

Bepaling van *Salmonella* spp.

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	4
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	5
5.1	<i>Reagentia</i>	5
6	PROCEDURE	5
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Membraanfiltratie</i>	6
6.3	<i>Pre-aanrijking in het niet selectief vloeibaar medium gebufferd pepton water</i>	6
6.4	<i>Aanrijking van Salmonella in één of twee selectieve media</i>	6
6.5	<i>Uitplating en identificatie</i>	6
6.6	<i>Biochemische en serologische bevestigingstesten</i>	7
6.6.1	selectie van kolonies voor de bevestigingstesten	7
6.6.2	biochemische bevestigingstesten	7
6.6.3	serologische bevestigingstest	7
6.6.4	Identificatie van Salmonella door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)	8
6.6.5	species identificatie	8
7	RAPPORTERING	8
7.1	<i>Rapport</i>	8
8	REFERENTIES	8

1 TOEPASSINGSGEBIED

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

Het betreft de bepaling van de parameter *Salmonella* spp. in water (ISO 19250).

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 stooflora 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 heel lage aantallen of verzwakte *Salmonella* 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. Voor afvalwater is aangetoond dat betere resultaten worden bekomen indien de incubatietijd van niet selectieve aanrijking korter dan de vooropgestelde tijd wordt gehouden of zelfs niet wordt uitgevoerd, waarbij rechtstreeks tot de selectieve aanrijking wordt overgegaan.
- 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 soya bouillon, hoogst effectief medium voor de recovery van *Salmonella* in waters met een hoge achtergrondflora, 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, maar voor toxicologische redenen wordt als tweede selectief medium Muller Kauffmann tetrathionaat novobiocine bouillon verkozen boven Selenite Cysteïne bouillon, behalve indien er specifiek naar *Salmonella* Thyphi en *Salmonella* Paratyphi wordt gezocht, want dan blijft SCB aangewezen.
- 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 biochemische en serologische 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/aantoonbaarheid** van *Salmonella* wordt voor drinkwater per 1000 ml bepaald.

Van andere water matrices worden doorgaans 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 $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$ en $115 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 4.1.2 Incubator $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.1.3 Incubator $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 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 $0,45 \mu\text{m}$ 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; 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 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.

6.2 MEMBRAANFILTRATIE

Het volume van het monster hangt af van het type water. Een gebruikelijke volume voor zwemwater en drinkwater is 1000 ml. Voor verontreinigd oppervlaktewater en afvalwater worden meestal kleinere volumes geanalyseerd.

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). Voor troebel of zwaar verontreinigd water kan filtratie uitgevoerd worden over een steriele diatomeënaarde-laag in plaats van een filter.

6.3 PRE-AANRIJING 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 pepton water (5.1.1) aseptisch toegevoegd en geïncubeerd op $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) gedurende 18 ± 2 u.

6.4 AANRIJING VAN SALMONELLA IN ÉÉN OF TWEE SELECTIEVE MEDIA

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

- 0,1 ml met pipet (4.2.3) in 10 ml RVS bouillon (5.1.2) overbrengen en vortexen (4.1.5); incubatie gedurende 24 ± 3 u bij $41,5^\circ\text{C}$ (4.1.3) (aandacht om $42,5^\circ\text{C}$ zeker niet te overschrijden)

en eventueel bij zware fecale besmetting:

- 1 ml met pipet (4.2.3) in 10 ml MKTTn/SCB bouillon (5.1.3) overbrengen en vortexen (4.1.5); incubatie bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) gedurende 24 ± 3 u.

Belangrijke opmerking: het is aangewezen om de RVS steeds verder gedurende 24 ± 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

Na incubatie van $24 \text{ u} \pm 3$ u:

- met een platinumnaald (4.2.4) wordt vanuit de vloeibare cultuur van zowel RVS (5.1.2) als MKTTn/SCB (5.1.3) bouillons telkens een petrischaal van het selectieve XLD (5.1.4) en het bijkomend medium (5.1.5) geënt
- incubatie van de XLD platen (agarbodem aan de bovenzijde) bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) gedurende $24 \text{ u} \pm 3$ 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_2S 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 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* agglutinatietest 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 "aan - of afwezigheid" of "**aantoonbaar of niet aantoonbaar**" 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 monstername
- de verwijzing naar de betreffende WAC methode**
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

8 REFERENTIES

- ISO 19250 (juli 2010) Water quality -Detection of *Salmonella* spp.
- [...]
- ISO 8199:2018 Water quality - General requirements and guidance for microbiological examinations 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.