

Lab Mikrobiologie 1982-01-06
Verslag 82.2 Pr.nr. 303.2060

Onderwerp: Salmonella in mengvoeders.

Bijlage 1.

Verzendlijst: Directeur, sektorhoofd (3x), Dir. V.K.A. (Mol), afd.
Mikrobiologie (3x), afd. Normalisatie (Humme),
Projektbeheer, De Jong,
Prof. Cornelisse (Rijksuniversiteit, Utrecht),
Mw ir M. Tiemstra (Vereniging van Nederlandse
Mengvoederfabrikanten).

Projekt: Onderzoek monsters diervoeders en grondstoffen voor derden

Onderwerp: Salmonella in mengvoeders.

Bijlage: 1.

Doel:

Na te gaan of het pelleteerprocédé van mengvoeders voldoende effectief is om het voorkomen van salmonella, in mengvoeders, te reduceren.

Samenvatting:

In het kader van het veelomvattende salmonella-vraagstuk is het plan opgevat om alle mengvoeders te pelleteren. De monsters werden na pelleteren aangeboden en onderzocht op aanwezigheid van salmonella volgens zg. "methode Cornelisse".

Conclusie:

De onderzochte monsters bleken bijna allen salmonella negatief te zijn.

Verantwoordelijk: N. Broex *NB*

Medewerkers/Samenstellers: W. Driessen-v. Lankveld, H. v. Velzen. *W*

W. Driessen

1. Algemeen

Het voorkomen van salmonella in diervoeders is te reduceren door deze te pelletteren bij een temperatuur van $\pm 70^{\circ}\text{C}$. Om na te gaan of bij het toegepaste pelletterprocédé de reductie volledig is zijn gedurende een aantal weken gepelleteerde mengvoeders onderzocht.

2. Monsters

Door een viertal mengvoederbedrijven, aangesloten bij de Vereniging van Nederlandse Mengvoederfabrikanten (VNMF), zijn gedurende een aantal weken ongeveer twee maal per week monsters genomen en ingezonden. De monsters zijn volgens het bemonsteringsvoorschrift van de "Verordening Gezondheidseisen Geïmporteerde Dierlijke Eiwitten" genomen. Zo spoedig mogelijk na aankomst zijn de monsters onderzocht.

3. Methoden

Alle monsters zijn onderzocht volgens de zg. methode Cornelisse (zie bijlage 1, Intern Analysevoorschrift nr. E 26) dat wil zeggen een inweeg van 200 g en een behandeling met H_2S . De met deze methode positief gevonden monsters zijn nogmaals onderzocht maar toen met de gangbare methode zoals omschreven in de "Verordening Gezondheidseisen Geïmporteerde Dierlijke Eiwitten" dat wil zeggen een inweeg van 20 gram.

4. Resultaten

Van totaal 139 onderzochte mengvoeders waren slechts twee monsters salmonella positief (S.Agona) met de methode Cornelisse. Deze twee monsters gaven met de gangbare methode "salmonella afwezig in 20 gram". Alle andere monsters waren salmonella negatief.

5. Conclusie

Voor genoemd aantal monsters is het pelletterprocédé effectief geweest met uitzondering van twee monsters.

6. Discussie

Ofschoon niet bekend is hoeveel van deze monsters voor het pelleten salmonella positief waren kunnen we aannemen dat de toegepaste pelleteerprocedure voldoende effectief is om de salmonella besmetting terug te dringen. Van de twee positief gevonden monsters was op het mengbedrijf geen restant monster meer aanwezig om nogmaals een heronderzoek uit te voeren.

Nadeel van de gevolgde onderzoekmethode is dat deze veel arbeidsintensiever is dan de gangbare.

Bijlage 1

Intern Analysevoorschrift Nr. E 26.

Salmonella isolatie uit plantaardige produkten.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT Nr. E 26

1e oplage (1981-12-15)

SALMONELLA ISOLATIE UIT PLANTAARDIGE PRODUCTEN

Verzendlijst: afd. Normalisatie/harmonisatie, bibliotheek (15x), sektorhoofd, afd. Microbiologie (3x).

Salmonella isolatie uit plantaardige produkten

1. Vereiste methoden voor de Salmonella isolatie.

2. Definitie

Onder isolatie van Salmonella uit plantaardige produkten wordt verstaan het verrichten van al die handelingen, die nodig zijn voor het verkrijgen van reinculturen met voor Salmonella kenmerkende eigenschappen.

3. Beginsel

Na voorophoping van een afgewogen hoeveelheid monster en ophoping in een selectief medium wordt een hoeveelheid van het bebroede selectieve medium, onder anaërobe omstandigheden behandeld met zwavelwaterstof en vervolgens afgestreken op een selectieve voedingsbodem. Specifieke kolonies worden bevestigd d.m.v. biochemische en serologische reacties.

4. Media en Reagentia

4.1 Voorophopingsmedia

4.1.1 Samenstelling en bereiding basismedium

Pepton	10 g.
Glucose	1 g.
NaCl	5 g.
Gedem. water	1000 ml.

Los de verschillende bestanddelen op in water, vul porties van 2 l af in kolven van 3 l en steriliseer gedurende 20 minuten bij 120°C.

4.1.2 Thioglycolzuur

4.1.3 Natronloog 30%.

4.2 Ophopingsmedium Tetrathionaatbouillon

4.2.1 Basismedium (Müller Kaufmann-Tetrathionate Broth Base)

82 g basismedium per liter afwegen, oplossen in gedem. water door verhitting.

4.2.2 Jodiumoplossing

Jodium 200 g.
Kaliumjodide 250 g.
gedem. water 1000 ml.

Los het kaliumjodide op in ca. 500 ml water. Voeg daarna het jodium toe en los op. Vul aan met water tot 1 liter. Koel en donker bewaren.

4.2.3 Brilljantgroenoplossing

Brilljantgroen 100 mg.
gedem. water 100 ml.

Oplossen door 1 à 2 uur te schudden op het schudapparaat. Koel en donker bewaren, + 2 weken houdbaar.

4.2.4 Uiteindelijke bereiding

Het medium moet op dezelfde dag waarop het wordt bereid, worden gebruikt.

Basismedium 4.2.1 1000 ml.
Jodium oplossing 4.2.2 19 ml.
Brilljantgroenoplossing 4.2.3 9,5 ml.
Afvullen in porties van 100 ml.

4.3 Ophopingsmedium Seleniet-bouillon

4.3.1 Oplossing I

Pepton (Difco 0118-05) 5 g.
Gist (Difco 0127-01) 5 g.
Manniet (Merck 5980) 5 g.
Natriumtaurocholaat
(Difco 02780-01) 1 g.

Bovengenoemde stoffen oplossen in water en aanvullen tot 900 ml. Steriliseren door middel van 1 h stomen.

4.3.2 Oplossing II

Natriumbiseleniet (Merck 6340) 16 g.
 KH_2PO_4 (Merck 4874) 13,6 g.
 K_2HPO_4 (Merck 5101) 17,4 g.

Bovengenoemde stoffen oplossen in water en aanvullen tot 400 ml. Steriliseren door middel van 30 minuten stomen.

4.3.3 Uiteindelijke bereiding

Van oplossing 4.3.1 900 ml mengen met 100 ml van oplossing 4.3.2 en afvullen in porties van 100 ml.

Per 100 ml seleniet-bouillon 0,5 ml briljantgroen (4.2.3) toevoegen.

4.4 Isolatie medium

Briljantgroen agar (Oxoid CM 329).

52 g per l oplossen en even door laten koken.

25 ml per petrischaal. \emptyset 140 mm.

4.5 Natriumsulfide.

4.6 Melkzuur 90%.

4.7 Triple Sugar Iron Agar (T.S.I. agar)

16,25 g TSI agar (Difco 0265-01) afgewogen oplossen in 250 ml kokend ged. water.

pH instellen op $7,4 \pm 0,1$ bij $\pm 50^{\circ}\text{C}$.

Ongeveer 7 ml per buis afvullen.

20 minuten steriliseren bij 120°C en in schuine stand laten stollen.

4.8 Lysine-decarboxylase Broth (LDC)

LDC tabletten (Oxoid CM 308).

1 tablet oplossen in 5 ml dest. pH $6,8 \pm 0,1$

20 min steriliseren bij 115°C .

4.9 Ureum buizen

Pepton	500 mg.
Glucose	500 mg.
NaCl	2,5 g.
fenolrood	6 mg.
KH_2PO_4	1 g.
Agar	10 g.
Kokend ged. water	500 ml.

Fenolrood afwegen in weegschuitje en in kokende oplossing brengen en even laten doorkoken.

pH instellen op $6,8 \pm 0,1$ bij $\pm 50^{\circ}\text{C}$.

20 minuten steriliseren bij 120°C .

10 g ureum in kolfje van 50 ml afwegen en oplossen in gedest. water. De oplossing steriliseren d.m.v. filtratie en 40 ml hiervan aseptisch aan 500 ml voedingsbodem toevoegen.

De temperatuur van de voedingsbodem mag niet hoger zijn dan 50°C anders ontbinding van ureum. Ongeveer 7 ml per buis afvullen en in schuine stand laten stollen.

4.10 Bouillon buizen

Pepton	10 g.
NaCl	5 g.
Vleesextract	10 g.
Agar	20 g.
Kokend ged. water	1 l.

pH op $7,5 \pm 0,1$ brengen bij 50°C .

Ongeveer 7 ml per buis afvullen en 20 minuten steriliseren bij 120°C en in schuine stand laten stollen.

5. Apparatuur en glaswerk

Het glaswerk moet bestand zijn tegen herhaald steriliseren.

5.1 Flessen van 3 liter voor voorophoping.

5.2 Flesjes van 250 ml voor seleniet-bouillon en tetrathionaat-bouillon.

5.3 Pipetten van 2 ml en 10 ml.

5.4 Exsiccator van ± 11 liter.

5.5 Cultuurdozen volgens Petri.

De binnendiameter dient ca. 90 mm te zijn.

5.6 Cultuurdozen volgens Petri.

De binnendiameter dient ca. 140 mm te zijn.

5.7 Cultuurbuizen voor Ureum-, LDC-, TSI- en bouillon-agar (18 x 150 mm).

5.8 Filtreerpapierjes (\varnothing 90 mm, Schuit en Zonen).

5.9 pH meter.

- 5.10 Broedstoven voor het kweken van de cultures bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en $43 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 5.11 Toestellen voor het steriliseren van het glaswerk, de voedingsbodem en de verdunningsvloeistof op de voorgeschreven wijze.
- 5.12 Vacuumpomp.
- 5.13 Spatels.
- 5.14 Entnaalden.

6. Werkwijze

6.1 Eerste stadium

Breng 200 g van het te onderzoeken materiaal in 2000 ml van het op 37°C gebrachte niet selectieve medium (4.1.1) m.b.v. een steriele spatel. Voeg 0,8 ml thioglycolzuur (4.1.2) toe en controleer gedurende 1 uur de pH met een pH meter en corrigeer deze met natronloog (4.1.3) tot $\text{pH} = 7 \pm 0,1$. Bebroed het medium gedurende 16 à 18 uur bij 37°C .

6.2 Tweede stadium

Breng 2 ml en 10 ml van bovenstaand medium (6.1) in 100 ml van het selectieve medium selenietbouillon (4.3) resp. tetrathionaatbouillon (4.2).

Plaats deze in 'n broedstoof van 37°C resp. 43°C .

6.3 Behandel 2 ml van de bebroede selenietbouillon gedurende enkele uren met zwavelwaterstof in een anaëroob milieu bij 43°C .

Breng daarvoor 2 filtreerpapiertjes (\emptyset 90 mm, Schuit en Zonen) in een petrischaal \emptyset 90 mm (indien filtreerpapiertjes kleiner, dan meer papiertjes gebruiken). Breng op deze filtreerpapiertjes 2 ml van de selenietbouillon. Zet vervolgens deze petrischaal in een exsiccator van \pm 11 liter, waarin te voren een bakje is gebracht met 15 g natriumsulfide (4.5) en een schuin opgestelde centrifugebuis met 15 ml melkzuur 90% (4.6). Na het aanbrengen van een druk van 5 cm kwik in de exsiccator, worden de natriumsulfide en melkzuur samengebracht door de opgestelde centrifugebuis uit de schuin opgestelde stand te laten wegglijden. De exsiccator wordt nu gedurende 4 uur bij 43°C geplaatst.

Vervolgens wordt de exsiccator geopend en de filtreerpapier-
tjes overgebracht in 100 ml selenietbouillon voor een bebroeding van
24 uur bij 43°C.

6.4 Vierde stadium

Strijk na 24 uur en na 48 uur bebroeding van de tetrathionaat-
bouillon uit op selectieve agar (4.4) en na 24 uur bebroeding van
de selenietbouillon (6.3) uit op selectieve agar (4.4). De selec-
tieve agar platen worden 18 à 24 uur bebroed bij 37°C.

7. Identificatie

De identificatie moet worden verricht op volledig geïsoleerde
kolonies. Verricht zonodig een tweede isolering op een vast
medium. De verdachte kolonies worden geïdentificeerd door bioche-
mische en serologische reacties.

7.1 Biochemische reacties

Een klein aantal biochemische reacties maakt het in het algemeen
mogelijk aan te tonen, dat de verdachte kolonie waarschijnlijk
een salmonella is o.a. reactie op TSI agar, lysinedecarboxylase-
reactie (LDC), negatieve omzettingsreactie van het ureum.

7.1.1 TSI agar (4.7)

7.1.1.1 Beënting

Beënt de buizen door afstrijken op het oppervlak en
steken in het onderste gedeelte van de buis.

18-24 uur bebroeden bij 37°C.

7.1.1.2 Beoordeling

Bodem: geel	- glucose omgezet	+
rood of onveranderd	- glucose niet omgezet	-
zwart	- vorming H ₂ S	
bellen of gescheurd	- gasvorming.	
Oppervlak: geel	- lactose en/of	
	saccharose omgezet	-
rood of onver-	- noch lactose noch	+
anderd	saccharose omgezet.	

7.1.2 Lysine (4.8)

7.1.2.1 Beënting

De lysine oplossing enten met een verdachte kolonie.
18-24 uur bebroeden bij 37°C.

7.1.2.2 Beoordeling

Het medium blijft paars en wordt troebel	+
Het medium wordt geel	-

7.1.3 Ureum (4.9)

7.1.3.1 Beënting

Verdachte kolonie afstrijken op de buis.
18-24 uur bebroeden bij 37°C.


7.1.3.2 Beoordeling

Oranje kleur wordt gelig	+
Lila kleur, onveranderd of rood	-

Indien bij de biochemische reacties bij de TSI reactie H₂S, zuur en/of gas gevormd is, de lysinedecarboxylase reactie positief is en de ureumreactie negatief is dan worden de stammen naar het Nationale Salmonella Centrum gezonden. Is een van de reacties afwijkend dan beschouwen we het resultaat als "Salmonella-afwezig"

7.2 Serologische identificatiereactie

De te identificeren stammen worden afgestreken op een bouillonbuis (4.10) 18-24 uur bebroed bij 37°C en opgestuurd naar het Nationale Salmonella Centrum te Bilthoven.

Verantwoordelijk: N. Broex 

Samensteller : W. Driessen-van Lankveld W. Driessen