

~~~~~  
*Bepaling van Salmonella*  
~~~~~

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN.....	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL.....	5
4.1	APPARATUUR	5
4.2	MATERIAAL.....	5
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN.....	5
5.1	REAGENTIA	5
6	PROCEDURE	6
6.1	MONSTERVEROEBEREIDING	6
6.2	MEMBRAANFILTRATIE.....	7
6.3	PRE-AANRIJING IN HET NIET SELECTIEF VLOEIBAAR MEDIUM GEBUFFERD PEPTOON WATER	7
6.4	AANRIJING VAN SALMONELLA IN ÉÉN OF TWEE SELECTIEVE MEDIA	7
6.5	UITPLATING EN IDENTIFICATIE	7
6.6	BIOCHEMISCHE EN SEROLOGISCHE BEVESTIGINGSTESTEN.....	8
7	KWALITEITSCONTROLE	9
8	RAPPORTERING	9
9	REFERENTIES.....	9

1 TOEPASSINGSGEBIED

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van drinkwater, mineraal water enerzijds en grondwater, oppervlaktewater en recreatiewater, en afvalwater anderzijds.

Bepaling van de parameter *Salmonella* in water (ISO 6340).

Salmonella kan een brede waaier aan gastheren infecteren, dieren, en mens inbegrepen. De pathogeniciteit van *Salmonella* is heel uiteenlopend. Het is aanwezig en persistent in de leefomgeving. De aanwezigheid van *Salmonella* in habitats zoals water, kan verklaard worden door fecale besmetting.

Een aangewende analysemethode dient conform de normmethode te zijn. Het meetprincipe mag niet anders zijn, en het isolatiemedium moet hetzelfde zijn. Afwijkingen mogen niet kritisch zijn en geen invloed hebben op een resultaat. Extra stappen zijn aanvaardbaar, zolang ze het resultaat enkel meer ondersteunen.

Theoretisch kan de aanwezigheid van 1 kolonievormende eenheid per 1000 ml bepaald worden. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

2 PRINCIPE

Salmonella zijn gram-negatieve, aërobe, oxidase-negatieve en niet-sporulerende staafjes die gemakkelijk groeien en typische kolonies vormen op eenvoudige media.

De bepaling van de parameter *Salmonella* in water gebeurt via membraanfiltratie, gevolgd door de volgende vier stadia:

- Niet selectieve vooraanrijking: deze dient om verzwakte bacteriën te laten groeien. Hiervoor word(t)(en) na filtratie de filter(s) overgebracht in een niet-selectief bouillon gebufferd pepton water BPW met incubatie bij optimale temperatuur voor mesofiele bacteriën.
- De aanrijking in een selectief vloeibaar medium dient om de verhouding van *Salmonella species* te verhogen ten opzichte van de achtergrondflora. Hiervoor wordt een deel aangerijkt BPW overgebracht in Rappaport Vassiliadis bouillon dat bij verhoogde temperatuur wordt geïncubeerd om te selectiviteit te verhogen. Selenite Cysteïne bouillon kan als tweede selectieve aanrijking worden aangewend bij zware fecale besmetting.
- Uitplantingen vanuit de vloeibare aangerijkte media gebeurt op minstens twee selectieve media voor de detectie van typische *Salmonella*.
- De aanwezigheid van typische *Salmonella* kolonies is geen afdoende bewijs voor de aanwezigheid van *Salmonella species*. De presumptieve *Salmonella* worden onderworpen aan serologische en biochemische testen. Voor de biochemische bevestigingen mag naast de media beschreven in de ISO norm ook een commerciële kit worden gebruikt.

Op aanvraag van een klant kan de species van de isolaten worden geïdentificeerd door een referentielaboratorium.

De aanwezigheid van *Salmonella* wordt voor drinkwater per 1000 ml bepaald.

Voor andere water matrices wordt het te filteren volume beïnvloed door filtratiebeperkingen.

3 OPMERKINGEN

Alle manipulaties -behalve het filtreren- worden uitgevoerd in een laminaire flowkast (4.1.7).

De besmette vaste afval (petrischalen, doekjes, pipettips...) worden in een speciale daartoe bestemde container verwijderd. Na het waarnemen van de resultaten worden de resterende monsters en suspensies verwijderd als vloeibare bacterie-afval.

Glaswerk dat gecontamineerd is met klasse twee bacteriën wordt vóór de afwas eerst geautoclaveerd (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium³⁸ (5.1.16) en nadien met 70% gedenatureerde ethanol (5.1.17).

Vóór het enten van agarmedia in petrischalen, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarschalen gedroogd te worden. Hiervoor worden de schalen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een laminaire flowkast (4.1.7). Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de schalen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 Apparatuur

- 4.1.1 Autoclaaf 121^{+3}_{-0} °C
- 4.1.2 Incubator 37 ± 1 °C
- 4.1.3 Incubator $41,5 \pm 1$ °C
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Vortex
- 4.1.6 Pipetus akku
- 4.1.7 Laminaire flowkast
- 4.1.8 Koelkast 5 ± 3 °C
- 4.1.9 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.10 Membraandispenser met steriele 0,45 µm filters of gelijkwaardig systeem

4.2 Materiaal

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Glazen flessen
- 4.2.3 Wegwerppipetten
- 4.2.4 Entnaald met Pt-öse
- 4.2.5 90mm en 140mm petrischalen

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 Reagentia

- 5.1.1 Gebufferd pepton water (BPW)
- 5.1.2 Rappaport-Vassiliadis medium (RVB of met soya RVS bouillon)
- 5.1.3 Selenite cysteine bouillon (SCB bouillon)
- 5.1.4 Xylose lysine deoxycholaat agar (XLD)
- 5.1.5 Tweede agar medium naar keuze en oordeel van het laboratorium: Rambach; Briljant groen (fenol rood lactose sucrose) BGA/BPLS agar; Bismut sulfiet agar;

Salmonella chromogenic agar of gelijkwaardig medium. Om zo volledig mogelijk alle stammen van het geslacht *Salmonella* te kunnen selecteren moeten minstens twee selectieve '*Salmonella*-media' gebruikt worden. XLD is vastgelegd in de norm en een tweede medium moet gekozen worden in functie van de mogelijke groei uit het spectrum van *Salmonella*. Een combinatie van de media kan bepaald worden uit de specificaties in de handleidingen van de media bij de verschillende merken

5.1.6 Nutriënt agar

Voor de bevestigingstesten:

5.1.7 triple sugar iron agar (TSI)

5.1.8 urea agar Christensen

5.1.9 L-lysine decarboxylatie medium

5.1.10 reagens voor detectie van β -galactosidase

5.1.11 reagens voor Voges-Proskauer reactie (VP)

5.1.12 Kovacs reagens voor indol reactie

of een commerciële biochemische kit

5.1.13 fysiologische zoutoplossing (0,85 % NaCl)

5.1.14 monovalent of polyvalent anti H,O,Vi sera voor *Salmonella* of *Salmonella* Latex Agglutinatie Test of gelijkwaardige test

5.1.15 transport agar slant

5.1.16 Umonium³⁸ 2,5%

5.1.17 70% gedenatureerde ethanol

5.1.18 ultra puur water

5.1.19 *Salmonella* referentie bacterie

6 PROCEDURE

6.1 Monstervoorbereiding

Monsters worden genomen in flessen (4.2.2) gesteriliseerd in een autoclaaf (4.1.1) volgens een welomschreven monstername procedure, en koel getransporteerd. Een monster wordt zo snel mogelijk bij aankomst in het laboratorium geanalyseerd, en maximum gedurende 24 uur bewaard bij $5 \pm 3^\circ\text{C}$ in een koelkast (4.1.8).

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.4) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

6.2 Membraanfiltratie

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). Er worden steriele aangekochte kokers met filter gebruikt, of geflambeerde kokers worden voorzien van steriele filters van 0,45 µm (4.1.10).

6.3 Pre-aanrijking in het niet selectief vloeibaar medium gebufferd peptoon water

De filter(s) word(t)(en) met een ethanol (5.1.17) geflambeerde pincet (4.2.1) aan 50 ml gebufferd peptoon water (5.1.1) aseptisch toegevoegd en geïncubeerd op 37°C (4.1.2) gedurende 18 ± 2 u.

6.4 Aanrijking van *Salmonella* in één of twee selectieve media

Van de gebufferd peptoon suspensie aan de hand van een pipetus (4.1.6):

- 0,1 ml met pipet (4.2.3) in 10 ml RVB/S bouillon (5.1.2) overbrengen en vortexen (4.1.5); incubatie gedurende 24 ± 3 u bij 41,5°C (4.1.3) (aandacht om 42,5°C zeker niet te overschrijden)

en eventueel bij zware fecale besmetting:

- 1 ml met pipet (4.2.3) in 10 ml SCB bouillon (5.1.3) overbrengen en vortexen (4.1.5); incubatie bij 37°C (4.1.2) gedurende 24 ± 3 u.

Belangrijke opmerking: het is aangewezen om de RVB/S steeds verder gedurende 24 u ± 3 u te incuberen, specifiek om traag groeiende *Salmonella* te detecteren. Indien er geen typische *Salmonella* kolonies bij punt 6.5 waargenomen worden, kan na de verdere incubatie opnieuw uitgeplaat worden op de selectieve agarmedia.

6.5 Uitplating en identificatie

Indien voorhanden worden extra grote schalen (4.2.5) geënt. Zoniet worden twee gewone schalen achtereenvolgens geënt door gebruik te maken van eenzelfde entnaald. Tussen het enten van de eerste en de tweede schaal wordt de entnaald niet geflambeerd.

Na incubatie van 24 u ± 3 u:

- met een platinumnaald (4.2.4) wordt vanuit de vloeibare cultuur van zowel RVB/S (5.1.2) als SCB (5.1.3) bouillons telkens één extra grote schaal of twee gewone petrischalen van de selectieve media XLD (5.1.4) en het bijkomend medium (5.1.5) geënt
- incubatie van de XLD schalen (agarbodemp aan de bovenzijde) bij 37°C (4.1.2) gedurende 24 u ± 3 u. Het tweede medium wordt geïncubeerd volgens instructies van de leverancier. Na incubatie wordt de aanwezigheid van typische en mogelijke *Salmonella* kolonies gecontroleerd.

op XLD:

- typische *Salmonella* kolonies hebben een zwart centrum en een licht transparante roodachtige kleur door kleurverandering van de indicator;
- H₂S negatieve varianten van *Salmonella* vertonen een roze kleur en een donkerroos centrum;
- Lactose-positieve *Salmonella* geven gele kolonies met of zonder zwarting.

Op het tweede medium: controle van presumptieve *Salmonella* kolonies volgens de karakteristieken van het aangewend medium.

6.6 Biochemische en serologische bevestigingstesten

6.6.1 selectie van kolonies voor de bevestigingstesten

- voor de bevestigingstesten worden uit beide selectieve media indien mogelijk een vijftal typische of verdachte kolonies met een entnaald (4.2.4) opgepikt en uitgestreken op een voorgedroogde nutriënt agar (5.1.6) plaat, zodanig dat goed geïsoleerde kolonies worden verkregen
- incubatie van de schalen bij 37°C (4.1.2) gedurende 24 ± 3 u
- gebruik zuivere culturen voor de bevestigingstesten

Eén isolaat wordt getest. Wanneer deze negatief blijkt, worden de vier andere isolaten onderworpen aan de bevestigingstesten.

Voor epidemiologische studies worden minstens vijf isolaten getest.

6.6.2 biochemische bevestigingstesten

Op een te onderzoeken zuivere kolonie wordt een biochemische identificatie uitgevoerd met de media en testen:

- TSI (5.1.7) (glucose + zuur + gas positief, zwavelwaterstofvorming positief 92-97% *S. Paratyphi* 10%, lactose negatief 99 % *S. Paratyphi* positief en sucrose negatief 99%);
- ureum hydrolyse op urea agar Christensen (5.1.8) (99% negatief);
- lysine-decarboxylatie in L-lysine decarboxylatie medium (5.1.9) (95 % positief; *S. Paratyphi* negatief; *S. Typhi* 98% positief)
- galactosidase (5.1.10) reactie (negatief 98 %);
- VP (5.1.11) reactie (negatief);
- Indol (5.1.12) productie (99% negatief).

Deze testen kunnen eveneens uitgevoerd worden met een commerciële biochemische kit, en indien nodig met de hierboven vernoemde testen aangevuld worden.

De interpretatie van de resultaten van een identificatiekit gebeurt volgens de daarbij horende handleiding.

Op de presumptieve *Salmonella* stammen wordt verder een serologische confirmatie uitgevoerd.

6.6.3 serologische bevestigingstest

Elimineren van autoagglutinerende stammen:

Breng op een onderlaag een druppel zoutoplossing (5.1.13) en los hierin aan de hand van een entnaald (4.2.4) een deel van een verdachte kolonie. Door ronddraaiende beweging gedurende 30-60 s wordt de autoagglutinatie nagegaan. Indien deze positief is wordt er verder geen serologische test gedaan.

Op elke (niet auto-agglutinerende) zuivere kolonie wordt de agglutinatie test (5.1.14) uitgevoerd voor de detectie van de aanwezigheid van *Salmonella* O-, en/of Vi- en/of H-antigenen. De test wordt uitgevoerd volgens de richtlijnen van de producent. De agglutinatie wordt vergeleken met een positieve en negatieve controle.

Indien agglutinatie optreedt wordt de reactie positief gerapporteerd.

6.6.4 species identificatie

Indien de vereiste er is voor species identificatie, wordt een isolaat hiervoor geënt in transport agar slant (5.1.15). De tubes worden verstuurd naar een erkend instituut waar de definitieve typering kan gebeuren.

7 KWALITEITSCONTROLE

Inzetten van een blanco controle bij elke meetreeks: wordt getest door een volume steriel water (5.1.18) (gelijkwaardig aan het monstervolume) te filtreren en verder te behandelen als een monster. Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een *Salmonella* referentie bacterie (5.1.19).

De resultaten van de positieve en negatieve controlemonsters worden genoteerd.

Indien de resultaten van de positieve controlemonsters niet met de vooropgestelde waarnemingen overeenkomen, of de blanco controle een positief resultaat geeft wordt de proef als niet betrouwbaar beschouwd. De test wordt dan opnieuw uitgevoerd.

De analyseverantwoordelijke volgt de test op en beslist over de geldigheid van de resultaten. Validatie van de analysemethode: herhaalbaarheid testen.

8 RAPPORTERING

- In functie van de resultaten en interpretatie wordt de aan - of afwezigheid van *Salmonella* uitgedrukt in het geanalyseerd volume monster

Rapport

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de gebruikte methode
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

9 REFERENTIES

ISO 6340 (1995) Water quality -Detection of *Salmonella* species.

ISO/PRF 8199 (draft 2de versie) 2004 Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.

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