

Verwerkte mest – Detectie van *Salmonella* spp.

INHOUD

1	Werkwijze ISO 6579-1:2017	3
1.1	<i>Media en materiaal</i>	3
1.2	<i>Procedure</i>	3
1.2.1	Initieel suspenderen van monster en pre-aanrijking in een niet selectief vloeibaar medium (gebufferd pepton water)	3
1.2.2	Keuze en validatie van de aanrijkmethode in twee selectieve media	4
1.2.3	Aanrijking van <i>Salmonella</i> in twee selectieve media RVS en MKTTn	4
1.2.4	Aanrijking van <i>Salmonella</i> in twee selectieve media MSRV en MKTTn	4
1.2.5	Uitplating en identificatie	5
1.2.6	Biochemische en serologische bevestigingstesten	5
2	Werkwijze via PCR Assay <i>Salmonella</i> spp. Of via VIDAS <i>Salmonella</i>	6
3	Weergave van de resultaten	6
4	Kwaliteitscontrole	6
5	Referenties	7

1 WERKWIJZE ISO 6579-1:2017

De detectie van *Salmonella* spp. conform ISO 6579-1:2017 omvat de opeenvolgende stadia:

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

1.1 MEDIA EN MATERIAAL

- Gebufferd pepton water BPW
- Rappaport-Vassiliadis medium met soya RVS / modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis MSRV
- Muller-Kauffmann tetrathionaat novobiocine bouillon MKTTn
- Xylose lysine deoxycholaat agar XLD (bij voorkeur in extra grote schalen 140mm)
- Tweede agar medium naar keuze en oordeel van het laboratorium (zie bijlage E van ISO 6579 - 1:2017). Om zo volledig mogelijk alle stammen van het geslacht *Salmonella* spp. 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.
- Niet selectieve agar (b.v. Nutriënt agar)
- Triple sugar/iron agar TSI
- Urea agar Christensen
- L-lysine decarboxylation medium
- Reagens voor detectie van β -galactosidase (optioneel)
- Reagens voor indol reactie (optioneel)
- Fysiologische zoutoplossing (0,85 % NaCl)
- Monovalent of polyvalent anti H,O, (Vi) sera voor *Salmonella* of *Salmonella* Latex Agglutinatie Test of gelijkwaardige test
- Autoclaaf 121±3°C; incubatoren van 36±2°C, 37±1°C en 41,5±1°C, waterbad op 45±1°C, geschikt glaswerk, pipetten, pH-meter, petrischalen, entnaald
- Stomacher toestel of gelijkwaardige homogenisator

1.2 PROCEDURE

1.2.1 INITIEEL SUSPENDEREN VAN MONSTER EN PRE-AANRIJING IN EEN NIET SELECTIEF VLOEIBAAR MEDIUM (GEBUFFERD PEPTOON WATER)

Opmerking: het initieel suspenderen van de deelmonsters in gebufferd peptonwater voor de analyse van *Enterococcaceae* of *E.coli* en *Salmonella* spp. kunnen ook samen uitgevoerd worden op 25g.

- aan 25 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak 225 ml gebufferd pepton water aseptisch toevoegen (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 gedurende 2 minuten
- de zak wordt afgesloten met een clips of tape
- de stomacherzak wordt geïncubeerd bij $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ gedurende $18\pm 2\text{u}$.

1.2.2 KEUZE EN VALIDATIE VAN DE AANRIJKINGSMETHODE IN TWEE SELECTIEVE MEDIA

ISO 6579-1: 2017 specificeert een specifieke methode voor de detectie van *Salmonella* spp. Het is van toepassing op:

- producten die bestemd zijn voor menselijke consumptie en diervoeders;
- milieumonsters op het gebied van voedselproductie en voedselverwerking;
- monsters uit de primaire productiefase zoals dierlijke faeces, stof en swabs.

Met deze methode zijn de meeste *Salmonella*-serovars bedoeld om te worden gedetecteerd. Voor de detectie van sommige specifieke serovars kunnen extra kweekstappen nodig zijn. Voor *Salmonella Typhi* en *Salmonella Paratyphi* is de procedure beschreven in [bijlage D](#).

Hiervoor wordt het selectief aanrijksmedium MSRV gebruikt en is bedoeld voor de opsporing van beweeglijke *Salmonella* spp. (en is dus niet geschikt voor de opsporing van niet beweeglijke *Salmonella* spp.).

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

Voor opsporing van *Salmonella* uit verwerkte mest dient de meest geschikte aanrijksmethode gevalideerd te worden op de te analyseren matrix.

1.2.3 AANRIJING VAN SALMONELLA IN TWEE SELECTIEVE MEDIA RVS EN MKTTN

De RVS en MKTTn bouillons op kamertemperatuur brengen.

Uit de stomacherzak wordt van de gebufferd pepton suspensie :

- 0,1 ml in 10 ml RVS bouillon getransfereerd: incubatie bij $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (aandacht om $42,5^{\circ}\text{C}$ zeker niet te overschrijden) gedurende $24\pm 3\text{u}$
- 1 ml in 10 ml MKTTn bouillon getransfereerd: incubatie bij 37°C gedurende $24\pm 3\text{u}$.

1.2.4 AANRIJING VAN SALMONELLA IN TWEE SELECTIEVE MEDIA MSRV EN MKTTN

De MSRV-platen en MKTTn bouillon op kamertemperatuur brengen.

Uit de stomacherzak wordt van de gebufferd pepton suspensie:

- 0,1 ml met pipet op de MSRV-platen 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 $41,5^{\circ}\text{C}$ (aandacht om $42,5^{\circ}\text{C}$ zeker niet te overschrijden) gedurende $24\pm 3\text{u}$ zonder de platen te zwenken
- 1 ml met pipet in 10 ml MKTTn bouillon overbrengen: incubatie bij 37°C gedurende $24\pm 3\text{u}$.

Belangrijke opmerking: het is aangewezen om de RVS / MSRV en MKTTn steeds verder gedurende $24\pm 3\text{u}$ te incuberen, specifiek om traag groeiende *Salmonella* te detecteren. Indien er geen typische *Salmonella* kolonies bij § 3.5 waargenomen worden, kan na de verdere incubatie opnieuw uitgeplaat worden op de selectieve agarmedia.

1.2.5 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 geflambeerd.

Na incubatie van 24±3u:

- met een platinumnaald wordt vanuit de vloeibare cultuur RVS of semi-solid platen MSRV en MKTTn bouillon 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±3u. Het tweede medium wordt geïncubeerd volgens instructies van de leverancier. Na incubatie wordt de aanwezigheid van typische en mogelijke *Salmonella* spp. 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.

1.2.6 BIOCHEMISCHE EN SEROLOGISCHE BEVESTIGINGSTESTEN

1.2.6.1 SELECTIE VAN KOLONIES VOOR DE BEVESTIGINGSTESTEN

- voor de bevestigingstesten worden uit beide selectieve media één typische of een vijftal verdachte kolonies opgepikt en uitgestreken op een nutriënt agar plaat, zodanig dat goed geïsoleerde kolonies worden verkregen. Als alternatief, indien goed geïsoleerde kolonies (van een zuivere cultuur) beschikbaar zijn op de selectieve media, kan de biochemische bevestiging direct worden uitgevoerd op een verdachte, goed geïsoleerde kolonie van een selectieve plaat. De kweek op het niet-selectieve (nutriënt) agarmedium kan vervolgens parallel worden uitgevoerd met de biochemische testen ter controle op zuiverheid van de kolonie die uit het selectieve agarmedium is genomen.
- incubatie van de schalen bij 36±2°C gedurende 24±3u
- 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.

1.2.6.2 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 %) (optioneel)

Indolproductie (99% negatief) (optioneel)

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* spp. stammen worden geïdentificeerd wordt een serologische confirmatie uitgevoerd.

1.2.6.3 SEROLOGISCHE BEVESTIGINGSTEST

Elimineren van auto agglutinerende stammen:

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

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

Indien agglutinatatie optreedt wordt de reactie positief gerapporteerd.

1.2.6.4 SPECIES IDENTIFICATIE

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

1.2.6.5 MICROBIOLOGISCHE IDENTIFICATIE VAN SALMONELLA DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *Salmonella* kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een validatie uitgewerkt te worden conform ISO 16140.

2 WERKWIJZE VIA PCR ASSAY SALMONELLA spp. Of via VIDAS SALMONELLA

Voor de bepaling van *Salmonella* kan gebruik gemaakt worden van de VIDAS *Salmonella* technologie of van (Real-Time) PCR Assay for *Salmonella* spp. technologie. Beide technieken hebben een Afnor validatie conform ISO 16140, in eerste instantie in voedingsmatrices, maar eveneens in milieumatrices.

3 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

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

In het rapport wordt eveneens de gebruikte BAM methode vermeld.

4 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. De juistheid afleiden uit tweedelijnscontrole.

5 REFERENTIES

- ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of Salmonella spp.
- ISO 6579: 2017 CD AMENDMENT 1: in ontwikkeling.
- <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/salmonella-spp/>