

norm ook een commerciële kit worden gebruikt. Op aanvraag van een klant kan de species van de isolaten worden geïdentificeerd door een referentielaboratorium.

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

Van andere water matrices worden doorgaands kleinere volumes geanalyseerd (door filtratiebeperkingen).

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

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

De besmette vaste afval (petriplaten, 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 petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een veiligheidskabinet (4.1.7) of in een droogstoof. Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf 121 ± 3°C en 115 ± 3°C
- 4.1.2 Incubator 36 ± 2°C
- 4.1.3 Incubator 41,5 ± 1°C
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Vortex
- 4.1.6 Pipetus akku
- 4.1.7 Veiligheidskabinet
- 4.1.8 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.9 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

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Gebufferd peptoon water (BPW)
- 5.1.2 Rappaport-Vassiliadis medium met soya (RVS bouillon)
- 5.1.3 Muller Kauffmann tetrathionaat novobiocine bouillon (MKTTn bouillon) of Selenite cysteine bouillon (SCB bouillon)
- 5.1.4 Xylose lysine deoxycholaat agar (XLD)
- 5.1.5 Minstens één agar medium naar keuze en oordeel van het laboratorium: Rambach; Brilljant 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 gelijkwaardig
- 5.1.15 transport agar slant
- 5.1.16 Umonium38 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 5.1.17 70% gedenatureerde ethanol (of gelijkwaardig)
- 5.1.18 ultra puur water
- 5.1.19 *Salmonella* referentie bacterie

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVOORBEREIDING

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.

6.6 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 platen bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (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. Zowel biochemische als serologische bevestigingstesten moeten uitgevoerd worden.

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.

Opmerking: indien met de biochemische testen *Salmonella aerizonae* wordt geïdentificeerd dient geen serologische test uitgevoerd te worden. Deze species geeft geen agglutinatie met een Latex agglutinatietest.

6.6.3 SEROLOGISCHE BEVESTIGINGSTEST

Voor de *Salmonella* agglutinatie test gaan antilichaampartikels agglutineren in aanwezigheid van specifieke *Salmonella* celwandantigenen waarbij duidelijke zichtbare precipitaten worden gevormd.

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

Voor de identificatie van *Salmonella* of ter vervanging van de biochemische als serologische bevestigingstesten gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een validatie uitgewerkt te worden conform ISO 16140.

6.6.5 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 RAPPORTERING

- In functie van de resultaten en interpretatie wordt de “aan - of afwezigheid” of “aangetoond / niet aangetoond” van *Salmonella* uitgedrukt in het geanalyseerd volume monster.

7.1 RAPPORT

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monsternamen
- de verwijzing naar de gebruikte methode bvb. de betreffende WAC methode
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

8 REFERENTIES

- ISO 19250 (juli 2010) Water quality -Detection of *Salmonella* spp.
- ISO 6340 (1995) Water quality -Detection of *Salmonella* species.
- ISO 6579 (2002) Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters.
- MALDI-TOF MS
http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/documents/2015-04_labinfo13-p12_en.pdf
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.