

## MICROBIOLOGISCHE ANALYSES VAN EINDPRODUCTEN BIJ DE VERWERKING VAN DIERLIJK AFVAL

### 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt CMA/4/A van juni 2005.

De microbiologische analyses van de eindproducten bij de verwerking van dierlijk afval omvatten de volgende procedures: monsternamen en monstervoorbereiding, bepaling van het aantal *Enterobacteriaceae*, detectie van *Salmonella* en bepaling van *Clostridium perfringens*.

### 2 PRINCIPE

De hygiëne-eisen voor de eindproducten van dierlijk afval worden beschreven in de normen gespecificeerd in de Verordening (EG) Nr. 1774/2002 van 3 oktober 2002 tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften inzake niet voor menselijke consumptie bestemde dierlijke bijproducten

- Bijlage V, Hoofdstuk III, Methode 7
- Bijlage VII, Hoofdstuk I D 10.

Elke door de bevoegde autoriteit goedgekeurde verwerkingsmethode waarvoor aan de bevoegde autoriteit is aangetoond dat het eindproduct gedurende één maand dagelijks is bemonsterd en is voldaan aan de volgende microbiologische normen:

a) Materiaalmonsters die onmiddellijk na de warmtebehandeling worden genomen:

*Clostridium perfringens*: geen in 1 g.

b) Materiaalmonsters die op het verwerkingsbedrijf genomen worden uit de opslag van de eindproducten of bij vrijgave ervan voor gebruik:

*Salmonella*: geen in 25 g:  $n = 5, c = 0, m = 0, M = 0$   
*Enterobacteriaceae*:  $n = 5, c = 2, m = 10, M = 300$  in 1 g

waarbij

$n$  = aantal te testen monsters;

$m$  = drempelwaarde voor het aantal bacteriën; het resultaat wordt als bevredigend beschouwd als het aantal bacteriën in geen enkel monster groter is dan  $m$ ;

$M$  = maximumwaarde voor het aantal bacteriën; het resultaat wordt als onbevredigend beschouwd als het aantal bacteriën in één of meer monsters gelijk is aan of hoger ligt dan  $M$ ; en

$c$  = aantal monsters waarvoor de bacterietelling een resultaat tussen  $m$  en  $M$  te zien mag geven en waarbij het monster nog als aanvaardbaar wordt beschouwd als het resultaat van de bacterietelling voor de overige monsters niet hoger is dan  $m$ .

Specifieke hygiëne-eisen voor het verwerken en het in handel brengen van verwerkte dierlijke eiwitten en andere verwerkte producten die als voedermiddel gebruikt kunnen worden en specifieke eisen voor de erkenning van categorie 3-verwerkingsbedrijven.

Materiaalmonsters die op het verwerkingsbedrijf genomen worden uit de opslag van de eindproducten of bij vrijgave ervan voor gebruik moeten voldoen aan de onder b) voormelde microbiologische normen.

### 3 MONSTERNAME

#### 3.1 Materiaal

Alle voorbereidingen en handelingen dienen te gebeuren volgens aseptische technieken en met steriel materiaal om een microbiologische contaminatie via uitwendige bronnen van de monsters te vermijden. De uitrusting en containers moeten rein en steriel zijn. Ze zijn steriel aangekocht of gesteriliseerd door natte of droge sterilisatie of met ethanol gereinigd.

De glazen of plastic containers waarin de monsters worden aangebracht:

- zijn water- en vetproef, onoplosbaar, bestand tegen hoge temperatuur en niet-absorberend;
- hebben de gepaste afmetingen om telkens 200 g meel/droog materiaal (gelatine) of 200 ml vloeibare (vet) fractie te bevatten;
- hebben een veilige afsluiting.

Het volgend aantal containers moet voorzien worden:

- voor *Enterobacteriaceae* en *Salmonella*: 5 voor analyses + 5 voor tegenexpertise;
- voor *Clostridium perfringens*: 1 voor analyses + 1 voor tegenexpertise;
- een extra aantal containers als veiligheidsmarge.

De uitrusting (lepels, zuivere schop of handschep, gutsboor ed.) en containers zijn rein en steriel. Ze zijn steriel aangekocht of gesteriliseerd door:

- natte sterilisatie 121°C , 15 min;
- droge sterilisatie 170°C - 180°C, minstens 1 u;
- met ethanol te reinigen en indien mogelijk te flamberen; indien het gebruik van een vlam te risicovol is, dan wordt volledige verdamping van ethanol afgewacht.

Al het nodige materiaal om hygiënisch te werken (handschoenen, reinigingsdoeken ed.) evenals het verzegelingsmateriaal, labels en stift moeten voorhanden zijn.

Een koelbox is nodig voor het transport indien de monsters op voorhand werden genomen en in tussentijd koel werden bewaard.

#### 3.2 Procedure

##### 3.2.1 Monsternemer

- de monsternemer is getraind voor de juiste uitvoering van de techniek
- er is geen interferentie van derden, wel assistentie onder eigen verantwoordelijkheid
- voorzorgen worden genomen om contaminatie te vermijden zowel bij de monsterneming (handen wassen) als bij de verzending

##### 3.2.2 Monsternameverslag, verzegeling en labels

Bij de monstername wordt een monsternameverslag opgesteld en worden de monsters verzegeld en voorzien van de nodig labels.

Vermeldingen in het monsternameverslag:

- naam van de monsternemer;
- naam van de betrokken partijen;
- plaats, datum, punt en tijd van monstername;
- aard en oorsprong van het lot;
- hoeveelheid en aantal monsters van het lot;
- transportwijze;
- manier van monstername;
- aanduiding van verzegeling van de monsters;

- plaats waarheen de monsters moeten worden verstuurd;
- relevante omstandigheden die de monsternamen hebben beïnvloed;
- colli, omgevingsomstandigheden, specifieke informatie betreffende de materiaalstromen waarvan monsters worden genomen.

Elk labomonster is verzegeld en voorzien van een label met de volgende vermeldingen:

- aard en oorsprong van het lot;
- plaats en datum van de monsternamen;
- nummer en kenmerk van de loten waarvan monsters zijn genomen;
- referentie van het monsternemingsverslag of kopie.

### 3.2.3 Aantal monsters

Op materiaalmonsters die onmiddellijk na de warmtebehandeling worden genomen wordt *Clostridium perfringens* bepaald.

Op materiaalmonsters die tijdens de opslag bij het verwerkingsbedrijf of bij de vrijgave ervan uit het verwerkingsbedrijf worden genomen worden *Salmonella* en *Enterobacteriaceae* bepalingen uitgevoerd.

De hoeveelheid monster dient voldoende groot te zijn om de vereiste analyses minstens twee maal te kunnen doen, alsook om nog een tegenanalyse uit te kunnen voeren.

Om de evaluatie van de voorwaarden opgesteld in Vlarem II mogelijk te maken, wordt van elke stroom geproduceerde eindproducten dierlijk afval het volgende aantal monsters genomen:

voor de *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* analyses, twee reeksen monsters van:

- vijf deelmonsters van 200 g. Indien een monster van een bulkvoorraad dient genomen te worden, dan moet het monster een gemiddelde samenstelling hebben die representatief is voor de hele hoop. Daarom wordt per monsternamen één mengmonster genomen dat samengesteld is uit vijf grepen die op verschillende plaatsen (monsternamenpunten) in de hoop genomen worden.
- vijf deelmonsters van 200 g van of één monster van 1000 g indien het om een afvalstroom gaat komende uit één punt, waarbij het monster van  $\pm 1000$  g dan in het laboratorium ingedeeld wordt in vijf deelmonsters.

voor de *Clostridium perfringens* analyses, twee reeksen monsters van:

- één monster van  $\pm 200$  g of  $\pm 200$  ml aan de afvoer van de warmtebehandeling.

### 3.2.4 Transport, ontvangst en monsterconservering

Het transport gebeurt:

- zo snel mogelijk na de monsternamen;
- met behoud van bewaartemperatuur (gekoelde monsters bewaren bij  $5\pm 3^\circ\text{C}$  in het geval monsters reeds op voorhand werden genomen en koel gestockeerd; transport in een koelbox);
- van zonlicht beschermd.

Bij aankomst moeten de monsters onbeschadigd en verzegeld zijn.

Eisen bij ontvangst en stockage:

- monsternamenverslag en label moeten aanwezig zijn;
- noteren van:
  - datum van ontvangst;
  - hoedanigheid en temperatuur;
  - soort analyses;
  - monster bestaande uit deelmonsters;
- een monster in een beschadigde verpakking wordt overgebracht in een andere onbeschadigde steriele verpakking voor stockage;
- de monsters worden vóór analyse gestockeerd gedurende maximum 24 u na monsternamen bij een temperatuur van  $1^\circ\text{C}$  -  $5^\circ\text{C}$ ;
- elk monster na analyse in de diepvriezer bewaren gedurende één maand.

## 4 MONSTERVEROORBEREIDING (ISO 6887-2:2003)

### 4.1 Materiaal en uitrusting

Er wordt gewerkt in een propere en tochtvrije werkruimte bestemd voor bacteriologisch onderzoek. Een laminaire flow kast moet voorhanden zijn. De werktafel wordt voor en na gebruik ontsmet. Het nodige steriel materiaal voor de verpakking te openen en voor het scheppen van de monsters moet aanwezig zijn (steriele lepels, schaar, pincet).

De sterilisatie van de uitrusting gebeurt door:

- natte sterilisatie 121°C , 15 min;
- droge sterilisatie 170°C - 180°C, minstens 1 u
- met ethanol te flamberen.

Een weegtoestel is aanwezig en laat toe om monsters aseptisch af te wegen.

Het homogeniseren in een homogenisator ("Stomacher") gebeurt in steriele plastic zakken. De zakken moeten een zodanige capaciteit hebben dat het monster met het vereiste volume dilutievloeistof behoorlijk kan vermengd worden (doorgaans een inhoud van 400 ml).

### 4.2 Principe

Na het openen van de verpakking worden de deelmonsters rechtstreeks in steriele stomacherzakken aseptisch afgewogen; hierbij wordt maximale homogeniteit nagestreefd. In functie van de microbiologische analyse worden de volgende hoeveelheid afgewogen:

- voor *Enterobacteriaceae* 5 maal 10 g materiaal;
- voor *Salmonella* 5 maal 25 g materiaal;
- voor *Clostridium perfringens* 1 maal 10 g materiaal.

De analyses worden zo veel mogelijk zonder onderbrekingen uitgevoerd, zoniet worden de monsters steeds gestockeerd in de koelkast.

Van het te analyseren eindproduct dierlijk afval wordt een initiële suspensie in gebufferd pepton water (zie 5.4.1, 6.4.1, 7.4.1) gemaakt om een zo uniform mogelijke verdeling van micro-organismen vanuit het monster te bekomen.

Voor de *Salmonella* analyse dient deze stap als vooraanrijking.

Voor de bepaling van *Enterobacteriaceae* en *Clostridium perfringens* dient telkens het volledige volume van deze initiële suspensie, dat representatief is voor 1 gram monster, te worden getest. Van deze suspensie dienen geen decimale verdunningen te worden uitgevoerd. Wanneer te hoge aantallen kve per plaat worden bereikt met de initiële suspensie voldoet een monster niet aan de eisen beschreven onder punt 2.

Indien zuiver vet als eindproduct dient getest te worden, wordt 10g/l sorbitan monooleaat (Tween 80) toegevoegd aan het gebufferd pepton water, dit om het emulsifiëren te verbeteren.

## 5 DETECTIE VAN ENTEROBACTERIACEAE (ISO 21528-2:2004)

### 5.1 Werkwijze

Detectie van *Enterobacteriaceae* gebeurt door:

- isolatie en telling van presumptieve *Enterobacteriaceae* door analyse van de initiële suspensie met het selectief medium Violet Red Bile Glucose agar via de gietplaatmethode;
- uitstrijken van kolonies presumptieve *Enterobacteriaceae* op een niet selectief medium en bevestiging van glucose fermentatie en aanwezigheid van oxidase;
- berekenen van het aantal *Enterobacteriaceae* per gram monster aan de hand van het aantal bevestigde typische kolonies.

## 5.2 Apparatuur en materiaal

- 5.2.1 stomacherzakken
- 5.2.2 stomacher toestel of gelijkwaardige homogenisator
- 5.2.3 pipetten
- 5.2.4 petrischalen
- 5.2.5 waterbad op 45°C ± 1°C
- 5.2.6 laminaire flowkast
- 5.2.7 incubator van 37°C ± 1°C
- 5.2.8 entnaald

## 5.3 Reagentia

- 5.3.1 gebufferd pepton water (BPW)
- 5.3.2 Violet Red Bile Glucose agar (VRBG-agar)
- 5.3.3 nutriënt agar
- 5.3.4 oxidasetest
- 5.3.5 glucose agar (in tubes)

## 5.4 Procedure

Alle manipulaties – behalve stomachen zelf – worden uitgevoerd in een laminaire flowkast (5.2.6)

### 5.4.1 Initieel suspenderen van een monster in gebufferd pepton water

- aan 10 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak (5.2.1) 90 ml gebufferd pepton water (5.3.1) aseptisch toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding), indien het monster fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-) zak, vóór het homogenisatieproces
- homogenisatie in de homogenisator (5.2.2) gedurende 2 minuten
- onmiddellijk wordt uit de stomacherzak van de gebufferd pepton suspensie met pipet (5.2.3) in tienvoud 1 ml<sup>1</sup> van het te analyseren monsterextract overgebracht in tien lege en steriele petrischalen (5.2.4) (10 ml suspensie is representatief voor 1 gram monster), de tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het gieten van VRBG-agar moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 15 min niet overschrijden
- petrischalen vullen met ± 20 ml vloeibaar VRBG-agar (5.3.2) bewaard bij 44 – 46°C in een waterbad (5.2.5)
- entmateriaal en medium mengen door het uitvoeren van horizontale bewegingen;
- agar laten stollen en drogen in laminaire flow (5.2.6) en geïnverteerd incuberen bij 37°C (5.2.7) gedurende 24 u ± 2 u

### 5.4.2 Telling en selectie van kolonies voor bevestiging

- de roze, rode of purperen kolonies (met of zonder dieprode halo-precipitatie) zijn presumptieve *Enterobacteriaceae* en worden geteld
- selecteer willekeurig vijf presumptieve kolonies uit de tien schalen voor biochemische bevestiging. Indien geen karakteristieke kolonies aanwezig zijn, kies dan vijf witachtige kolonies

### 5.4.3 Subcultuur van de geselecteerde kolonies

- strijk de vijf geselecteerde kolonies met een entnaald (5.2.8) op nutriënt agar (5.3.3) schalen voor bevestiging
- incubatie bij 37°C (5.2.7) gedurende 24 u ± 2 u
- selecteer welgeïsoleerde kolonies uit elk van de geïncubeerde schalen

<sup>1</sup> Vijf maal 2 ml gebufferd pepton suspensie analyseren is eveneens uitvoerbaar

#### 5.4.4 Biochemische bevestigingstesten

Oxidase reactie

- voer de oxidasetest (5.3.4) uit volgens de richtlijnen van de producent met een deel van een gekozen kolonie, en dit uit de vijf verschillende schalen

Fermentatietest

- ent dezelfde kolonies via steekenting telkens in één tube glucose agar (5.3.5)
- incubatie van de tubes bij 37°C (5.2.7) gedurende 24 u ± 2 u
- indien een gele kleur voorkomt doorheen de inhoud van de tube is de reactie positief

Interpretatie van de biochemische testen

- oxidase-negatieve en glucose-positieve kolonies zijn bevestigd als *Enterobacteriaceae*.

#### 5.4.5 Berekening van het resultaat (zie ISO 7218: Amd. 1)

Sommeer de aantallen presumptieve kolonies van de tien petrischalen (= C).

Bereken het aantal *Enterobacteriaceae* a in 1 gram monster:

$$a = b/A \times C$$

met b het aantal geconfirmeerde kolonies

en A het aantal geïnoculeerde kolonies ter bevestiging (=5).

#### 5.5 Weergave van de resultaten

Het aantal *Enterobacteriaceae* wordt uitgedrukt als aantal kve in 1 g monster.

Indien telkens per plaat meer dan 150 *Enterobacteriaceae* zijn bepaald wordt het aantal

*Enterobacteriaceae* gerapporteerd als > 750 kve/g of > 1500 kve/g monster, afhankelijk of er 2 ml in vijfvoud of 1 ml in tienvoud is geanalyseerd.

Indien *Enterobacteriaceae* afwezig zijn wordt <1 kve/g monster gerapporteerd.

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

#### 5.6 Kwaliteitscontrole

Inzetten van een blanco controle bij de selectieve media bij elke meetreeks en inzetten van een positieve controle per lot analysemedia.

Validatie van de analysemethode op verschillende matrices (vet of meel/gelatine): herhaalbaarheid testen. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een referentie-*Enterobacteriaceae*-stam en behandeld als elk ander onbekend monster.

De juistheid afleiden uit ringtestresultaten.

### 6 DETECTIE VAN SALMONELLA (ISO 6579:2002 EN ISO 6579:2002/AMD.1:2007)

#### 6.1 Werkwijze

De detectie van *Salmonella* omvat de opeenvolgende stadia:

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

## 6.2 Apparatuur en materiaal

- 6.2.1 stomacherzakken
- 6.2.2 stomacher toestel of gelijkwaardige homogenisator
- 6.2.3 pipetten
- 6.2.4 90mm en 140mm petrischalen
- 6.2.5 incubator van 37°C ± 1°C
- 6.2.6 incubator van 41,5°C ± 1°C
- 6.2.7 entnaald
- 6.2.8 laminaire flowkast

## 6.3 Reagentia

- 6.3.1 gebufferd pepton water (BPW)
- 6.3.2 **Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV)**
- 6.3.3 Muller-Kauffmann tetrathionaat novobiocine bouillon (MKTTn bouillon)
- 6.3.4 xylose lysine deoxycholaat agar (XLD)
- 6.3.5 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
- 6.3.6 nutriënt agar

Voor de bevestigingstesten:

- 6.3.7 triple sugar iron agar (TSI)
- 6.3.8 urea agar Christensen
- 6.3.9 L-lysine decarboxylation medium
- 6.3.10 reagens voor detectie van β-galactosidase
- 6.3.11 reagens voor Voges-Proskauer reactie (VP)
- 6.3.12 reagens voor indol reactie  
of een commerciële biochemische kit
- 6.3.13 fysiologische zoutoplossing (0,85 % NaCl)
- 6.3.14 monovalent of polyvalent anti H,O,Vi sera voor *Salmonella* of *Salmonella* Latex Agglutinatie Test of gelijkwaardige test
- 6.3.15 transport agar slant

## 6.4 Procedure

Alle manipulatie – behalve het stomachen zelf – worden uitgevoerd in een laminaire flowkast (6.2.8).

### 6.4.1 Initieel suspenderen van monster en pre-aanrijking in een niet selectief vloeibaar medium (gebufferd pepton water)

- aan 25 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak (6.2.1) 225 ml gebufferd pepton water (6.3.1) aseptisch toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding). Indien de monsters fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-) zak, vóór het homogenisatieproces
- homogenisatie in de homogenisator (6.2.2) gedurende 2 minuten
- de zak wordt afgesloten met een clips of tape
- de stomacherzak wordt geïncubeerd bij 37°C (6.2.5) gedurende 18 u ± 2 u



#### 6.4.2 Aanrijking van *Salmonella* in twee selectieve media

##### De MSRv-platen en MKTTn bouillon op kamertemperatuur brengen.

Uit de stomacherzak wordt van de gebufferd pepton suspensie:

- 0,1 ml met pipet (6.2.3) op de MSRv-platen (6.3.2) aanbrengen via 3 druppels suspensie. De 3 druppels die in totaal 0,1 ml omvatten op gelijke afstand van elkaar op het oppervlak van het medium aanbrengen: incubatie bij 41,5°C (6.2.6) (aandacht om 42,5°C zeker niet te overschrijden) gedurende 24 u ± 3 u zonder de platen te zwenken
- 1 ml met pipet (6.2.3) in 10 ml MKTTn bouillon (6.3.3) overbrengen: incubatie bij 37°C (6.2.5) gedurende 24 u ± 3 u

**Belangrijke opmerking:** het is aangewezen om de MSRv en MKTTn steeds verder gedurende 24 u ± 3 u te incuberen, specifiek om traag groeiende *Salmonella* te detecteren. Indien er geen typische *Salmonella* kolonies bij punt 6.4.3 waargenomen worden, kan na de verdere incubatie opnieuw uitgeplaat worden op de selectieve agarmedia.

#### 6.4.3 Uitplating en identificatie

Positieve MSRv platen vertonen een grijs-witte, troebele zone die zich uitstrekt vanuit de geënte druppel. De troebele zone wordt gekenmerkt door een witte halo met een duidelijk gedefinieerde rand.

Voor de uitplating worden -indien voorhanden- extra grote schalen (6.2.4) 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 u ± 3 u:

- met een platinumnaald (6.2.7) wordt van **zowel vanuit de platen MSRv** (6.3.2) als vanuit de vloeibare cultuur MKTTn (6.3.3) bouillon telkens één extra grote schaal of twee gewone petrischalen van het selectieve medium XLD (6.3.4) en het bijkomend medium (6.3.5) geënt;
- incubatie van de XLD schalen (agarbodem aan de bovenzijde) bij 37°C (6.2.5) 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;
  - H<sub>2</sub>S negatieve varianten van *Salmonella* vertonen een roze kleur en 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.
- **Indien de platen negatief zijn na 24 u incubatie, nogmaals 24 ± 3 u incuberen.**

### 6.5 Biochemische en serologische bevestigingstesten

#### 6.5.1 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 (6.2.7) opgepikt en uitgestreken op een nutriënt agar (6.3.6) plaat, zodanig dat goed geïsoleerde kolonies worden verkregen
- incubatie van de schalen bij 37°C (6.2.5) gedurende 24 u ± 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.



### 6.5.2 Biochemische bevestigingstesten

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

- TSI (6.3.7) (glucose + zuur + gas positief, zwavelwaterstofvorming positief 92-97% *S. Paratyphi* 10%, lactose negatief 99 % *S. Paratyphi* positief en sucrose negatief 99%);
- ureum (6.3.8) hydrolyse (99% negatief);
- lysine-decarboxylatie (6.3.9) (95 % positief; *S. Paratyphi* negatief; *S. Typhi* 98% positief)
- galactosidase (6.3.10) reactie (negatief 98 %);
- VP (6.3.11) reactie (negatief);
- Indol (6.3.12) 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.

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

### 6.5.3 Serologische bevestigingstest

Elimineren van autoagglutinerende stammen:

Breng op een onderlaag een druppel zoutoplossing (6.3.13) en los hierin aan de hand van een entnaald (6.2.7) 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 (6.3.14) 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.

### 6.5.4 Species identificatie

Indien de noodzaak er is voor species identificatie, wordt een isolaat hiervoor geënt in transport agar slant (6.3.15). De tubes worden verstuurd naar een erkend instituut waar de definitieve typering kan gebeuren.

## 6.6 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.

## 6.7 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 (vet of meel/gelatine): herhaalbaarheid testen. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een referentie-*Salmonella*-stam en behandeld als elk ander onbekend monster.

## 7 DETECTIE VAN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (ISO 7937:2004)

### 7.1 Werkwijze

Detectie van *Clostridium perfringens* gebeurt door:

- isolatie en telling van karakteristieke kolonies door analyse van de initiële suspensie met het selectief medium SC agar via de gietplaatmethode;
- bevestigen van karakteristieke kolonies;
- berekenen van het aantal *Clostridium perfringens* per gram monster aan de hand van het aantal bevestigde kolonies.

### 7.2 Apparatuur en materiaal

- 7.2.1 stomacherzakken
- 7.2.2 stomacher toestel of gelijkwaardige homogenisator
- 7.2.3 pipetten
- 7.2.4 petrischalen
- 7.2.5 waterbad op  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7.2.6 laminaire flow
- 7.2.7 incubator van  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7.2.8 waterbad op  $46^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- 7.2.9 entnaald **met oog**
- 7.2.10 anaërobe jar
- 7.2.11 **waterbad op  $99^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$**
- 7.2.12 **steekentnaald**
- 7.2.13 **koelkast  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$**

### 7.3 Reagentia

- 7.3.1 gebufferd pepton water BPW
- 7.3.2 (T)SC agar
- 7.3.3 reagentia voor anaërobie**

Voor de bevestigingstesten:

- 7.3.4 fluid Thioglycolaat Medium TGM
- 7.3.5 lactose sulfiet medium LS (met Durham buisje)
- 7.3.6 nitraat motiliteitsmedium NMM**
- 7.3.7 lactose gelatine medium LGM**
- 7.3.8 5-amino-2-naphthaleensulfonzuur oplossing NIT A**
- 7.3.9 sulfanilic zuur oplossing NIT B**
- 7.3.10 zink poeder**

of een commerciële biochemische kit

### 7.4 Procedure

Alle manipulaties – behalve het stomachen zelf – worden uitgevoerd in een laminaire flowkast (7.2.6)

#### 7.4.1 Initieel suspenderen van een monster in gebufferd pepton water

- aan 10 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak (7.2.1) 90 ml gebufferd pepton water (7.3.1) aseptisch toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding). Indien het monster

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

- homogenisatie in de homogenisator (7.2.2) gedurende 2 minuten
- onmiddellijk wordt uit de stomacherzak van de gebufferd pepton suspensie met pipet (7.2.3) in tienvoud 1 ml<sup>2</sup> van het te analyseren monsterextract overgebracht in tien lege en steriele schalen (7.2.4) (10 ml suspensie is representatief voor 1 gram monster). De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het gieten van SC moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 15 min niet overschrijden
- petrischalen vullen met ± 15 ml vloeibaar SC (7.3.2) agar medium bewaard bij 44 - 46°C in een waterbad (7.2.5)
- entmateriaal en medium mengen door draaiende bewegingen met de schalen
- agar laten stollen en nadien overgieten met een tweede laag (± 10ml) vloeibaar SC medium (7.3.2)
- agar laten stollen en drogen in laminaire flow (7.2.6) en geïnverteerd anaëroob (7.2.10 en 7.3.3) incuberen bij 37°C (7.2.7) gedurende 20 u ± 2 u

#### 7.4.2 Telling en selectie van kolonies voor bevestiging

- van alle schalen worden de zwarte presumptieve *Clostridium perfringens* geteld
- selecteer vijf karakteristieke kolonies uit de tien schalen voor biochemische bevestiging

#### 7.4.3 Biochemische bevestigingstest(en)

Voor de identificatie kan een commerciële biochemische kit worden gebruikt. De interpretatie van de resultaten van een identificatiekit gebeurt volgens de daarbij horende handleiding. Zoniet worden één van de volgende methodes gebruikt.

##### 7.4.3.1 Bevestigingstechniek met het LS medium

Inoculatie en incubatie

- inoculeer elk van de geselecteerde kolonies met een entnaald (7.2.9) in vloeibaar TGM (7.3.4)
- anaërobe incubatie (7.2.10 en 7.3.3) bij 37°C (7.2.7) gedurende 18 u - 24 u
- pipetteer (7.2.3) na incubatie 5 druppels TGM cultuur in LS medium (7.3.5)
- incubatie in een waterbad van 46°C (7.2.8) gedurende 18 u - 24 u

Interpretatie

- onderzoek elke tube LS medium op gasproductie en een op zwarte verkleuring van het medium door ijzersulfiet precipitatie. Tubes met Durham buisjes die meer dan ¼ met gas gevuld zijn en waarin een zwart precipitaat voorkomt, worden als positief beschouwd
- bij twijfel, indien in een zwarte LS tube een Durham buisje met minder dan ¼ gevuld is, pipetteer onmiddellijk 5 druppels LS cultuur in een nieuwe LS tube (7.3.5)
- incubatie in een waterbad van 46°C (7.2.8) gedurende 18 u - 24 u
- onderzoek deze tube(s) zoals hierboven vermeld

Besluit

Bacteriën die zwarte kolonies geeft op SC medium en die een positieve bevestiging geven in LS medium worden als *Clostridium perfringens* beschouwd. In elk andere geval is het resultaat negatief.

##### 7.4.3.2 Bevestigingstechniek met de LGM en NMM media

Deze bevestigingstechniek vereist goed geïsoleerde kolonies. Is dit niet het geval :

- inoculeer 5 geselecteerde kolonies met een entnaald (7.2.9) in vloeibaar TGM (7.3.4)
- anaërobe incubatie (7.2.10 en 7.3.3) bij 37°C (7.2.7) gedurende 18 u - 24 u
- strijk de kolonies op petrischalen SC (7.3.2) agar medium
- agar overgieten met een tweede laag (± 10ml) vloeibaar SC medium (7.3.2)

<sup>2</sup> Vijf maal 2 ml gebufferd pepton suspensie analyseren is eveneens uitvoerbaar

- anaërobe incubatie (7.2.10 en 7.3.3) bij 37°C (7.2.7) gedurende 18 u - 24 u

Juist vóór het gebruik van NMM (7.3.6) en LGM (7.3.7) de tubes in een kokend waterbad (7.2.11) brengen gedurende 15 min en snel afkoelen.

#### Inoculatie en aflezen van NMM (7.3.6)

- ent 5 tubes NMM (7.3.6) via steekenting met lange rechte entnaald (7.2.12)
- anaërobe incubatie (7.2.10 en 7.3.3) bij 37°C (7.2.7) gedurende 18 u - 24 u
- interpreteer: voor motiliteit moet diffuse of geen diffuse groei langs de entlijn geëvalueerd worden (negatief voor *Clostridium perfringens*).
- pipetteer (7.2.3) en meng de nodige en gelijke volumes NIT A (7.3.8) en NIT B (7.3.9) juist voor de test
- voeg 0,5 ml van het mengsel aan elke NMM tube
- interpreteer de rode kleur als nitriet vorming door reductie van nitraat (positief voor *Clostridium perfringens*).
- indien geen rode kleurvorming binnen 15 min: voeg een kleine hoeveelheid zink poeder (7.3.10) toe en laat staan gedurende 10 min
- indien wel rode kleurvorming betekent dat nitraat niet gereduceerd is en de test is negatief.

#### Inoculatie en aflezen van LGM (7.3.7)

- ent 5 tubes LGM (7.3.7) via enting met entnaald (7.2.9)
- anaërobe incubatie (7.2.10 en 7.3.3) bij 37°C (7.2.7) gedurende 18 u - 24 u
- Interpreteer de kleur van het medium: indien het medium geel is en er gasvorming is betekent dit vorming van zuur door lactosefermentatie (positief voor *Clostridium perfringens*)
- koel de tubes af gedurende 1 uur in een koelkast (7.2.13) van 5°C en controleer op gelatine vervloeiing (positief voor *Clostridium perfringens*).
- indien negatief: incubeer overnacht in de koelkast (7.2.13) en controleer opnieuw op gelatine vervloeiing

#### Besluit

Zwarte kolonies op SC medium, niet motiel, met reductie van nitraat tot nitriet, productie van zuur en gas uit lactose en vervloeiing van gelatine binnen 48 uur zijn *Clostridium perfringens*. Kulturen die slecht een lichte roze reactie van nitriet geven moeten geëlimineerd worden, daar *Clostridium perfringens* altijd een intense en onmiddellijke reactie geeft.

#### 7.4.4 Berekening van het resultaat (zie ISO 7218: Amd. 1)

Sommeer de aantallen presumptieve kolonies van de tien petrischalen (= C).

Bereken het aantal *Clostridium perfringens* a in 1 gram monster:

$$a = b/A \times C$$

met b het aantal geconfirmeerde kolonies  
en A het aantal geïnoculeerde kolonies ter bevestiging (=5).

#### 7.5 Weergave van de resultaten

Het aantal *Clostridium perfringens* wordt uitgedrukt als aantal kve in 1 g monster.

Indien telkens per plaat meer dan 150 kve als zijn bepaald wordt het aantal *Clostridium perfringens* gerapporteerd als > 750 kve/g of > 1500 kve/g monster, afhankelijk of er 2 ml in vijfvoud of 1 ml in tienvoud is geanalyseerd.

Indien *Clostridium perfringens* afwezig is, wordt <1 kve/g monster gerapporteerd.

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

## 7.6 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 (vet of meel/gelatine): herhaalbaarheid testen. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een referentie-*Clostridium perfringens*-stam en behandeld als elk ander onbekend monster.

De juistheid afleiden uit ringtestresultaten.

## 8 REFERENTIES

- ISO 7218:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General rules for microbiological examinations
- ISO 7218:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General rules for microbiological examinations Amendment 1
- ISO 6887-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
- ISO 6887-2:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products
- ISO 6887-4:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products
- ISO 21528-2:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count method
- ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 7937:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* -- Colony-count technique
- ISO 6579: 2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage AMENDMENT 1