



Verwerkte mest – Detectie van Salmonella



1 WERKWIJZE

De detectie van *Salmonella* omvat de opeenvolgende stadia:

- a. preaanrijking in een niet selectief vloeibaar medium
- b. aanrijking van *Salmonella* in twee selectieve media na de pre-aanrijking
- c. uitplating en identificatie
- d. biochemische en serologische bevestigingstesten

2 MEDIA EN MATERIAAL

- a. Gebufferd peptoon water BPW
- b. Rappaport-Vassiliadis medium met soya RVS
- c. Muller-Kauffmann tetrathionaat novobiocine bouillon MKTTn
- d. Xylose lysine deoxycholaat agar XLD (in extra grote schalen 140mm)
- e. 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.
- f. Nutriënt agar
- g. Triple sugar/iron agar TSI
- h. Urea agar Christensen
- i. L-lysine decarboxylation medium
- j. Reagens voor detectie van β -galactosidase
- k. Reagens voor Voges-Proskauer reactie
- l. Reagens voor indol reactie
- m. Fysiologische zoutoplossing (0,85 % NaCl)
- n. Monovalent of polyvalent anti H,O,Vi sera voor *Salmonella* of *Salmonella* Latex Agglutinatie Test of gelijkwaardige test
- o. Autoclaaf; incubatoren van $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, waterbad op $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, geschikt glaswerk, pipetten, pH-meter, petrischalen, entnaald
- p. Stomacher toestel of gelijkwaardige homogenisator

3 PROCEDURE

3.1 Initieel suspenderen van monster en pre-aanrijking in een niet selectief vloeibaar medium (gebufferd peptoon water)

Aan 25 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak 225 ml gebufferd peptoon water aseptisch toevoegen (1/10 massa/volume verhouding)

Als de monsters fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-) zak, vóór het homogenisatieproces

- a. homogenisatie in de homogenisator gedurende 2 minuten
- b. de zak wordt afgesloten met een clips of tape

- c. de stomacherzak wordt geïncubeerd bij 37°C gedurende 18 uur ± 2 uur.

3.2 Aanrijking van Salmonella in twee selectieve media

Uit de stomacherzak wordt van de gebufferd peptoon suspensie :

- 0,1 ml in 10 ml RVS bouillon getransfereerd: incubatie bij 41,5°C ± 1°C (aandacht om 42,5°C zeker niet te overschrijden) gedurende 24 uur ± 3 h
- 1 ml in 10 ml MKTTn bouillon getransfereerd: incubatie bij 37°C gedurende 24 uur ± 3 h.

3.3 Uitplating en identificatie

Indien voorhanden worden extra grote schalen 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 geflammeerd.

Na incubatie van 24 uur ± 3 uur:

- met een platinumnaald wordt vanuit de vloeibare cultuur van zowel RVS als MKTTn bouillons telkens één extra grote schaal of twee gewone petrischalen van de selectieve media XLD en het bijkomend medium geënt.
- Incubatie van de XLD schalen (agarbodem aan de bovenzijde) bij 37°C gedurende 24 uur ± 3 uur. 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 met een donkerroos centrum
 - lactosepositieve *Salmonella* geven gele kolonies met of zonder zwarting
- op het tweede medium: controle van presumptieve *Salmonella* kolonies volgens de karakteristieken van het aangewend medium.

3.4 Biochemische en serologische bevestigingstesten

3.4.1 Selectie van kolonies voor de bevestigingstesten

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

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

Voor epidemiologische studies worden minstens vijf isolaten getest.

3.4.2 Biochemische bevestigingstesten

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

Triple Sugar Iron agar TSI (glucose + zuur + gas positief, zwavelwaterstofvorming positief 92-97% *S. Paratyphi* 10%, lactose negatief 99 % *S. Paratyphi* positief en sucrose negatief 99%)

Ureum hydrolyse (99% negatief)

Lysine-decarboxylatie (95 % positief; *S. Paratyphi* negatief; *S. Typhi* 98% positief)

β -Galactosidase reactie (negatief 98 %)

Voges-Proskauer VP reactie (negatief)

Indolproductie (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.

Als *Salmonella* stammen worden geïdentificeerd wordt een serologische confirmatie uitgevoerd.

3.4.3 Serologische bevestigingstest

Elimineren van autoagglutinerende stammen:

Breng op een onderlaag een druppel zoutoplossing en los daarin aan de hand van een entnaald een deel van een verdachte kolonie. Door ronddraaiende beweging gedurende 30-60 s wordt de autoagglutinatie nagegaan. Als die positief is wordt er verder geen serologische test gedaan.

Op elke (niet auto-agglutinerende) zuivere kolonie wordt de agglutinatie test 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.

Als agglutinatie optreedt, wordt de reactie positief gerapporteerd.

3.4.4 Species identificatie

Als de noodzaak er is voor species identificatie, wordt een isolaat daarvoor geënt in transport agar slant. De tubes worden verstuurd naar het een erkend instituut waar de definitieve typering kan gebeuren.

4 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

In functie van de resultaten en interpretatie wordt de aan - of afwezigheid van *Salmonella* uitgedrukt in 25 g monster.

In het rapport wordt eveneens de gebruikte methode vermeld of wordt ernaar verwezen.

5 KWALITEITSCONTROLE

Inzetten van een blanco controle bij de selectieve media bij elke meetreeks.

Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia.

Validatie van de analysemethode op verschillende matrices (natte en ingedroogde mest): herhaalbaarheid testen. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een referentie-*Salmonella*-stam en behandeld als elk ander onbekend monster.

6 REFERENTIE

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