationella protokoll. Livsmedelsverket bedömer att NMKL-metod 136 kan användas som alternativ till referensmetoden.

Syfte

För trovärdig mikrobiologisk kontroll av livsmedel krävs att analyserna utförs på ett kvalitetssäkrat sätt. I dagsläget saknas kunskap om analyslaboratoriernas förmåga eftersom det inte sker någon större kontroll av laboratoriernas analysförmåga. Enda kraven för officiella laboratorier är att analysmetoderna är godkända för offentlig kontroll och att de är ackrediterade.

Projektets syfte var att undersöka officiella livsmedelslaboratoriernas förmåga att påvisa Salmonella samt påvisa och haltbestämma Listeria i livsmedel.

Metod

Tillverkning av provmaterial

För tillverkning av analysfärdiga prover delades matrismaterialet upp i 25 g eller 10 g stora portioner i Stomacher®-filterpåsar. Fyra stycken frystorkade provblandningar (A, B, C och D) som tillverkats av Livsmedelsverket användes till ympning (Tabell 1). Från en ursprunglig beredning av dessa blandningar tillsattes från relevanta spädningar 1 ml till 10 g matris (kvantitativ analys) eller 1 ml till 25 g matris (kvalitativ analys). Kvalitetskontroll av homogenitet av provblandningarna utfördes på fem vialer av varje blandning. Kriteriet för homogenitet vid kvantitativ analys för samtliga analyser är att värdena vid test av reproducerbarhet (T) och vid test med "Index of dispersion" mellan vialer (I₂) inte samtidigt överskrider gränsvärdena på 2,6 respektive 2,0 (Tabell 2). För definitioner av T och I₂ se referenser 7 och respektive 8.

Totalt tillverkades 198 prover för ringtestet med *Salmonella* spp. och 231 för *L. monocytogenes*.

Tabell 1. Mikroorganismer i respektive provblandning

Blandning	Målorganism	Stambeteckning
A	<i>Salmonella</i> Enteritidis	SLV-436
B	<i>Salmonella</i> Dublin	SLV-242
C	<i>Listeria monocytogenes</i>	SLV-513
D	<i>Listeria seeligeri</i>	SLV-347
	<i>Listeria ivanovii</i>	SLV-348

Tabell 2. Medelvärden av halter (m), T och I₂ från kvalitetskontroll av blandningarna; m anges i log₁₀ cfu (colony forming units) per ml prov.

Analys och metod	C			D		
	m	T	I ₂	m	T	I ₂
<i>L.monocytogenes</i> , kvantitativ	3,77	1,51	1,21	-	-	-
<i>L. seeligeri</i> och <i>L. ivanovii</i> , kvantitativ	-	-	-	5,33	1,63	5,31
- Ingen Målorganism						

Salmonella

Varje laboratorium fick 22 prover bestående av 25 g blandfärs (fläsk- och nötkött) för kvalitativ analys av *Salmonella* spp.. Av dessa innehöll två prover endast peptonvatten, 10 prover var spikade med *S. Enteritidis* och 10 prover med *S. Dublin*. För varje stam erhöll laboratorerna 4 replikat med medium koncentration (≈ 2 CFU/g) och 6 replikat med låg koncentration (≈ 0,2 CFU/g).

Listeria

Totalt 33 prover skickades ut för kvalitativ eller kvantitativ analys av *L. monocytogenes*. För kvantitativ analys fick varje laboratorium 17 prover som innehöll 10 g spikad färskost. Elva prover innehöll *L. monocytogenes* i tre halter, 4 st 150 – 200 CFU/g, 6 st 800-1000 CFU/g och 1 st (\approx 8000 CFU/g). Fyra prov innehöll en av en blandning av *Listeria seeligeri* och *Listeria ivanovii*, 2 replikat av 150 – 200 CFU/g och två av 800 – 1000 CFU/g. Två prover var spikade med endast peptonvatten.

För kvalitativ analys fick varje laboratorium 16 prover som bestod av 25 g spikad färskost. *L. monocytogenes* tillsattes till 10 av proverna; 4 replikat med medium koncentration (\approx 1 CFU/g) och 6 replikat med låg koncentration (\approx 0,2 CFU/g). Till 4 av proverna tillsattes en blandning av *Listeria seeligeri* och *Listeria ivanovii*; 2 replikat med medium koncentration (\approx 1 CFU/g) och 2 replikat med låg koncentration (\approx 0,2 CFU/g). Två ytterligare prover var spikade endast med peptonvatten.

Utskick

Endast laboratorier med ackrediterade metoder deltog i undersökningen. Totalt deltog nio laboratorier (inklusive Livsmedelsverket) i ringtestet för *Salmonella* spp.. För ringtestet med *L. monocytogenes* deltog sju laboratorier (inklusive Livsmedelsverket). Provmaterial sändes i augusti 2016 och november 2016 för analys av *Salmonella* spp. respektive *L. monocytogenes*. Spikade prover placerades i förkylda frigolitlådor tillsammans med kylklampar och transporterades av Post Nord. Alla laboratorier fick sina prover inom 24 timmar efter utskicket och analyserna påbörjades samma dag.

Laboratorierna fick analysrapporteringblankett och instruktioner om utförande och resultatrapportering. I instruktionen ingick att tillsätta 90 ml och 225 ml av lämplig anrikningsbuljong till varje påse med 10 g respektive 25 g spikad matris. Därefter homogeniserades proverna genom stomachering för att sedan analyseras vidare enligt laboratoriets egna rutiner. Tiden från utskick av proverna till sista rapporteringsdag för laboratorierna var för *Salmonella* två veckor och för *Listeria* tre veckor. Resultaten rapporterades via e-post till Livsmedelsverket och resultaten behandlades konfidentiellt.

Resultat

Salmonella

En stam av *S. Enteritidis* och en stam av *S. Dublin* utgjorde målorganism för analysen. Samtliga laboratorier rapporterade korrekt positivt resultat för medium halter av *S. Enteritidis* och korrekt resultat för negativ kontroll. Individuella resultat för varje analys visas i bilaga 1.

Majoriteten av resultaten (93 %) var korrekta för de låga halterna av *S. Enteritidis* (Tabell 3), men två laboratorier rapporterade vardera ett falsknegativt resultat och ett laboratorium rapporterade två falsknegativa resultat. Ett laboratorium använde BAX-metoden parallellt med NMKL-metoden och räknades därför som två laboratorier (1605 och 1606).

Tabell 3. Resultat från kvalitativ analys av *S. Enteritidis* tillsatt i låg och medel halter samt negativ kontroll prover

Lab	Metod	Låg halt		Medium halt		Neg kontroll	
		n	FN	n	FN	n	FP
1601	VIDAS	6	2	4	0	1	0
1602	VIDAS	6	1	4	0	1	0
1603	VIDAS	6	0	4	0	1	0
1604	VIDAS	5*	0	4	0	1	0
1605	Bax	6	0	4	0	1	0
1606	NMKL 71	6	0	4	0	1	0
1607	NMKL 71	6	0	4	0	1	0
1608	NMKL 71	6	1	4	0	1	0
1609	NMKL 71	6	0	4	0	1	0
SLV	NMKL 71	6	0	4	0	1	0
Totalt		59	4	40	0	10	0

n: antal replikat, *FN*: antal falsknegativa resultat, *FP*: antal falskpositiva resultat,

SLV: Livsmedelsverket

* Detta laboratorium erhöll endast 5 prover med låg halt.

Majoriteten av de inrapporterade resultaten (95 %) var också korrekta för medium halter av *S. Dublin* (Tabell 4). Endast ett laboratorium rapporterade falsknegativa resultat. Laboratoriet följde två olika metoder för analys av *Salmonella spp.*; NMKL 71:1999 och PCR-analys med BAX®. De två falsknegativa resultaten rapporterades med användning av NMKL-metoden.

Knappt hälften av laboratorierna rapporterade falsknegativa resultat för proverna med låga halter med *S. Dublin* (Tabell 4). Två laboratorier kunde inte påvisa *Salmonella* i något av de sex proverna med låg halt av *S. Dublin*.

Tabell 4. Resultat från kvalitativ analys av *S. Dublin* tillsatt i låg och medel halter samt negativ kontroll prover

Lab	Metod	Låg halt		Medium halt		Neg kontroll	
		n	FN	n	FN	n	FP
1601	VIDAS	6	0	4	0	1	0
1602	VIDAS	6	0	4	0	1	0
1603	VIDAS	6	0	4	0	1	0
1604	VIDAS	6	6	4	0	1	0
1605	Bax	6	3	4	0	1	0
1606	NMKL 71	6	6	4	2	1	0
1607	NMKL 71	6	0	4	0	1	0
1608	NMKL 71	6	3	4	0	1	0
1609	NMKL 71	6	3	4	0	1	0
SLV	NMKL 71	6	0	4	0	1	0
Totalt		60	21	40	2	10	0

n: antal replikat, *FN*: antal falsknegativa resultat, *FP*: antal falskpositiva resultat, *SLV*: Livsmedelsverket

Listeria monocytogenes

En stam av *L. monocytogenes* utgjorde målorganism för analysen. En blandning av *L. seeligeri* och *L. ivanovii* användes som falskpositiva organismer. Individuella resultat för varje analys visas i bilaga 1.

För kvalitativ analys var resultaten bra utom för ett laboratorium som totalt rapporterade sju falsknegativa resultat för låga och medium halter av *L. monocytogenes* och ett falskpositivt svar för vardera låga och medium halter av *L. seeligeri* och *L. ivanovii* (Tabell 5).

Tabell 5. Resultat från kvalitativ analys av *L. monocytogenes* tillsatt i låg och medel halter samt negativ kontroll prover

Lab	Metod	Låg halt		Medium halt		FP kontroll		Neg kontroll	
		n	FN	n	FN	n	FP	n	FP
1601	VIDAS	6	0	4	0	4	0	2	0
1602	VIDAS	6	0	4	0	4	0	2	0
1603	VIDAS	6	0	4	0	4	0	2	0
1605	Bax	6	0	4	0	4	0	2	0
1607	Rapid	6	0	4	0	4	0	2	0
1608	NMKL 136	6	4	4	3	4	2	2	0
SLV	NMKL 136	6	0	4	0	4	0	2	0
Totalt		42	4	28	3	28	2	14	0

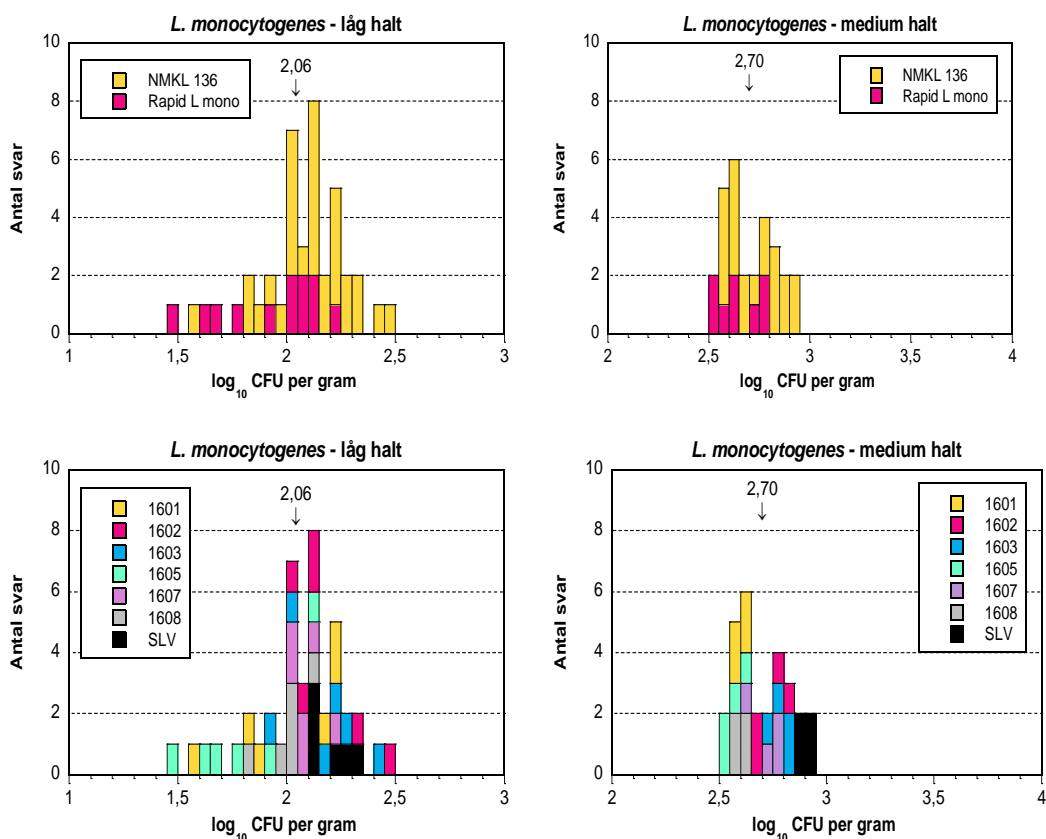
n: antal replikat, *FN*: antal falsknegativa resultat, *FP*: antal falskpositiva resultat, *SLV*: Livsmedelsverket

Majoriteten av laboratorierna rapporterade korrekt resultat för kvantitativ analys (Figur 1 och Tabell 6). Ett laboratorium rapporterade falskpositiva resultat för alla prover som innehåll *L. ivanovii* och *L. seeligeri*. Ytterligare ett laboratorium rapporterade ett falskpositivt svar för det prov som innehåll medium halter av *L. ivanovii* och *L. seeligeri* (Tabell 6).

Tabell 6. Resultat från kvantitativ analys av *L. monocytogenes* tillsatt i låg och medel halter samt negativ kontroll prover

Labb	Metod	Låg halt		Medium halt		FP kontroll		Neg kontroll	
		n	FN	n	FN	n	FP	n	FP
1601	NMKL 136	6	0	4	0	5	0	2	0
1602	NMKL 136	6	0	4	0	5	0	2	0
1603	NMKL 136	6	0	4	0	5	0	2	0
1605	Rapid	6	0	4	0	5	1	2	0
1607	Rapid	6	0	4	0	5	0	2	0
1608	NMKL 136	6	0	4	0	5	5	2	0
SLV	NMKL 136	6	0	4	0	5	0	2	0
Totalt		42	0	28	0	35	6	14	0

n: antal laboratorier som utförde analysen, *FN*: antal falsknegativa resultat, *FP*: antal falskpositiva resultat, *SLV*: Livsmedelsverket



Figur 1. Frekvensdiagram över fördelningen av resultaten för kvantitativ analys av *L. monocytogenes* tillsatt i låg och medium halt. Analysens medelvärde anges ovanför staplarna.

Diskussion

Avsikten med ringtestet var att undersöka svenska officiella livsmedelslaboratoriers förmåga att påvisa *Salmonella* och påvisa/haltbestämma *Listeria* i livsmedel. Kompetensprovningarna som utfördes i projektet skiljer sig från de kompetensprovningar som Livsmedelsverket normalt anordnar. I de senare består provmaterialet av frystorkad serumbuljong med olika blandningar av mikroorganismer i en glasvial. Frystorkat testmaterial i vialer har ett antal fördelar gentemot ringtester med matris: flera analysparametrar kan samtidigt testas med samma material, testmaterialet har lång hållbarhet utan förändringar av organismhalterna och vialerna tar liten plats vilket underlättar förvaring, packning och transporter. Kostnader hålls nere genom en standardiserad och relativt enkel tillverkningsprocedur. Kompetensprovningen inom Zoonosynk bestod av spikade naturliga prov som simulerar verkligheten bättre än organismer i frystorkad buljong. Exempelvis är beredningssteget av provet exkluderat från kompetensprovningen när provet består av frystorkat material i en vial.

Salmonella

Hälften av laboratorierna följde metoden NMKL 71:1999 och ett av dessa laboratorier använde också BAX-metoden parallellt med NMKL-metoden. Resterande fyra laboratorier använde Vidas SLM 48 vilket är en metod validerad mot ISO 6579:2002.

Metoderna NMKL 71:1999 och ISO 6579:2002 är snarlika. Båda baseras på preanrikning i ett oselektivt medium (buffrat peptonvatten(BPV)), följt av anrikning i ett selektivt medium (Rappaport-Vassiliadis-soja-pepton-buljong (RVS)) och slutligen plattspridning på två selektiva agarplattor (xylos-lysin-deoxycholat-agar (XLD)) samt en valfri agarplatta. Till skillnad från NMKL 71:1999 inkluderar ISO 6579:2002 även selektiv anrikning i Muller-Kauffmann tetrathionat/novobiocin-buljong (MKTTn). Konfirmering sker genom biokemiska (t.ex. mannitol och urea) och serologiska (*Salmonella* polyvalent O- och H-antiserum) tester. På XLD bildar typiska *Salmonella* transparenta röda kolonier med ett svart centrum. Som kompletterande substrat till XLD använde flertalet laboratorier Brilliant Grön (BG) agar, vilket detekterar fermentering av laktos. På sådant substrat växer typiska *Salmonella* (som inte kan fermentera laktos) som röda/ljust rosa kolonier.

Det finns några kritiska punkter i analysprocessen som kan påverka resultaten, särskilt när *Salmonella* förekommer i låga halter. Temperaturen för selektiv anrikning är kritisk då en del serotyper som t.ex. Dublin är känsliga för temperaturer över 42 °C men samtidigt är det viktigt att temperaturen inte blir för låg eftersom bakgrundsfloran då kan få överhand. Det är således viktigt att väl kalibrerade vattenbad med omrörning används vid det selektiva anrikningssteget och att anrikningsbuljongen är förvärmad till anrikningstemperaturen (NMKL-metoden) eller till rumstemperatur (ISO-metoden). Agarplattornas ytor ska vara torra innan provet racklas ut.

Alla nio deltagande laboratorier påvisade *S. Enteritidis* i samtliga fyra prover med medium halt (2 CFU/g) vilket tyder på en fungerande analysförmåga. För de 59 proverna med låga halter (0,2 CFU/g) var det fyra prov där *Salmonella* inte påvisades. Dessa fyra analysresultat var utspridda på tre laboratorier och även mellan två olika metoder. Det finns således inte skäl till att misstänka någon systematisk felaktighet i analysprocessen utan snarare att halterna var

mycket nära detektionsgränsen och att det därmed är naturligt att Salmonella inte påvisades i alla prov. Stammen av *S. Enteritidis* som användes i ringtestet ger tydliga kolonier med typiskt utseende på både XLD och Brilliance™ Salmonella-agar.

I ringtestet med *S. Dublin* påvisades bakterien i 38 av 40 prover med medium halter (2 CFU/g) och i 39 av de 60 proverna med låg halt (0,2 CFU/g). Då fördelningen av falsknegativa prover var ojämn mellan laboratorerna så finns det skäl att misstänka skillnader i analysförmåga mellan laboratorerna. Fem laboratorier rapporterade helt korrekta svar medan resterande fyra laboratorier rapporterade mellan 3 och 8 falsknegativa svar. Falsknegativa resultat rapporterades för alla de tre använda metoderna. Två av de tre laboratorerna som rapporterat falsknegativa resultat för *S. Enteritidis* rapporterade fullt korrekta svar för *S. Dublin*. Detta styrker ytterligare teorin om att de låga halterna för *S. Enteritidis* var mycket nära detektionsgränsen.

På Livsmedelsverket växte stammen av *S. Dublin* med typiska kolonier på XLD-plattor men med atypiska urblekta kolonier på det kromogena substratet BriS efter 1 dygns inkubering men flera kolonier blev svagt lila efter 2 dygns inkubering. Stammen är känslig för temperaturer över 42 °C och för höga halter av magnesiumklorid (MgCl₂) i RVS (2). Dessa egenskaper hos stammen kan förklara analysens svårighet och även en del falsknegativa resultat.

Listeria

För analys av *Listeria* använde fem laboratorier certifierade alternativa metoder; VIDAS, BAX och Rapid. Resterande två laboratorier följde metoden NMKL 136.

Analysförfarandet för kvalitativa och kvantitativa analys i NMKL 136 är snarlik metodiken i ISO-metoderna. I den nyligen publicerade ISO-metoden skiljer sig analysförfarandet mer från NMKL-metoden.

Den kvalitativa metoden baseras på preanrikning i en buljong med reducerad selektivitet (half-Fraser-buljong), följt av anrikning i ett selektivt medium (Fraser-buljong). Plattspridning från båda dessa anrikningssteg sker på ALOA-plattor som är selektiva samt på ett andra valfritt selektivt substrat. Konfirmering av *L. monocytogenes* sker genom β-hämolys på blodagar (BA), kolhydratfermentering (fermentering av rhamnos men inte xylos) samt förstärkt respektive minskad β-hämolys i närvaro av *Staphylococcus aureus* och *Rhodococcus equi* (CAMP test) (ISO 11290-1).

I den kvantitativa metoden görs en första suspension av provet i buffrat peptonvatten (BPV) eller i halv-Fraser-buljong, och material överförs sedan från dessa till ALOA. Framväxta kolonier konfirmeras enligt samma metodik som i den kvalitativa metoden.

På ALOA-plattor är *L. monocytogenes* kolonier blå-gröna med en opak zon. På Oxford-agar är kolonierna små och svarta, grå eller mörkbruna med en svart zon. På PALCAM är kolonierna små och grå-gröna eller olivgröna med en svart zon. Vid konfirmering bildar *L. monocytogenes* en smal och klar hämolyszon på blodagar och spjälkar rhamnos men inte xylos. På ALOA och en del andra kromogena substrat bildar *L. ivanovii* och *L. Seeligeri* blå-gröna kolonier med en opak zon som kan misstolkas som *L. monocytogenes*.

På blodbaserade substrat (LMBA) och substrat som påvisar eskulinhydrolys (PALCAM och Oxford) bildar både *L. ivanovii* och *L. Seeligeri* kolonier som liknar *L. monocytogenes*. Vid konfirmering kan stammarna dock särskiljas från *L. monocytogenes*. På blodagar bildar *L. ivanovii* en vid och klar zon medan *L. Seeligeri* bildar en svag zon. Både *L. ivanovii* och *L. Seeligeri* fermenterar xylos men inte rhamnos. Iso-metoden rekommenderar CAMP-test om det är svårt att tolka hämolyszonen på blodagar-plattor.

På Livsmedelsverket växte stammen av *L. monocytogenes* med tydliga kolonier med typiskt utseende på både ALOA och OCLA. En skillnad var dock att vid odling på OCLA utvecklades kolonierna och även zonerna långsammare än vid odling på ALOA. *L. ivanovii* och *L. Seeligeri* bildade blå-gröna kolonier med en opak zon på ALOA. Vid konfirmering (β -hämolys, kolhydratanvändning och CAMP test) kunde stammarna dock särskiljas från *L. monocytogenes*.

Alla laboratorier utom ett hade helt korrekt resultat för den kvalitativa analysen. Dessa laboratorier lyckades påvisa *L. monocytogenes* i alla sex proverna med låg halt (0,2 CFU/g) av *L. monocytogenes*, vilket tyder på bra förmåga att påvisa *L. monocytogenes* i låga halter. Vidare lyckades dessa laboratorier också helt korrekt särskilja *L. monocytogenes* från *L. ivanovii* och *L. seeligeri* vilket tyder på god konfirmeringsförmåga.

Inga falsknegativa prov rapporterades utom från laboratoriet som misslyckades i kvalitativ analys av *L. monocytogenes*. Någon tydlig skillnad i halter kunde inte ses med avseende på metodval. Variationen mellan proverna analyserade av samma laboratorium var mindre än variationen mellan laboratorierna vilket är väntat.

Slutsats

Resultaten från ringtestet visar på tillfredsställande förmåga hos svenska officiella livsmedelslaboratorier för påvisande av salmonella och påvisande och haltbestämning av *Listeria* i livsmedel. Att *S. Enteritidis* inte kunde påvisas i alla proverna med låga halter tros bero på att halten var nära detektionsnivån. Detta då det var flera av laboratorierna som hade problem med enstaka prov och att det inte fanns någon koppling till en specifik metod.

För påvisning av *S. Dublin* i låga halter finns det skäl att misstänka att laboratorierna har olika detektionsnivå och att det mer beror på laboratoriet än på metod. Laboratorierna med falsknegativa resultat rekommenderas att se över analysmetodikerna och då särskilt temperaturen vid anrikningen, som är en känd kritisk punkt.

Förutom för ett laboratorium bedöms detektion och haltbestämning av *Listeria* vara tillfredsställande. Laboratoriet med otillfredsställande resultat har besökts av Livsmedelsverket och orsaken till det undermåliga resultatet har identifierats och rättats till.

Tack!

Ett stort tack riktas till alla som bidragit till projektet. Ett varmt tack till medverkande laboratorier, utan er hade detta projekt inte varit möjligt.

Referenser

1. Myndighetsgemensamt strategidokument, 2013. Salmonella – ett nationellt strategidokument.
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/s/salmonella-ett-nationellt-strategidokument/>
2. Livsmedelsverkets webbsida: <http://livsmedelsverket.se>
3. Buncic, S. (2006). Integrated Food Safety and Veterinary Public Health. Trowbridge. CAB International.
4. Myndighetsgemensamt strategidokument, 2013. Infektion med *Listeria monocytogenes* – ett nationellt strategidokument.
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationsarkiv/i/infektion-med-listeria-monocytogenes-ett-nationellt-strategidokument/>
5. Say Tat Ooi, Bennett Lorber; Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 40, Issue 9, 1 May 2005, Pages 1327–1332.
6. Folkhälsorapportering & statistik, 2016, Listeriainfektion- Kommentarer och specialstatistik.
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/folkhalsorapportering-statistik/statistikdatabaser-och-visualisering/sjukdomsstatistik/listeriainfektion/kommentarer-och-specialstatistik/2016/>
7. Peterz, M. Steneryd. A.C. 1993. Freeze-dried mixed cultures as reference samples in quantitative and qualitative microbiological examinations of food. *J. Appl. Bacteriol.* 74:143-1
8. Mooijan, K.M., During, M. & Nagelkerke, N.J.D. 2003. MICROCRM: Preparation and control of batches of microbiological materials consisting of capsules. RIVM report 250935001/2003. RIVM, Bilthoven, Holland.

Bilaga 1

laboratoriernas analysvar

Alla värden är CFU/g. Streck i tabellen indikerar att analysen inte har utförts.

Provnr	Stam	Halt	1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	SLV
A	S. Enteritidis	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
B	S. Enteritidis	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
C	S. Enteritidis	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
D	S. Enteritidis	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
E	S. Enteritidis	≈ 0,2	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
F	S. Enteritidis	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
G	S. Enteritidis	≈ 0,2	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv
H	S. Enteritidis	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
I	S. Enteritidis	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
J	S. Enteritidis	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
K	Negativ	0	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
L	Negativ	0	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
M	S. Dublin	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
N	S. Dublin	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
O	S. Dublin	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
P	S. Dublin	≈ 2	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
Q	S. Dublin	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Positiv
R	S. Dublin	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv
S	S. Dublin	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
T	S. Dublin	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Positiv
U	S. Dublin	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Positiv
V	S. Dublin	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv

Provnr	Stam	Halt	1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	SLV
A	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Negativ	-	Positiv
B	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Positiv	-	Positiv
C	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Negativ	-	Positiv
D	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Negativ	-	Positiv
E	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Negativ	-	Positiv
F	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 0,2	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Positiv	-	Positiv
G	Negativ	0	Negativ	Negativ	Negativ	-	Negativ	-	Negativ	Negativ	-	Negativ
H	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 1	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Negativ	-	Positiv
I	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 1	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Positiv	-	Positiv
J	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 1	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Negativ	-	Positiv
K	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 1	Positiv	Positiv	Positiv	-	Positiv	-	Positiv	Negativ	-	Positiv
L	Negativ	0	Negativ	Negativ	Negativ	-	Negativ	-	Negativ	Negativ	-	Negativ
M	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 0,2	Negativ	Negativ	Negativ	-	Negativ	-	Negativ	Negativ	-	Negativ
N	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 0,2	Negativ	Negativ	Negativ	-	Negativ	-	Negativ	Positiv	-	Negativ
O	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 1	Negativ	Negativ	Negativ	-	Negativ	-	Negativ	Positiv	-	Negativ
P	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 1	Negativ	Negativ	Negativ	-	Negativ	-	Negativ	Negativ	-	Negativ

Alla värden är Log₁₀ CFU/g.

Prov	Stam	Halt	1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	SLV
1	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 2	2,19	2,49	2,04	-	2,11	-	2,20	2,04	-	2,26
2	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 2	2,2	2,32	2,40	-	1,78	-	2,11	2,11	-	2,34
3	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 2	2,2	2,07	1,91	-	1,90	-	2,08	2,04	-	2,11
4	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 2	1,86	2,13	2,19	-	1,48	-	2,04	2,00	-	2,13
5	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 2	1,56	2,15	2,26	-	1,70	-	2,00	1,85	-	2,10
6	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 2	1,85	2,04	2,24	-	1,60	-	2,08	1,95	-	2,21
7	Negativ	0	0	0	0	-	0	-	0	0	-	0
8	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 3	2,58	2,81	2,80	-	2,54	-	2,76	2,60	-	2,88
9	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 3	2,58	2,76	2,75	-	2,53	-	2,73	2,56	-	2,88
10	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 3	2,63	2,67	2,84	-	2,61	-	2,64	2,60	-	2,92
11	<i>L.monocytogenes</i>	≈ 3	2,6	2,67	2,71	-	2,56	-	2,76	2,57	-	2,90
12	Negativ	0	0	0	0	-	0	-	0	0	-	0
13	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 2	0	0	0	-	0	-	0	1,3	-	0
14	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 2	0	0	0	-	0	-	0	1,3	-	0
15	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 3	0	0	0	-	0	-	0	1,6	-	0
16	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 3	0	0	0	-	0	-	0	1	-	0
17	(<i>L.ivanovii</i>) (<i>L.seeligeri</i>)	≈ 4	0	0	0	-	2,93	-	0	1,3	-	0



Livsmedelsverket

Uppsala Hamnesplanaden 5, SE-751 26

www.livsmedelsverket.se