Projectnr.: 416.0001
Ontwikkeling van snelle en betrouwbare detectiemethoden voor bacteriën in de produktielijn van vlees en vleesprodukten
Projectleider: ir. A.E.M. Vermunt

Rapport 95.20 maart 1995

Ontwikkeling van een snelle en betrouwbare detectiemethode voor pathogene *Yersinia enterocolitica's* in vlees op basis van de geleidbaarheidsmeting

ir T.F.H. Bovee
ir A.E.M. Vermunt
ir H. Stegeman

Afdeling: Microbiologie en Biotechniek

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telefax 08370-17717

Copyright 1995, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
auteurs
programmaleiders
afdeling Microbiologie en Biotechniek (8x)
public relations en secretariaat (2x)
bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Milieu, Kwaliteit en Gezondheid
Directie Wetenschap en Kennisoverdracht
TNO Voeding, dr J. van de Plas, dr H. Hofstra, Prof. dr J.H.J. Huis in 't Veld
Rijksuniversiteit Utrecht VVDO, dr N. Haagsma
Produktschap voor Vee en Vlees, ir M.P.H. Vrins
Landbouwuniversiteit Wageningen, Prof. dr ir F.M. Rombouts

ABSTRACT

Ontwikkeling van een snelle en betrouwbare detectiemethode voor pathogene *Yersinia enterocolitica's* in vlees op basis van de geleidbaarheidsmeting

Development of a rapid and reliable detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* in meat based on conductance measurement (in Dutch)

Report 95.20 March 1995

T.F.H. Bovee, A.E.M. Vermunt, H. Stegeman

DLO-State Institute fot Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

19 figures, 21 tables, 2 annexes, 72 pages, 16 references

Pathogenic *Yersinia enterocolitica* can cause severe illness in humans. The bacterium is widespread in nature and can be isolated from vegetables, drinking water, ground and animal products. For safety quality control it is important to have a quick detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods.

This investigation deals with a screening method based on conductance measurement. A selective conductance medium was developed for the detection of *Yersinia enterocolitica* in meat. Comparisons were made with the traditional enrichment and plating procedure. The conductance measurements gave results which agree well with the standard method. By using the polymerase chain reaction (PCR) with 16 S rRNA primers for *Yersinia* it is possible to confirm the positive Yersinia conductance signals.

It has been shown that immunomagnetic particle-based separation (IMS) is an efficient tool for the isolation of *Yersinia* cells from meat samples. Sheep anti-Mouse beads coated with a Mouse monoclonal antibody and Sheep anti-Rabbit beads coated with a Rabbit polyclonal antibody gave recovery's of pure cultures of *Yersinia enterocolitica O:3* of 77%. Other bacteria gave recovery's of about 1%.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, screening, conductance, polymerase chain reaction, immunomagnetic separation and immunofluorescence

SAMENVATTING

In het kader van de ontwikkeling van een snelle en betrouwbare detectiemethode voor pathogene *Y. enterocolitica's* in de produktielijn van vlees en vleesprodukten, worden binnen RIKILT-DLO een viertal technieken ontwikkeld, te weten geleidbaarheidsmeting, immunomagnetische scheiding, immunofluorescentie en polymerase chain reaction. Het doel van het onderzoek is een detectiemethode op basis van de geleidbaarheidsmeting te ontwikkelen. Na screening met de geleidbaarheidsmeting worden de vleesmonsters die als verdacht uit dit onderzoek komen, bevestigd met immunofluorescentie of polymerase chain reaction.

Toepassing van immunomagnetische scheiding als voorbehandelingstechniek gaf goede resultaten met reinculturen van verschillende micro-organismen. Magnetische bolletjes, bezet met een secundair antiserum, waaraan een monoclonaal of polyclonaal antiserum is gecoat, gaven recovery's van *Y. enterocolitica O:3* van ca. 77%. De recovery van andere micro-organismen is ca. 1%. Door toevoeging van varkensgehakt met een natuurlijke begeleidingsflora werd de recovery van *Y. enterocolitica O:3* enigszins verlaagd.

Bij de geleidbaarheidsmeting is uitgegaan van het Campden Yersinia Impedimetric Medium, dat voor melk ontwikkeld is. Dit medium gaf goede resultaten voor varkensgehaktmonsters waaraan *Y. enterocolitica O:3* was toegevoegd, maar de begeleidende bacterieflora van het varkensgehakt bleek te storen. Daarom zijn drie extra selectieve stoffen aan het medium toegevoegd, nl. malachietgroen, ticarcilline en kaliumchloraat en is de incubatietemperatuur in de Malthus Growth Analyzer verhoogd van 25 naar 30 ^{0}C. Ondanks deze verbeteringen gaven varkensgehaktmonsters, waarin geen *Y. enterocolitica* aanwezig was, in de geleidbaarheidsmeting toch nog een storende geleidbaarheidscurve. Deze curve kon worden geëlimineerd door verdunning van het varkensgehaktmonster. Toepassing van een voorkweek verbeterde de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting.

Het onderzoek met praktijkmonsters van varkensgehakt, varkenstonsillen, varkenstongen en varkensvlees liet zien dat de resultaten van screening met de geleidbaarheidsmeting goed overeenkomen met de uitkomsten van de klassieke plaatmethoden. Vergeleken met deze klassieke plaatmethoden, werden na screening met de geleidbaarheidsmeting geen vals negatieve signalen waargenomen. Voorkweek van het monster in PSB gaf vergeleken met voorkweek in ITC echter wel een groot aantal vals positieve signalen in de geleidbaarheidsmeting. Bevestiging van de aanwezigheid van *Yersinia* in de verdachte varkensvleesmonsters uit de geleidbaarheidsmeting is mogelijk met een PCR-techniek waarbij algemene 16S r-RNA primers worden gebruikt.

Screening van vleesmonsters met de geleidbaarheidsmeting gevolgd door bevestiging van de verdachte monsters met de PCR-techniek biedt de mogelijkheid een detectiemethode voor *Yersinia* te ontwikkelen die dezelfde resultaten oplevert als de klassieke plaatmethoden, maar eerder een uitslag over het monster geeft.

LIJST VAN AFKORTINGEN

BSA	Bovine serum albumine
BOS	Galzouten-oxalaat-sorbose bouillon
CFC	Cetrimide-fucidine-cephaloridine agar
CIN	Cefsulodine-irgasan-novobiocine agar
CYIM	Campden Yersinia Impedimetric Medium
CYIM/MTK	Campden Yersinia Impedimetric Medium met malachietgroen, ticarcilline en kaliumchloraat
IF	Immunofluorescentie
IMS	Immunomagnetische scheiding
ISO	International Organization for Standardization
ITC	Irgasan-ticarcilline-kaliumchloraat bouillon
Mab	Monoclonaal antilichaam
MM	Minimaal medium
MPC	Magnetic Particle Concentrator
MTK	Malachietgroen-ticarcilline-kaliumchloraat-toevoeging
NA	Nutriënt agar
OH-CIN	Loogbehandeling gevolgd door uitplaten of afstrijken op cefsulodine-irgasan-novobiocine agar
Pab	Polyclonaal antilichaam
PCR	Polymerase Chain Reaction
pfz	Pepton fysiologische zoutoplossing
PBS	10 mM Fosfaatbuffer met fysiologisch zout (pH=7,5)
PBS-BSA	10 mM Fosfaatbuffer met fysiologisch zout en 0,1% bovine serum albumine (pH=7,5)
PBS-caseïne	10 mM Fosfaatbuffer met fysiologisch zout en 0,1% caseïne (pH=7,5)
PSB	Pepton-sorbitol-galzouten bouillon
SSDC	Salmonella-Shigella agar met desoxycholaat en galzouten
VRBG	Violet Red Bile Glucose agar

INHOUDSOPGAVE

blz.

ABSTRACT

SAMENVATTING 1

LIJST VAN AFKORTINGEN 2

1 INLEIDING 5
- 1.1 Achtergrond 5
- 1.2 Technieken 7
  - 1.2.1 Geleidbaarheidsmeting 7
  - 1.2.2 Immunomagnetische scheiding 7

2 MATERIALEN EN METHODEN 9
- 2.1 Bacteriestammen 9
- 2.2 Monstermateriaal 9
- 2.3 Werkwijze geleidbaarheidsmeting 10
- 2.4 Werkwijze immunomagnetische scheiding 10
- 2.5 Werkwijze klassieke methode 12
- 2.6 Werkwijze loogbehandeling 13
- 2.7 ISO-concept 13

3 ONTWIKKELING GELEIDBAARHEIDSMETING 15
- 3.1 Onderzoek met het Campden Yersinia Impedimetric Medium 15
- 3.2 Invloed van de mediumsamenstelling op de selectiviteit 18
- 3.3 Invloed van de temperatuur 24
- 3.4 Onderzoek met varkensgehaktmonsters 25
  - 3.4.1 Invloed van de bacterieflora 25
  - 3.4.2 Invloed van de verdunningsfactor van het varkensgehakt 27
  - 3.4.3 Toepassing van een voorkweek 27
  - 3.4.4 Toepassing van een voorkweek en invloed van een loogbehandeling 28
- 3.5 Discussie 30

4 ONTWIKKELING VAN EEN PROCEDURE VOOR IMMUNOMAGNETISCHE SCHEIDING 32

4.1 Inleiding 32
4.2 Resultaten Schaap anti-Muis beads 32
4.3 Resultaten Schaap anti-Konijn beads 35
4.4 Resultaten Tosylactivated beads 37
4.5 Specificiteit van de SaM-Mab O:3 en de SaR-Pab O:3 beads 37
4.6 Invloed van gehakt op de recovery van *Y. enterocolitica O:3* 38
4.7 Invloed van de concentratie SaR-Pab O:3 beads op de recovery van *Y. enterocolitica O:3* en begeleidingsflora 40
4.8 Optimalisatie van de IMS-procedure voor gehaktmonsters 41
4.9 Discussie 44

5 ONDERZOEK VAN PRAKTIJKMONSTERS 45
5.1 Onderzoek van kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters met geleidbaarheidsmeting 45
5.1.1 Invloed van voorkweek, loogbehandeling en immunomagnetische scheiding op de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting 45
5.1.2 Onderzoek van kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters met een klassieke plaatmethode en de geleidbaarheidsmeting 46
5.2 Onderzoek van varkenstonsillen met een klassieke plaatmethode en de geleidbaarheidsmeting 48
5.3 Onderzoek van varkenstongen met de ISO-methode en de geleidbaarheidsmeting 52
5.4 Onderzoek van varkensvlees met de ISO-methode en de geleidbaarheidsmeting 54
5.5 Discussie 57

6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN 58

LITERATUURLIJST

BIJLAGE I SAMENSTELLING VAN DE MICROBIOLOGISCHE MEDIA

BIJLAGE II SAMENSTELLING VAN DE BUFFERS

1 INLEIDING

1.1 Achtergrond

De bacteriesoort *Y. enterocolitica* bevat veel bio- en serogroepen. Een bekend biotyperingsschema is dat van Wauters (Wauters et al., 1987). Aan de hand van enkele biochemische kenmerken deelde hij *Y. enterocolitica* in vijf biogroepen in. In Wauters' schema is voor biogroep 1 een onderscheid gemaakt tussen biogroep 1A en 1B. Biogroep 1A zijn de niet pathogene omgevingsstammen en omvat vele serogroepen. Biogroep 1B omvat stammen van humane herkomst die een virulentie-plasmide bezitten en tot een beperkt aantal serogroepen behoren. De pathogene stammen van biogroep 1 worden vrijwel alleen in Noord-Amerika geïsoleerd. Biogroepen 2, 4 en 5 bevatten alleen pathogene stammen en biogroep 3 bevat zowel pathogene als niet pathogene stammen.

De O-antigenen op *Y. enterocolitica* zijn vergelijkbaar met die van andere gram-negatieve bacteriën. De H-antigenen lijken voor de typering van *Y. enterocolitica* niet van belang te zijn. Thans zijn meer dan 50 verschillende serotypen met behulp van O-antigenen beschreven. De belangrijkste humaan pathogene *Y. enterocolitica* stammen behoren tot de serogroepen O:3, O:8, O:9 en O:5.27. Serogroep O:3/biogroep 4 en in mindere mate serogroep O:9/biogroep 2 komen vooral in Europa, Japan en Canada voor. Serogroep O:8/biogroep 1B komt vooral in de Verenigde Staten voor en zelden in andere landen (De Boer et al., 1989).

Yersinia enterocolitica is een bacterie die bij mens en dier de ziekte yersiniose kan veroorzaken. Daar deze bacterie ook bij koelkasttemperaturen kan groeien, vormt ze een extra bedreiging voor de gezondheid van de mens.

Yersiniose manifesteert zich meestal in de vorm van gastro-enteritis met braken, koorts en diarree. Doordat de symptomen, zoals ook een hevige pijn in de onderbuik, lijken op die van appendicitis, wordt soms onnodig de appendix verwijderd. Dit ziektebeeld houdt verband met de door deze bacteriën geproduceerde hittestabiele enterotoxinen. Wanneer patiënten die deze acute ziekteverschijnselen vertonen, worden geopereerd, vindt men verdikte lymfeklieren in het mesenterium of een ontstekingsreactie in de wand van het laatste deel van de dunne darm (Knecht en Doornbos, 1991, De Boer, 1988).

Y. enterocolitica komt zeer wijd verspreid voor in de darmen en faeces van wilde dieren en huisdieren, maar is ook geïsoleerd uit grond, groenten, niet gechloreerde drinkwatervoorzieningen en oppervlaktewater. Het micro-organisme kan ook worden gevonden in dierlijke produkten als rauwe melk, room, ijs, rundvlees, oesters, lamsvlees en kip. Vrijwel alle isolaten uit voedingsmiddelen zijn van het biotype 1 en niet pathogeen (Knecht & Doornbos, 1991, De Boer, 1988).

Er zijn sterke aanwijzingen dat varkensvlees de voornaamste bron van pathogene *Y. enterocolitica* vormt. *Yersinia* infecties komen namelijk zelden bij moslims voor en varkens- en humane isolaten

van plasmiden van *Y. enterocolitica* bezitten identieke restrictiepatronen (Tauxe et al., 1987, Nesbakken, 1989.). Verder vonden Tauxe et al. (1987) in een Belgisch onderzoek, dat gevallen van yersiniose sterk gerelateerd waren aan de consumptie van rauw varkensvlees in de twee weken voordat de ziekteverschijnselen begonnen. Ook uit onderzoek van De Boer et al. (1991) is gebleken dat varkens een belangrijke bron zijn van pathogene *Y. enterocolitica*. Pathogene *Y. enterocolitica* stammen (serotypen O:3, O:9 en O:5.27) werden geïsoleerd uit 42% van de varkenstonsillen, 20% van de tongen, 17% van de rectum swabs en uit 1% van het varkensvlees. In Nederland vormt het varken de enige thans bekende bron van *Y. enterocolitica* serogroepen O:3 en O:9. Ondanks deze sterke aanwijzingen zijn tot nu toe geen gevallen van humane yersiniose beschreven, waarbij behandeling of consumptie van varkensvlees als oorzaak bewezen werd.

Wel bleek de consumptie van met *Y. enterocolitica* besmet voedsel de oorzaak bij enkele explosies van yersiniose in Noord-Amerika. De betrokken voedingsmiddelen waren rauwe melk, gepasteuriseerde melk, opgelost melkpoeder, tofu en ontkiemde bonen (Tauxe et al., 1987). In Europa zijn dergelijke explosies niet gerapporteerd, maar komen incidenten van yersiniose regelmatig voor. België is hierbij koploper; pathogene *Yersinia's* werden geïsoleerd uit 4% van faecesmonsters van patiënten met enteritis (Tauxe et al., 1987). In Denemarken worden jaarlijks 800 gevallen van yersiniose geregistreerd (Christensen, 1987). In Nederland is de aangifteplicht van yersiniose bij de Geneeskundige Hoofdinspectie sinds 1 januari 1984 vervallen. Schattingen variëren van enkele honderden tot enkele duizenden gevallen per jaar.

Het mag duidelijk zijn dat een goede en snelle detectiemethode voor pathogene *Yersinia's* zeer gewenst is. Momenteel wordt door de ISO (International Organization for Standardization) een kweekmethode voorgesteld voor de detectie van pathogene *Y. enterocolitica* (ISO/DIS 10273). Een nadeel van zo'n klassieke isolatiemethode is de analyseduur; het duurt circa 11 dagen voordat een definitieve uitslag bekend is. In opdracht van het Produktschap voor Vee en Vlees (PVV) voeren RIKILT-DLO, TNO en de VVDO een project uit met de titel: "Ontwikkeling van snelle en betrouwbare detectiemethoden voor bacteriën in de produktielijn van vlees en vleesprodukten". Het RIKILT-DLO richt zich op de ontwikkeling van een detectiemethode voor pathogene *Y. enterocolitica's*. Hiervoor worden binnen RIKILT-DLO een viertal technieken onderzocht; te weten geleidbaarheidsmeting, ImmunoMagnetische Scheiding (IMS), ImmunoFluorescentie (IF) en Polymerase Chain Reaction (PCR).

Het doel van het onderzoek is een detectiemethode op basis van de geleidbaarheidsmeting te ontwikkelen. De monsters die als verdacht uit dit onderzoek komen, worden bevestigd met immunofluorescentie of polymerase chain reaction. In figuur 1 is de totale proefopzet voor de ontwikkeling van een detectiemethode voor het aantonen van pathogene *Y. enterocolitica* in vlees weergegeven.

1.2 Technieken

1.2.1 Geleidbaarheidsmeting

Bij geleidbaarheidsmeting worden een monster en een voedingsmedium tesamen in een meetcel gebracht. Onder de juiste omstandigheden en een geschikte voedingsbodem kunnen de in het monster aanwezige micro-organismen zich vermeerderen. Door deze groei en stofwisselingsactiviteit verandert de elektrische geleidbaarheid van het medium in de meetcel (Eden en Eden, 1984). Door de geleidbaarheid tegen de tijd uit te zetten, ontstaat er een geleidbaarheidscurve. In dit onderzoek is voor de geleidbaarheid een medium ontwikkeld dat specifiek voor *Y. enterocolitica* is en dat bij de aanwezigheid van *Y. enterocolitica* in het monster een voor *Yersinia enterocolitica* karakteristieke geleidbaarheidscurve geeft.

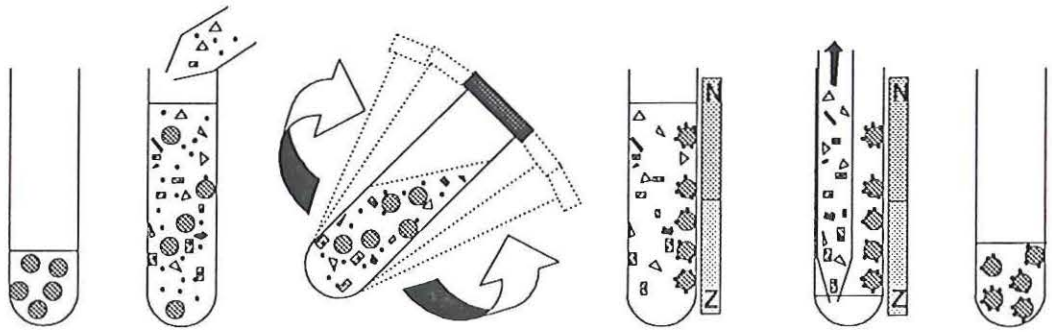
1.2.2 Immunomagnetische scheiding

Bij immunomagnetische scheiding worden magnetische bolletjes gebruikt waaraan specifieke antilichamen gekoppeld zijn. Tegen bacteriën gerichte antilichamen kunnen specifiek aan bepaalde bacteriecellen binden. Met behulp van een magneet kan het magnetisch bolletje, met daaraan de via het antilichaam gebonden bacterie, uit de oplossing geëxtraheerd worden. Door het geïsoleerde complex weer te resuspenderen in een kleiner volume, vindt concentratie van de bacterie plaats. Daar gebruik wordt gemaakt van specifieke antilichamen, zullen tevens ongewenste bacteriën en eventueel aanwezige groeibeperkende stoffen, zoals antibiotica en conserveermiddelen, worden verwijderd. Aangezien voor de isolatie van pathogene micro-organismen veelal een selectieve voorophoping noodzakelijk is, kan toepassing van immunomagnetische scheiding betekenen dat de benodigde voorophopingstijd aanzienlijk wordt verkort of zelfs geen voorophoping meer nodig is. Door verwijdering van storende micro-organismen kan ook het gebruik van minder selectieve media de isolatie van de bacterie vergemakkelijken. Figuur 2 geeft een schematisch overzicht van het principe van IMS.

Proefopzet:

Voorbehandeling	Immunomagnetische scheiding	Voorkweek
Detectie	Screening met geleidbaarheidsmeting	PCR-techniek
	IMS	
Identificatie	Immunologisch (agglutinatie, immunofluorescentie en ELISA) PCR-techniek met hybridisatieprobe	Hybridisatieprobe

Figuur 1. Proefopzet voor de ontwikkeling van een detectiemethode voor het aantonen van pathogene *Y. enterocolitica*.



Figuur 2. Schematische weergave van immunomagnetische scheiding.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Bacteriestammen

stam	nummer	invriesnummer	opmerking
Yersinia enterocolitica O:3	KvW 91015	Yers 99	gel./IMS
Yersinia enterocolitica O:4.33	RIVM 89208	Yers 51	geleidb.
Yersinia enterocolitica O:5	RIVM 89454	Yers 60	geleidb.
Yersinia enterocolitica O:7.13ab	RIVM 89390	Yers 76	geleidb.
Yersinia enterocolitica O:9	RIVM 89024	Yers 13	geleidb.
Aeromonas hydrophila		beads 20	geleidb.
Citrobacter freundii		beads 38	geleidb.
Enterobacter agglomerans		beads 44	geleidb.
Serratia marcescens	98		geleidb.
Yersinia intermedia	RIVM 89212	Yers 92	geleidb.
Yersinia intermedia	RIVM 89330	Yers 93	geleidb.
Yersinia pseudotuberculosis	RIVM 89427	Yers 94	geleidb.
Yersinia pseudotuberculosis	RIVM 89444	Yers 95	geleidb.
Yersinia frederiksenii	RIVM 89375	Yers 96	geleidb.
Yersinia frederiksenii	RIVM 89437	Yers 97	geleidb.
Yersinia enterocolitica O:9	RIVM 9200030	Yers 36	IMS
Citrobacter freundii	ATCC 8090	Micr 37	IMS
Salmonella typhimurium	ATCC 29946	Salm 286	IMS
Enterobacter agglomerans		Micr 40	IMS
Pseudomonas fluorescens		beads 51	IMS

2.2 Monstermateriaal

De varkensgehaktmonsters komen van diverse slagers en supermarkten uit Wageningen. De varkenstonsillen, varkenstongen en varkensvleesmonsters komen van Slachthuis Nijmegen bv. Van de varkensvleesmonsters komen de monsters 1 t/m 10 van de lijnslachting (deze zullen niet of nauwelijks besmet zijn, omdat het inwendige van het varken steriel is en er in de lijn nagenoeg geen besmetting kan plaatsvinden) en zijn de monsters 11 t/m 20 de uitsnijband gepasseerd, waardoor de kans op een contaminatie groter is.

2.3 Werkwijze geleidbaarheidsmeting

In figuur 3 is de werkwijze voor de geleidbaarheidsmeting schematisch weergegeven. Zie bijlage I voor de samenstelling van de microbiologische media.

---

a g monster + x ml geleidbaarheidsmedium[1], voorkweekmedium[2] of pfz[3]

↓

2 minuten stomacheren → [1] 3,2 ml in een Malthuscel voor de geleidbaarheidsmeting

→ [1,2,3] 0,2 ml in een Malthuscel met 3,0 ml geleidbaarheidsmedium voor de geleidbaarheidsmeting

↓

voorkweek in het voorkweekmedium[2] of y ml monster[3] (in pfz) + z ml voorkweekmedium

↓

voorkweek → 0,2 ml in een Malthuscel met 3,0 ml geleidbaarheidsmedium voor de geleidbaarheidsmeting

---

Figuur 3. Schematische weergave van de werkwijze voor de geleidbaarheidsmeting.

Er is gewerkt met het Malthus 2000 Systeem, bestaande uit een incubator, koeler, computer en printer. De incubatietemperatuur in de Malthus Growth Analyzer is in de eerste experimenten 25 ^{0}C. Later is 30 ^{0}C gebruikt, omdat dit de gevoeligheid verbeterde. Zie de Malthus 2000 User Guide voor een uitgebreide beschrijving van het Malthus 2000 Systeem.

2.4 Werkwijze immunomagnetische scheiding

In figuur 4 is de werkwijze voor de immunomagnetische scheiding schematisch weergegeven. Zie bijlage II voor de samenstelling van de buffers.
Er zijn drie verschillende soorten Dynabeads™ M-280 van Dynal gebruikt, namelijk:

* Sheep anti-Mouse IgG (SaM beads)

concentratie beads:	6-7.10^{8} beads/ml
diameter beads:	2,8 um

* Sheep anti-Rabbit IgG (SaR beads)

concentratie beads: $6\text{-}7.10^8$ beads/ml

diameter beads: 2,8 um

* Tosylactivated beads

concentratie beads: $6\text{-}7.10^8$ beads/ml

diameter beads: 2,8 um

Deze beads zijn gecoat met de volgende antisera:

* mouse Monoclonal antibody gericht tegen *Y. enterocolitica O:3* (Mab O:3)

antilichaamconcentratie: 100 ug/ml

Mab O:3 van de fabrikant Progen

* mouse Monoclonal antibody gericht tegen *Y. enterocolitica O:9* (Mab O:9)

antilichaamconcentratie: 50 ug/ml

Mab O:9 van de fabrikant Progen

* rabbit Polyclonal antibody gericht tegen *Y. enterocolitica O:3* (Pab O:3)

antilichaamconcentratie: 10 mg/ml

Pab O:3 van de fabrikant Accurate

* rabbit Polyclonal antibody gericht tegen *Y. enterocolitica O:9* (Pab O:9)

antilichaamconcentratie: 10 mg/ml

Pab O:9 van de fabrikant Accurate

wassen beads:	was[1] de beads 3 maal met buffer[2]
↓	
coaten beads met antiserum:	coat[3] de beads in de buffer met een antiserum
↓	
wassen beads:	was[1] de beads na het coaten 5 maal met buffer
↓	
incuberen beads met bacteriën:	incubeer de beads in buffer of medium met een microbiologisch monster[4]
↓	
wassen beads:	was[1] de beads na het incuberen 5 maal met buffer

Figuur 4. Schematische weergave van de werkwijze voor de immunomagnetische scheiding.

[1] Er is gebruik gemaakt van de Dynal MPC®-E die geschikt is voor 6 Eppendorfvaatjes van 1,5 ml en de Dynal MPC®-M met een uitneembare magneet die geschikt is voor 10 Eppendorfvaatjes van 1,5 ml. Voor het mengen is gebruik gemaakt van het rotator drive STR4 head over head mengapparaat van Stuart Scientific Co. LTD met bijbehorende houder voor Eppendorfvaatjes.
[2] Gedurende de hele procedure is steeds dezelfde buffer gebruikt (de PBS-BSA buffer of de PBS-caseïne buffer).
[3] Voor het head over head coaten is gebruik gemaakt van het head over head mengapparaat en voor het horizontaal schuddend coaten is gebruik gemaakt van het schudapparaat van New Brunswick Scientific en de schudincubator van Gallenkamp.
[4] Indien een filtratiestap is uitgevoerd, is gebruik gemaakt van steriele Millex®-SV 5,0 um Filter Units van Millipore.

2.5 Werkwijze klassieke plaatmethode

De werkwijze voor de klassieke plaatmethode is schematisch weergegeven in figuur 5.

monsterbehandeling:	10 g monster + 90 ml pfz
	↓
	2 minuten stomacheren
	↓
voorkweek:	1,0 ml + 9,0 ml ITC
	↓
	2 dagen stilstaand bij 25 °C incuberen
	↓
isolatie:	0,5% loogbehandeling en afstrijken op CIN agar
	↓
	bevestiging van de *Yersinia* verdachte kolonies
	(zie De Boer et al. 1989)

Figuur 5. Schematische weergave van de werkwijze voor een klassieke plaatmethode.

Zie bijlage I voor de samenstelling van de microbiologische media.

2.6 Werkwijze loogbehandeling

Natriumchloride (0,5%):

natriumchloride	2,5 g
gedestilleerd water	500 ml

Los de NaCl in het water op en steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C. Laat de NaCl-oplossing hierna afkoelen tot 50 ^{0}C.

Kaliumhydroxide (40%):

kaliumhydroxide	4,0 g

Breng de KOH over in een 10 ml maatkolf en voeg 7 ml gedestilleerd water toe. Los de KOH op en laat de oplossing afkoelen. Vul de maatkolf daarna tot de maatstreep aan met gedestilleerd water.

Samenstelling 0,5% loogoplossing:

0,5% natriumchloride	200 ml
40% kaliumhydroxide	2,5 ml

Voeg de KOH-oplossing aseptisch toe aan de tot 50 ^{0}C afgekoelde NaCl-oplossing. Meng zorgvuldig door zwenken en vul aseptisch uit in porties van 4,5 ml in steriele buizen. Bij een loogbehandeling wordt 0,5 ml van een monster bij 4,5 ml 0,5 % loogoplossing gepipetteerd en 3 seconden gemixt. Onmiddellijk daarna wordt op een CIN-plaat afgestreken.

2.7 ISO-concept

Zie ISO/DIS 10273 voor de bereiding van de media, de monsterbehandeling en de gevolgde procedure. De samenstelling van het basismedium voor de fermentatie van suikers ter identificatie van de *Yersinia species* is echter aangepast. Als basismedium voor de fermentatie van L-rhamnose, sucrose en D-salicine wordt door het ISO-concept een medium met pepton voorgeschreven. *Y. enterocolitica* kan door omzetting van pepton zuur vormen, waardoor het medium ook geel kleurt en het lijkt alsof de suiker gefermenteerd wordt. Het door de ISO voorgeschreven basismedium is vervangen door:

trypton (Difco)	3,0 g
gistextract (Difco)	1,5 g
natriumchloride	7,5 g
di-kaliumwaterstoffosfaat (K_2HPO_4)	0,45 g

broomthymolblauw (Merck)	0,12 g
agar (Difco)	22,5 g
gedestilleerd water	1500 ml

Los de ingrediënten in het water op door het medium in een magnetron op te koken. Steriliseer daarna gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C.

Bij een positieve reactie verandert de kleur van de agar van groen naar geel.

3 ONTWIKKELING GELEIDBAARHEIDSMETING

3.1 Onderzoek met het Campden Yersinia Impedimetric Medium

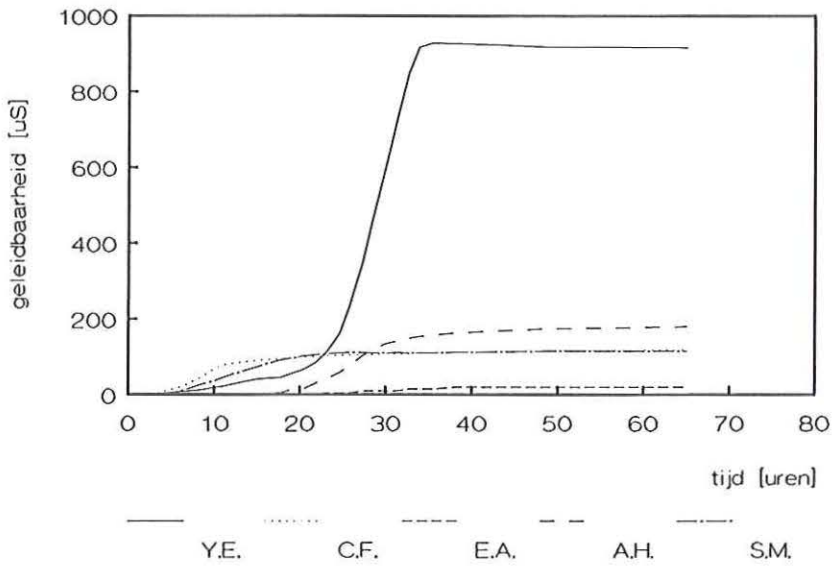
Voor *Yersinia enterocolitica* is een geleidbaarheidsmethode beschreven voor gepasteuriseerde melk (Walker, 1989). De drie belangrijkste serotypen O:3, O:8 en O:9 gaven daarbij een karakteristieke geleidbaarheidscurve te zien. Ook bleken niet *Yersinia enterocolitica* stammen zoals *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila*, en *Serratia marcescens* een voor *Yersinia enterocolitica* karakteristieke curve te geven. Het medium, Campden Yersinia Impedimetric Medium (CYIM), bestaat uit een basismedium van pepton, D-mannitol en NaCl met daaraan toegevoegd ureum en de drie antibiotica cefsulodine, irgasan en novobiocine. Afbraak van ureum door *Y. enterocolitica* leidt tot de vorming van ammonium, hetgeen in de Malthus Growth Analyzer een karakteristieke geleidbaarheidsverandering geeft.

Experimenten met dit medium lieten zien dat er inderdaad een karakteristieke geleidbaarheidscurve werd verkregen voor *Y. enterocolitica O:3* (geleidbaarheidsverandering circa 80 uS/uur en een maximum van circa 800 uS). De zogenaamde geregistreerde detectietijden zijn omgekeerd evenredig met de log van het aantal *Y. enterocolitica O:3* cellen in het monster. Reinculturen van de stammen die stoorden in het onderzoek van Walker (1989) zijn ook getest; *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila* en *Serratia marcescens* bleken echter geen voor *Y. enterocolitica* karakteristieke geleidbaarheidscurve te geven (zie figuur 6).

Voor de ontwikkeling van de geleidbaarheidsmeting is als monstermateriaal varkensgehakt gebruikt, omdat dit een gemalen produkt is, dat is opgebouwd uit vlees van verschillende herkomst. Uit deze eerste onderzoeken met varkensgehakt met een natuurlijke begeleidingsflora bleek, dat er in het CYIM ook een relatief grote geleidbaarheidsverandering optrad, terwijl geen *Y. enterocolitica* uit deze monsters geïsoleerd kon worden. Zoals ook uit figuur 7 blijkt, zijn deze zogenaamde varkensgehaktcurven minder steil dan de curven van reinculturen van *Y. enterocolitica O:3*. Het gehakt zelf heeft geen nadelige invloed op de geleidbaarheidscurve; aangezien met 25 kGy doorstraald gehakt (steriel) een vlakke curve geeft en steriel gehakt dat kunstmatig besmet is met *Y. enterocolitica O:3*, een voor *Y. enterocolitica* karakteristieke curve geeft. Het verdere onderzoek was erop gericht om na te gaan welke bacteriestammen de typische varkensgehaktcurve veroorzaakten en hoe deze varkensgehaktcurve kon worden voorkomen, zodat het onderscheid tussen een *Yersinia enterocolitica* curve en een varkensgehaktcurve werd verbeterd.

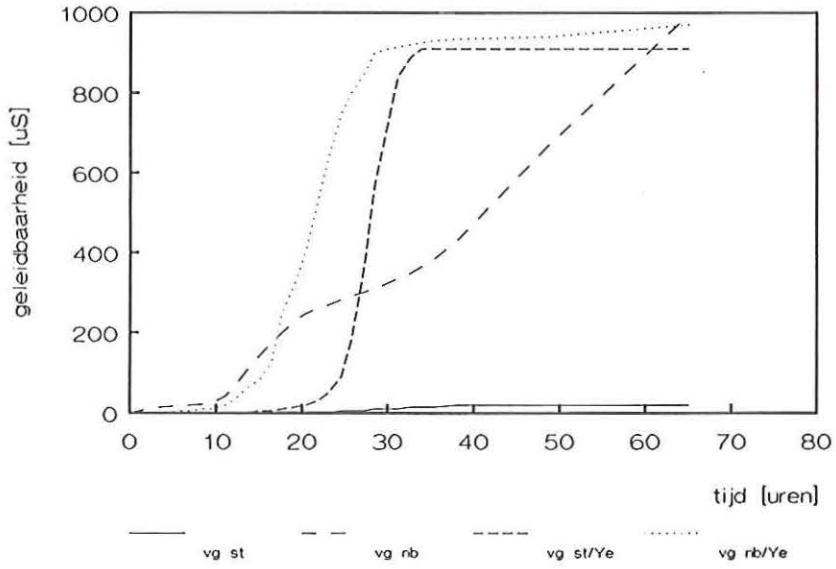
Hiertoe zijn van varkensgehaktmonsters met een natuurlijke begeleidingsflora, die in de Malthus getest zijn met het CYIM (5,0 g + 20 ml CYIM → 5 ml in een Malthuscel), vanuit de Malthus afstrijken gemaakt op Cefsoludine-Irgasan-Novobiocine agar (CIN agar) en Nutriënt Agar (NA), op het moment dat de varkensgehaktcurven hun maximum reeds hadden bereikt. Een aantal van de 32 op deze wijze geïsoleerde stammen zijn geïdentificeerd met een API 20 E- of een API 20 NE-

strip. De resultaten hiervan, tesamen met de respons van de reinculturen van deze stammen in CYIM, zijn vermeld in tabel 1.



Figuur 6. Geleidbaarheidscurven van *Y. enterocolitica O:3*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila* en *Serratia marcescens* in CYIM.

Y.E.= *Y. enterocolitica O:3*; C.F.= *Citrobacter freundii*; E.A.= *Enterobacter agglomerans*; A.H.= *Aeromonas hydrophila* en S.M.= *Serratia marcescens*



Figuur 7. Geleidbaarheidscurven van varkensgehakt met een natuurlijke begeleidingsflora, steriel varkensgehakt en steriel varkensgehakt dat kunstmatig besmet is met *Y. enterocolitica O:3*.

vg st= 5 gram steriel varkensgehakt gestomacherd met 20 ml CYIM; vg nb= 5 gram natuurlijk besmet varkensgehakt gestomacherd met 20 ml CYIM ($2{,}6.10^5$ kve/g); vg st/Ye= het steriele varkensgehakt dat kunstmatig besmet is met $1{,}3.10^3$ kve *Y. enterocolitica O:3* per g en vg nb/Ye= het natuurlijk besmet varkensgehakt dat kunstmatig besmet is met $1{,}3.10^4$ kve *Y. enterocolitica O:3* per g (na stomacheren is 5 ml in een Malthuscel gebracht voor de geleidbaarheidsmeting)

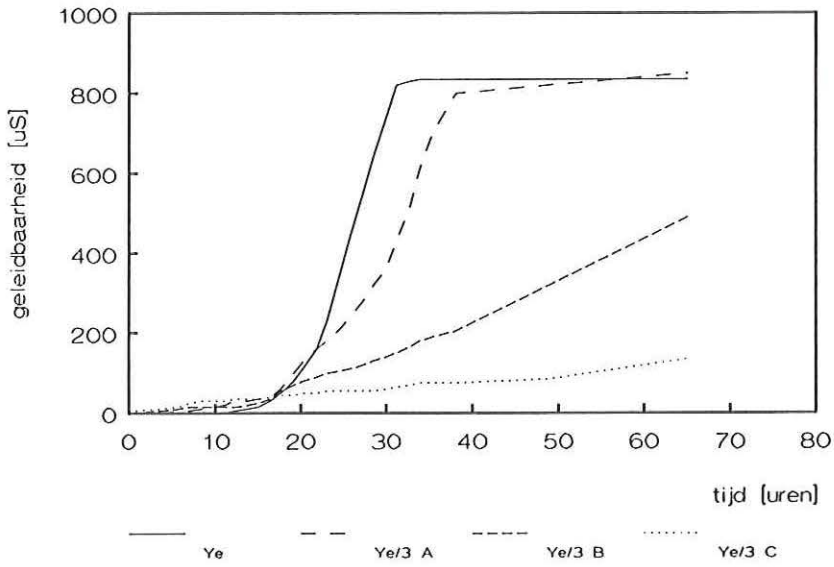
Tabel 1. Identificatie van bacteriestammen uit de natuurlijke begeleidingsflora van varkensgehakt die vanuit de Malthus uit het CYIM zijn geïsoleerd.

Stamnummer	Resultaat API 20 E Resultaat API 20 NE	Groei in CYIM	Maximale geleidbaarheid [uS]
3,13,15,17 en 26	*Serratia marcescens* *Serratia liquefaciens* *Enterobacter aerogenes*	+	100
9	*Enterobacter agglomerans*	±	100
19	*Pseudomonas fluorescens*	-	100
30	*Providencia alcalifaciens* *Providencia stuartii*	+	200
31	*Pseudomonas fluorescens*	-	200

Gezien de lage maximale geleidbaarheid van deze stammen vergeleken met *Y. enterocolitica O:3* en de varkensgehaktcurve, zijn deze stammen waarschijnlijk niet verantwoordelijk voor de varkensgehaktcurve. Dat niet de stammen zijn geïsoleerd die wel een varkensgehaktcurve veroorzaken, kan worden verklaard uit feit dat de afstrijken uit de Malthus zijn gemaakt op een tijdstip dat de geleidbaarheid reeds maximaal was. Uit latere experimenten is namelijk gebleken dat er tijdens de incubatie in de Malthus een verschuiving in de samenstelling van de bacterieflora plaatsvindt. De bacteriën die de varkensgehaktcurve veroorzaakten, zijn misschien overgroeid of afgestorven. Verder is het natuurlijk ook mogelijk dat de varkensgehaktcurve ontstaat als som van de geleidbaarheidscurven van verschillende bacteriën. Een mengcultuur van 6 van de 32 stammen gaf in de Malthus echter ook geen varkensgehaktcurve.

De in de tabel 1 genoemde stammen zijn ook getest in combinatie met *Y. enterocolitica O:3* in de verhoudingen 1:100, 1:1 en 100:1. In deze mengculturen werd over het algemeen pas bij een 100 maal overmaat van *Y. enterocolitica O:3* ten opzichte van de stoorstam een voor *Y. enterocolitica* karakteristieke curve verkregen. In deze gevallen werd de groei van *Y. enterocolitica O:3* duidelijk vertraagd. Zo was de helling van de geleidbaarheidscurve minder steil en werd het maximum van circa 800 uS op een later tijdstip bereikt (zie figuur 8). De stammen 30 en 31 beïnvloedden de groei van *Y. enterocolitica O:3* niet. Zelfs bij een 100 maal overmaat van deze stammen t.o.v. *Y. enterocolitica O:3* ontstond nog een voor *Y. enterocolitica* karakteristieke curve.

De karakteristieke *Yersinia enterocolitica O:3* curve trad ook op voor andere serotypen (O:9, O:4.33, O:5 en O:7.13ab) en andere *Yersinia's* (*Yersinia intermedia* en *Yersinia frederiksenii*). *Yersinia pseudotuberculosis* gaf geen *Yersinia* curve. Deze stam kan waarschijnlijk niet in het CYIM groeien.



Figuur 8. Geleidbaarheidscurven van mengculturen van *Y. enterocolitica O:3* en stam 3 in het CYIM.

Ye= een reincultuur van *Y. enterocolitica*; Ye/3 A= $3,3.10^4$ kve *Y. enterocolitica O:3* en $2,1.10^3$ kve stam 3 per ml CYIM; Ye/3 B= $3,3.10^4$ kve *Y. enterocolitica O:3* en $2,1.10^4$ kve stam 3 per ml CYIM en Ye/3 C= $3,3.10^4$ kve *Y. enterocolitica O:3* en $2,1.10^4$ kve stam 3 per ml CYIM (voor de geleidbaarheidsmeting is 3 ml CYIM gebruikt)

3.2 Invloed van de mediumsamenstelling op de selectiviteit

Om te voorkomen dat de groei van *Yersinia enterocolitica* wordt onderdrukt door bacteriën uit de begeleidingsflora van het varkensgehakt, zijn een groot aantal antibiotica en andere remmende stoffen toegevoegd aan het oorspronkelijke CYIM. Om de samenstelling van het CYIM zoveel mogelijk te laten aansluiten bij het klassieke ITC ophopingsmedium (Irgasan-Ticarcilline-kalium-Chloraat bouillon), zijn in eerste instantie van *Y. enterocolitica O:3* en de stoorstammen zowel de detectietijden in het CYIM als in het CYIM met een combinatie van de stoffen Malachietgroen 10 mg/l, Ticarcilline 1 mg/l en Kaliumchloraat 1 g/l (MTK) bepaald (zie tabel 2).

In het CYIM/MTK bleek dat *Y. enterocolitica O:3* nauwelijks geremd werd, terwijl met name de andere bacteriën uit de *Enterobacteriaceae*-groep sterk werden geremd. De MTK-toevoeging had ook geen invloed op het verloop van de geleidbaarheidscurve van *Y. enterocolitica O:3*. Andere combinaties en concentraties van twee of drie van de hierboven genoemde stoffen hadden of hetzelfde effect of waren veel minder effectief. Het feit dat stam 30 en 31 niet of nauwelijks worden geremd door deze combinatie, is geen probleem daar de aanwezigheid van deze beide micro-organismen geen enkele invloed heeft op de geleidbaarheidscurve van *Y. enterocolitica O:3*. Stam 19 wordt ook niet geremd door de combinatie van de drie stoffen, maar heeft daarentegen wel invloed op de groei en curve van *Y. enterocolitica O:3* en kan daardoor dus een probleem vormen. De combinatie van 10 mg/l malachietgroen, 1 mg/l ticarcilline en 1 g/l kaliumchloraat (MTK-

toevoeging aan het CYIM) is daarna getest op kunstmatig met *Y. enterocolitica O:3* besmet varkensgehakt (zie tabel 3). In deze tabel is weergegeven bij welke concentratie *Y. enterocolitica O:3* nog net een voor *Yersinia* karakteristieke curve optreedt.

Tabel 2. Invloed van malachietgroen, ticarcilline en kaliumchloraat (MTK) op de groei van *Y. enterocolitica O:3* en een aantal bacteriestammen uit de begeleidingsflora van het varkensgehakt.

Bacteriestam	Detectietijd in Malthus Growth Analyzer [uren]	
	Medium CYIM	Medium CYIM + MTK
Y. enterocolitica O:3	32,7	35,4
stamnummer 3	24,2	>>
stamnummer 13	24,8	>>
stamnummer 15	23,9	55,5
stamnummer 17	24,6	105,9
stamnummer 26	24,3	43,2
stamnummer 9	26,4	>>
stamnummer 19	33,5	38,7
stamnummer 30	25,2	37,5
stamnummer 31	34,3	36,6

>> betekent dat de detectietijd groter is dan 110 uur (na 110 uur is de geleidbaarheidsmeting gestopt)

Tabel 3. Invloed van malachietgroen, ticarcilline en kaliumchloraat op de selectiviteit van het CYIM.

Stoorflora [kve/g]	Medium: CYIM Concentratie[4] *Y. ent. O:3* [kve/g]	Verhouding stoorflora: *Y. ent. O:3* in CYIM	Medium: CYIM + MTK Concentratie[4] *Y. ent. O:3* [kve/g]	Verhouding stoorflora: *Y. ent O:3* in CYIM + MTK
[1]$2,6.10^5$	$1,3.10^6$	1 : 5	nb	nb
[2]$1,8.10^5$	$2,3.10^4$	8 : 1	23	8000 : 1
[2]$8,7.10^5$	$1,2.10^5$	7 : 1	$2,3.10^4$	38 : 1
[3] 10^5	$8,2.10^3$	12 : 1	$8,2.10^2$	120 : 1
[3] 10^6	$8,2.10^4$	12 : 1	$8,2.10^3$	120 : 1

nb = niet bepaald
[1] methode: 5 gram gehakt gestomacherd met 20 ml medium → 5,0 ml in een Malthuscel
[2] methode: 5 gram gehakt gestomacherd met 20 ml medium → 3,0 ml in een Malthuscel
[3] methode: 10 gram gehakt gestomacherd met 90 ml pfz → 0,2 ml in een Malthuscel + 3,0 ml medium (de concentratie van de begeleidingsflora is niet bepaald, maar is op de in de tabel staande waarde gesteld)
[4] de minimale concentratie *Y. enterocolitica O:3* waarbij nog net een voor *Yersinia* karakteristieke curve ontstaat

Uit de resultaten blijkt dat vergeleken met het CYIM in het CYIM met de MTK-toevoeging over het algemeen bij een 10 maal lagere concentratie *Y. enterocolitica O:3* nog een *Yersinia* curve optreedt. Nu uit zowel experimenten met reinculturen als met kunstmatig besmet varkensgehakt is gebleken dat de combinatie van deze drie stoffen de selectiviteit van het medium duidelijk verbetert, is onderzocht of een verdere verbetering van de selectiviteit van het medium (CYIM met de MTK-toevoeging) mogelijk was door toevoeging van één van de volgende stoffen: ampicilline, cephalothine, tetracycline, carbenicilline, natriumdesoxycholaat, seleniet, cefuroxime, kanamycine, streptomycine, erythromycine, chlooramphenicol, gentamicine, polymyxine, penicilline, galzouten, natriumpyruvaat, neutraalrood, kristalviolet, broomkresolpaars en briljantgroen. Dit is getest aan de hand van *Pseudomonas fluorescens* (stam 19). Deze bacterie werd nagenoeg niet geremd door de combinatie van malachietgroen, ticarcilline en kaliumchloraat en dit micro-organisme beïnvloedde wel de geleidbaarheidscurve van *Y. enterocolitica O:3*. De selectieve werking van deze stoffen is uitgedrukt als het verhoudingsgetal tussen de detectietijden van deze *Pseudomonas fluorescens* en *Y. enterocolitica O:3* in het CYIM/MTK en het CYIM/MTK met daaraan toegevoegd één van de hierboven genoemde stoffen. Een waarde kleiner dan 1,0 betekent dat *Y. enterocolitica O:3* in groei wordt geremd en *Ps. fluorescens* niet of dat *Y. enterocolitica O:3* meer in groei wordt geremd dan *Ps. fluorescens*. Een waarde kleiner dan 1,0 betekent dat het medium minder selectief is. Een waarde groter dan 1,0 betekent dat het medium selectiever wordt door de extra toevoeging. Uit tabel 4 blijkt dat geen van de geteste stoffen een gunstig effect had. Dat wil zeggen dat *Ps. fluorescens* niet werd geremd door toevoeging van een van deze stoffen of dat *Y. enterocolitica O:3* meer in groei werd geremd. In een later stadium zijn ook nog methanilgeel, nitrofurantoïne en neomycine getest. Ook deze stoffen verbeterden de selectiviteit van het medium niet.

Andere veranderingen aan het CYIM/MTK die zijn getest, maar waarbij de groei van *Y. enterocolitica O:3* ten opzichte van *Ps. fluorescens* en totale begeleidende flora niet werd begunstigd, zijn: sucrose in plaats van D-mannitol als C-bron, toevoeging van 0,1% agar, 5,0 ml in plaats van 3,0 ml medium in de Malthuscel, verlaging van de concentratie bacteriological pepton van 20 g/l naar 4 resp. 1 g/l, 10 g/l trypton i.p.v. 20 g/l bacteriological pepton, verhoging van de concentratie ureum met een factor 10 en verhoging van de pH van 8,0 naar 8,5 en 9,0.

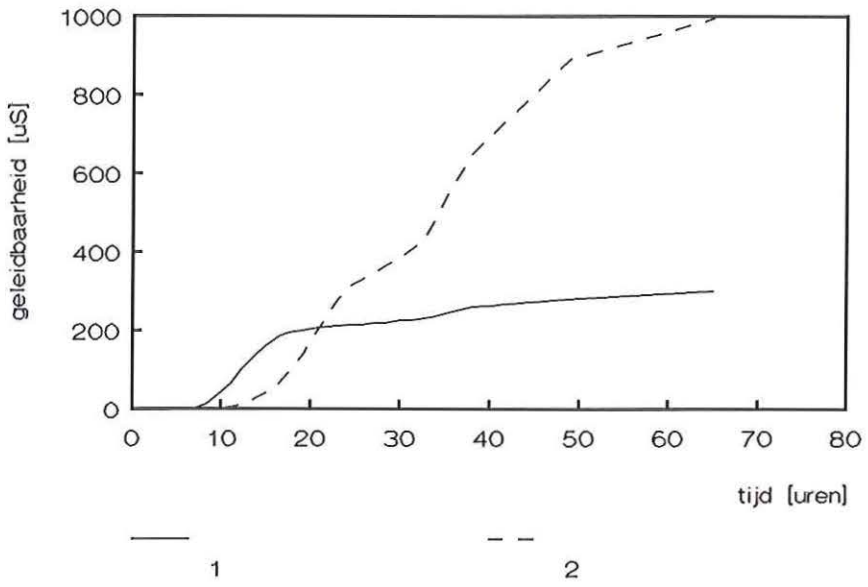
Het medium met sucrose i.p.v. D-mannitol, het medium met 0,1% agar en het medium met een 10 maal hogere ureumconcentratie gaven dezelfde resultaten als het gewone CYIM/MTK. Ook het volume in de Malthuscel had geen effect op de selectiviteit. Bij lagere concentraties bacteriological pepton (4 en 1 g/l) werd de groei van *Y. enterocolitica O:3* in ernstige mate vertraagd. Dit was ook het geval indien trypton i.p.v. bacteriological pepton werd gebruikt of als de pH van het medium werd verhoogd. Uit experimenten met een Minimaal Medium (MM) is gebleken dat *Y. enterocolitica O:3* bacteriological pepton nodig heeft om goed te kunnen groeien.

In een medium met D-xylose i.p.v. D-mannitol als C-bron is geen groei van *Y. enterocolitica O:3* mogelijk. In een medium met maltose als C-bron geeft *Y. enterocolitica O:3* een minder steile curve met een lager maximum (maximum ca. 600 uS) en geven varkensgehaktmonsters dezelfde typische varkensgehaktcurven als in het CYIM/MTK. Het onderscheid tussen beide curven is dan minder duidelijk. Het is wel mogelijk om het D-mannitol te vervangen door L-arabinose. Een medium met L-arabinose als C-bron geeft voor *Y. enterocolitica O:3* de karakteristieke *Yersinia* curve en geeft voor varkensgehaktmonsters de typische varkensgehaktcurven. Dit medium is dus niet selectiever dan het medium met D-mannitol.

In een medium zonder ureum is het signaal van *Y. enterocolitica O:3* niet karakteristiek (maximum ca. 100 uS). In media met L-methionine, L-asparagine, allantoïne of TriMethylAmineOxide.HCl (TMAO) i.p.v. ureum geeft *Y. enterocolitica O:3* ook geen karakteristieke curven (minder steile curven en lagere maxima). Het toevoegen van extra zout gaf ook geen verbetering in de selectiviteit van het CYIM/MTK. Bij een NaCl concentratie van 2,5% is geen groei van *Y. enterocolitica O:3* mogelijk en geeft de Malthus Growth Analyzer een vlakke curve.

In het CYIM/MTK met 4% Skim Milk heeft de varkensgehaktconcentratie een grote invloed (zie figuur 9). Bij hoge varkensgehaktconcentraties (10 g varkensgehakt + 40 ml medium) is de selectiviteit van het medium met 4% Skim Milk gelijk aan die van het medium zonder de Skim Milk. Het onderscheid tussen een varkensgehaktcurve en een *Yersinia* curve is echter beter. Bij hoge varkensgehaktconcentraties ontstaat er in het medium met 4% Skim Milk namelijk geen typische varkensgehaktcurve (maximum ca. 400 uS). Bij lage varkensgehaktconcentraties (10 g varkensgehakt + 640 ml medium) is de selectiviteit van het medium zonder Skim Milk beter dan die van het medium met 4% Skim Milk. In beide media ontstaat bij deze lagere varkensgehaktconcentratie een typische varkensgehaktcurve. In de praktijk zullen hoge concentraties varkensgehakt in de Malthus niet gebruikt worden, omdat, zoals later gebleken is, de gevoeligheid in de Malthus zonder voorkweek onvoldoende is en dus wordt de toevoeging van 4% Skim Milk niet als een echte verbetering gezien.

Conclusie: de combinatie van 10 mg/l malachietgroen, 1 mg/l ticarcilline en 1 g/l kaliumchloraat, MTK-toevoeging aan het CYIM, verbetert de selectiviteit van het medium.



Figuur 9. Invloed van de varkensgehaktconcentratie in het CYIM/MTK met 4% Skim Milk op de varkensgehaktcurve.

1= de varkensgehaktcurve die onstaat door 10 g natuurlijk besmet varkensgehakt met 40 ml CYIM/MTK met 4% Skim Milk te stomacheren → 3,2 ml in een Malthuscel (0,2 g/ml)
2= de varkensgehaktcurve die onstaat door 10 g natuurlijk besmet varkensgehakt met 40 ml CYIM/MTK met 4% Skim Milk te stomacheren → 0,2 ml in een Malthuscel met 3,0 ml CYIM/MTK met 4% Skim Milk ($1,3.10^{-2}$ g/ml)

Tabel 4. Invloed van remmende stoffen op de groei van *Y. enterocolitica O:3* en *Pseudomonas fluorescens*.

Remmende stof	Concentratie (mg/l)	t_d/t_d' *Ps. fl.* : t_d/t_d' *Y. ent.*
ampicilline	50,0 16,7 3,3	<1 0,6 0,8
cephalothine	50,0 16,7 3,3	<1 0,5 0,8
tetracycline	50,0 16,7 3,3	? 0,5 0,5
carbenicilline	500,0 166,7 50,0	0,4 0,7 0,9
Nadesoxycholaat	500,0 166,7 33,3	0,9 0,9 1,0
seleniet	16,7 3,3 0,8	1,0 1,0 0,9
cefuroxime	50,0 16,7 3,3	<1 <1 <1
kanamycine	50,0 16,7 3,3	? ? ?
streptomycine	50,0 16,7 3,3	? ? <1
erythromycine	50,0 16,7 3,3	<1 <1 0,4
chlooramphenicol	50,0 16,7 3,3	<1 <1 0,2
gentamicine	3,3 0,8 0,2	? <1 0,2
polymyxine	3,3 0,8 0,2	<1 0,6 0,9
penicilline	50,0 16,7 3,3	0,4 0,6 0,8
galzouten	3,3 g/l 1,7 g/l 0,4 g/l	1,2 0,9 1,0
Napyruvaat	500,0 166,7 33,3	1,1 1,0 1,1
neutraalrood	50,0 16,7 3,3	0,7 1,1 1,0
kristalviolet	50,0 16,7 3,3	<1 ? 0,6
broomkresolpaars	50,0 16,7 3,3	0,6 1,0 1,1
briljantgroen	50,0 16,7 3,3	<1 <1 ?

t_d'= de detectietijd in het CYIM/MTK
t_d= de detectietijd in het CYIM/MTK met de in de tabel staande toevoeging
<1 betekent dat *Y. enterocolitica O:3* niet gedetecteerd wordt en *Ps. fluorescens* wel
? betekent dat zowel *Ps. fluorescens* als *Y. enterocolitica O:3* niet gedetecteerd worden

3.3 Invloed van de temperatuur

Alle reeds vermelde experimenten zijn uitgevoerd bij 25 °C. *Ps. fluorescens* groeit goed bij 25 °C. *Pseudomonaceae* groeien over het algemeen minder goed bij hogere temperaturen en het temperatuuroptimum voor *Y. enterocolitica* is 28-29 °C. In dit experiment is onderzocht of een incubatietemperatuur in de Malthus van 30 °C de selectiviteit van het CYIM/MTK verbetert. Dit is getest met behulp van mengculturen van *Y. enterocolitica O:3* en *Ps. fluorescens*. Verder is, vanwege de wisselende resultaten met het CYIM/MTK met 4% Skim Milk, onderzocht wat de invloed van toevoeging van steriele en gepasteuriseerde melk aan het CYIM/MTK is. Uit eerdere experimenten was al gebleken dat toevoeging van steriel varkensgehakt aan het CYIM de groei van *Y. enterocolitica O:3* bevorderde. In dit experiment is naast de temperatuurinvloed ook bepaald of door toevoeging van steriel varkensgehakt aan het CYIM/MTK, de groei van *Ps. fluorescens* in dezelfde mate wordt gestimuleerd als de groei van *Y. enterocolitica O:3*. In tabel 5 zijn de resultaten weergegeven van de verhouding *Y. enterocolitica O:3* : *Ps. fluorescens* waarbij nog net een voor *Yersinia* karakteristieke curve ontstaat.

Tabel 5. Minimale verhouding in aantallen *Y. enterocolitica O:3* : *Ps. fluorescens* waarbij nog juist een voor *Yersinia* karakteristieke geleidbaarheidscurve optreedt.

Geleidbaarheidsmedium	Incubatietemperatuur in de Malthus	
	25 °C	30 °C
CYIM/MTK	>560 : 1	1 : 2
CYIM/MTK + 250 g steriel vg/l	6 : 1	1 : 194
CYIM/MTK + 250 g gester. melk/l	1 : 18	1 : 194
CYIM/MTK + 250 g gepast. melk/l	1 : >178	nb

nb = niet bepaald

Uit de resultaten bij 25 °C blijkt dat de selectiviteit van het medium verbetert door toevoeging van steriel varkensgehakt. Ook melk, en met name gepasteuriseerde melk, heeft een gunstig effect. Dit wordt veroorzaakt door de snellere groei van *Y. enterocolitica O:3* in de media met varkensgehakt of melk. Een reincultuur van *Y. enterocolitica O:3* wordt in de media met deze toevoegingen sneller gedetecteerd (door een kortere generatietijd) dan in het CYIM/MTK zonder deze toevoegingen. De groei van *Ps. fluorescens* wordt nauwelijks beïnvloed door de toevoeging van varkensgehakt of melk. Door toevoeging van steriel varkensgehakt wordt de verhouding waarbij een *Yersinia* curve optreedt een factor 100 beter. Verder blijkt dat 30 °C veel selectiever is dan 25 °C. De verhoudingen waarbij een *Yersinia* curve optreedt, worden door deze temperatuurverhoging een factor 1000 beter in het CYIM/MTK en het CYIM/MTK met het steriele varkensgehakt en wordt een factor 10

beter in het CYIM/MTK met de steriele melk. Een temperatuurverhoging van 25 naar 30 ^{0}C is tot nu toe de enige omstandigheid waarbij de belangrijke stoorder *Ps. fluorescens* relatief minder snel groeit of meer geremd wordt dan *Y. enterocolitica O:3*.

Experimenten bij 5 ^{0}C toonden aan dat de groei van *Y. enterocolitica O:3* bij deze temperatuur te veel wordt vertraagd en dus is deze temperatuur niet geschikt voor snelle detectie.

Conclusie: bij 30 ^{0}C is de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting voor *Yersinia enterocolitica* beter dan bij 25 ^{0}C.

3.4 Onderzoek met varkensgehaktmonsters

3.4.1 Invloed van de bacterieflora

In het nieuwe medium met de drie extra selectieve stoffen malachietgroen, ticarcilline en kaliumchloraat en bij een incubatietemperatuur van 30 ^{0}C bleek, met varkensgehaktmonsters waarin geen *Y. enterocolitica* aanwezig was, toch nog steeds een typische varkensgehaktcurve op te treden.

In een volgend onderzoek werden, van varkensgehaktmonsters die een varkensgehaktcurve gaven, op verschillende tijdstippen monsters uit de Malthuscel genomen. Deze monsters werden toegevoegd aan CYIM/MTK, CYIM/MTK zonder ureum en CYIM/MTK met steriel varkensgehakt. Het bleek dat alleen de monsters die op vroege tijdstippen (t<26 uur) waren genomen weer een varkensgehaktcurve gaven en dat deze varkensgehaktcurve alleen optrad indien in het medium zowel ureum als varkensgehakt aanwezig was.

In experimenten met varkensgehakt en kunstmatig met *Y. enterocolitica O:3* besmet varkensgehakt werden op verschillende tijdstippen monsters uit de Malthuscel genomen. Deze monsters werden uitgeplaat op CFC agar (*Pseudomonaceae*), CIN agar (*Yersinia's*), VRBG agar (*Enterobacteriaceae*), MacCONKEY agar (*Enterobacteriaceae*) en op OH-CIN agar (d.w.z. eerst een 0,5% loogbehandeling voordat op CIN agar werd uitgeplaat, zie par. 2.6 voor de werkwijze). Het volgende is geconstateerd:

1) Op hetzelfde tijdstip van uitplaten is er geen verschil tussen het kiemgetal op CFC, CIN, VRBG en MacCONKEY. Op alle 4 de platen stijgt het kiemgetal van 10^3-10^4 op t=0 naar 10^8-10^9 kve per ml in de Malthuscel op t=48 uur. Dat betekent dus dat zowel de *Pseudomonaceae* als de *Enterobacteriaceae* in het CYIM/MTK kunnen uitgroeien en dat beiden even snel groeien tot uiteindelijk een concentratie van 10^8-10^9 kve/ml. Verder bleek dat de CIN-plaat niet selectief is voor *Yersinia's*, maar ook veel *Pseudomonaceae* en *Enterobacteriaceae* bevat.

2) De samenstelling van de bacterieflora op de 4 platen verandert in de tijd en is met andere woorden afhankelijk van het tijdstip van uitplaten. Op t=4 uur zijn er andere stammen op de platen

aanwezig dan op t=48 uur. In de tijd gezien treedt er in het CYIM/MTK dus een verschuiving op in de samenstelling van de bacterieflora van het varkensgehaktmonster. De stammen die op tijdstip t=48 uur in de Malthuscel aanwezig zijn, zijn niet verantwoordelijk voor het ontstaan van een varkensgehaktcurve. Een monster dat na t=26 uur wordt genomen en wordt toegevoegd aan CYIM/MTK met steriel varkensgehakt, geeft immers geen varkensgehaktcurve meer.

3) In kunstmatig met *Y. enterocolitica O:3* besmette monsters, die wel een karakteristieke *Yersinia* curve geven, is geen isolatie van *Y. enterocolitica* O:3 mogelijk door uit te platen op CIN. Ook dit is weer een indicatie dat de CIN-plaat niet voldoende selectief is.

4) In kunstmatig met *Y. enterocolitica O:3* besmette varkensgehaktmonsters die een karakteristieke *Yersinia* curve geven, is m.b.v. een CIN-plaat wel isolatie van *Yersinia enterocolitica O:3* mogelijk indien het monster voor het uitplaten op CIN een 0,5% loogbehandeling ondergaat (0,5 ml monster + 4,5 ml 0,5% KOH/0,5% NaCl). Door deze loogbehandeling worden veel *Enterobacteriaceae* en *Pseudomonaceae* afgedood die op de CIN-plaat wel een kolonie zouden geven indien er geen loogbehandeling zou zijn uitgevoerd.

Verder zijn een aantal stammen die geïsoleerd zijn op een CFC-plaat (t<26 uur) als reincultuur in de Malthus Growth Analyzer getest in het CYIM/MTK met steriel varkensgehakt. Er was geen stam bij die een steile curve gaf en een hoog maximum had (de maxima waren circa 200 uS).

De conclusie uit al deze experimenten is dat één of meerdere micro-organismen (waarschijnlijk meerdere) uit de natuurlijke begeleidingsflora verantwoordelijk zijn voor de typische varkensgehaktcurve. Deze micro-organismen worden na t=26 uur overgroeid door andere bacteriën uit de natuurlijke begeleidingsflora. Het feit dat ureum nodig is voor het ontstaan van een varkensgehaktcurve, is een aanwijzing dat urease-positieve stammen uit de natuurlijke begeleidingsflora verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van de typische varkensgehaktcurve. Hierbij is een medium met geconcentreerd gehakt nodig om ze te laten groeien.

Mogelijkheden om de varkensgehaktcurve te elimineren en/of de selectiviteit te verbeteren zijn:

1) Verdunning van het varkensgehaktmonster. Voor het ontstaan van de typische varkensgehaktcurve is immers een medium met ureum en varkensgehakt nodig. Verlaging van de varkensgehaktconcentratie biedt dus een mogelijkheid voor het elimineren van de typische varkensgehaktcurve (zie par. 3.4.2).

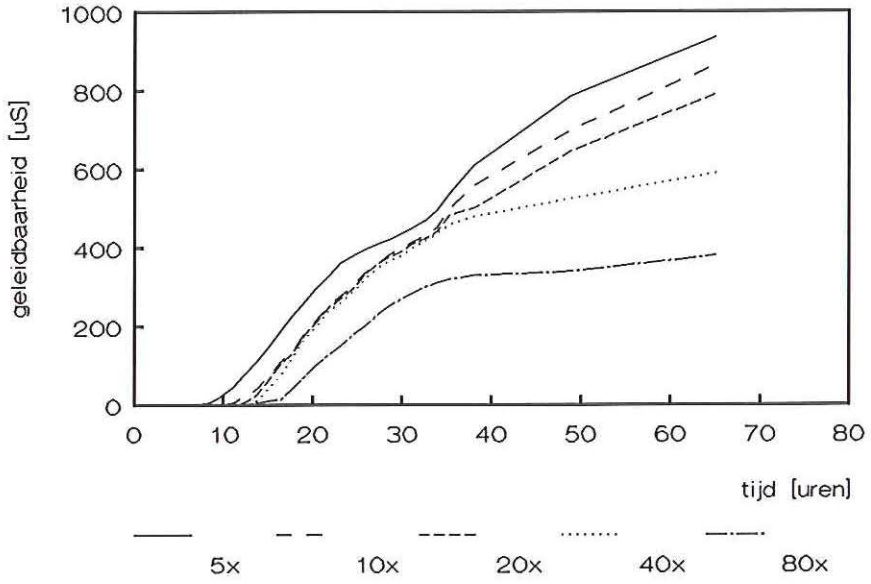
2) Een verschuiving in de samenstelling van de natuurlijke begeleidingsflora tot stand brengen door het toepassen van een voorkweek. De stammen die de varkensgehaktcurve veroorzaken worden dan overgroeid en/of afgedood (zie par. 3.4.3 en 3.4.4).

3) Een verschuiving in de samenstelling van de natuurlijke begeleidingsflora door het toepassen van een loogbehandeling. De stammen die de varkensgehaktcurve veroorzaken worden dan afgedood (zie par. 3.4.4).

4) Toepassing van ImmunoMagnetische Scheiding (IMS) waarbij de stammen die de varkensgehaktcurve veroorzaken, worden verwijderd (zie hoofstuk 4).

3.4.2 Invloed van de verdunningsfactor van het varkensgehakt

Verlaging van de gehaktconcentratie is getest door varkensgehaktmonsters in diverse verdunningen aan het Malthusmedium toe te voegen. Gebleken is dat het mogelijk is om de typische varkensgehaktcurve te elimineren door het gehakt minimaal een factor 80 maal te verdunnen. De curve bereikt dan een maximum van circa 300 uS (zie figuur 10).
Uit een experiment waarin varkensgehakt met een natuurlijke begeleidingsflora werd verdund in medium waaraan steriel varkensgehakt was toegevoegd (m.a.w. de flora werd verdund, maar het gehakt niet), bleek dat het niet mogelijk was om de typische varkensgehaktcurve te elimineren. Blijkbaar is de concentratie van de stammen die de typische varkensgehaktcurve veroorzaken zo hoog dat ze niet voldoende kunnen worden uitverdund.



Figuur 10. Invloed van de verdunningsfactor van het varkensgehaktmonster op de geleidbaarheidscurve.

5x = 0,20 g varkensgehakt per ml CYIM/MTK
10x = 0,10 g varkensgehakt per ml CYIM/MTK
20x = 0,05 g varkensgehakt per ml CYIM/MTK
40x = $2,5.10^{-2}$ g varkensgehakt per ml CYIM/MTK
80x = $1,3.10^{-2}$ g varkensgehakt per ml CYIM/MTK

3.4.3 Toepassing van een voorkweek

Het verdunnen van varkensgehaktmonsters biedt dus de mogelijkheid om de typische varkensgehaktcurve van natuurlijke besmette monsters te elimineren. Daar dit de gevoeligheid van de

geleidbaarheidsmeting reduceert, is nagegaan of dit verlies in gevoeligheid kan worden gecompenseerd door toepassing van een voorkweek. Bovendien kan toepassing van een voorkweek als bijkomend voordeel hebben dat de voor de varkensgehaktcurve verantwoordelijke bacterieflora wordt overgroeid. Dit betekent dus dat een voorkweek zeer gunstig kan zijn voor de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting.

Voorkweek van 0,2 g gehakt per ml (5 g + 20 ml) gedurende 4 uur bij kamertemperatuur in ITC, BOS, ITC met 4% Skim Milk en CYIM/MTK van varkensgehaktmonsters en kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters bleek de verhouding tussen *Y. enterocolitica O:3* en begeleidingsflora nagenoeg niet te veranderen. Dit is onderzocht door na 4 uur voorkweek uit te platen op NA agar en CIN agar. Bovendien werd in 4 uur tijd nauwelijks groei van *Y. enterocolitica O:3* of afdoding van begeleidingsflora geconstateerd. Waarschijnlijk was de tijdsduur van voorkweken te kort en/of is de selectiviteit van de media te nadelig beïnvloed door de relatief hoge concentratie aan monstermateriaal (0,2 g gehakt per ml).

In een volgend onderzoek is een 1 op 10 verdunning (0,1 g/ml) van een varkensgehaktmonster en een kunstmatig besmet varkensgehaktmonster gedurende 22 uur bij 15 ^{0}C in ITC voorgekweekt, alvorens geleidbaarheidsmeting werd uitgevoerd bij 30 ^{0}C. In vergelijking met hetzelfde monster waarop geen voorkweek was uitgevoerd, werd nu bij een 10x lagere concentratie aan *Y. enterocolitica O:3* nog een karakteristieke *Yersinia* curve verkregen. Er was dan een factor 400x overmaat aan begeleidende flora t.o.v. *Y. enterocolitica O:3* in het oorspronkelijke monster op tijdstip t=0 (zie par. 5.1.1). ITC met 4% Skim Milk gaf vergelijkbare resultaten.

3.4.4 Toepassing van een voorkweek en invloed van een loogbehandeling

In een experiment met 22 uur voorkweek in ITC bij kamertemperatuur van varkensgehaktmonsters en kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters (5 g + 20 ml ITC) gevolgd door geleidbaarheidsmeting (0,2 ml ITC VK + 3,0 ml CYIM/MTK) bleek de voorkweek, in tegenstelling tot het experiment in par. 3.4.3, geen verbetering in gevoeligheid te geven. Echter 22 uur voorkweek gevolgd door een loogbehandeling (0,5 ml ITC VK + 4,5 ml 0,5% KOH/0,5% NaCl → 0,2 ml + 3,0 ml CYIM/MTK) gaf wel een verbetering in gevoeligheid.

In een soortgelijk experiment met 22 uur voorkweek in ITC bij 15 ^{0}C (10 g + 90 ml ITC) gevolgd door geleidbaarheidsmeting (0,2 ml ITC VK + 3,0 ml CYIM/MTK) bleek de voorkweek wel een verbetering in gevoeligheid te geven (zie par. 3.4.3 en 5.1.1) en gaf een loogbehandeling van de voorkweek geen extra verbetering in gevoeligheid. Een loogbehandeling op t=0 van het ITC mengsel (dus zonder VK in ITC) gaf in dit experiment echter wel een verbetering in de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting.

Ook in een ander experiment met 22 uur voorkweek in ITC bij 15 ^{0}C (10 g + 90 ml ITC) bleek de

voorkweek weer een gunstig effect te geven. Verder is in dit experiment 1 ml van deze voorkweek toegevoegd aan een Eppendorfvaatje met $1{,}0.10^7$ magnetische bolletjes die gecoat zijn met een polyclonaal antiserum tegen *Y. enterocolitica O:3*. Indien deze bolletjes werden gebruikt in de geleidbaarheidsmeting, gaf dat een extra toename in de gevoeligheid vergeleken met het gebruik van een voorkweek alleen. Als deze magnetische bolletjes een loogbehandeling ondergingen, voordat ze in de geleidbaarheidsmeting werden gebruikt, ging juist weer wat gevoeligheid verloren (zie par. 5.1.1).

Door deze wisselende resultaten van het gebruik van een loogbehandeling, is de loogbehandeling nader onderzocht. Eerder was al gebleken dat isolatie van *Y. enterocolitica O:3* op een CIN-plaat alleen mogelijk was in combinatie met gebruik van een loogbehandeling.

Nader onderzoek leerde dat de recovery van reinculturen van *Y. enterocolitica* bij gebruik van 1,0% en 0,5% KOH kleiner is dan 1% (op zowel NA als CIN). Bij gebruik van 0,1% KOH was de recovery van *Y. enterocolitica O:3* op NA 57% en op CIN 49%. Bij gebruik van 1,0% en 0,5% KOH was de recovery van de begeleidingsflora van varkensgehakt groter dan 6% op NA en veel, veel kleiner dan 1% op CIN. Bij gebruik van 0,1% KOH was de recovery van begeleidingsflora 88% op NA en minder dan 1% op CIN. In de tabel 6 zijn de recovery's op NA en CIN na verschillende loogbehandelingen vermeld. Hieruit blijkt dat voorzichtigheid geboden is bij loogconcentraties groter of gelijk aan 0,5%, omdat de recovery van *Y. enterocolitica O:3* dan kleiner is dan 1%. Ook blijkt dat de loogbehandeling alleen niet selectief werkt. De recovery van begeleidingsflora na loogbehandeling en uitplaten op NA is immers groter dan die van *Y. enterocolitica O:3*. Een loogbehandeling werkt alleen selectief als daarna wordt uitgeplaat op CIN. De recovery van *Y. enterocolitica O:3* na 0,1% loogbehandeling en uitplaten op CIN is immers hoger dan die van de begeleidingsflora.

Tabel 6. Recovery's van *Y. enterocolitica O:3* en begeleidingsflora na loogbehandeling[1].

Concentratie KOH [%][1]	Recovery *Y. enterocolitica O:3* [%]		Recovery begeleidingsflora [%]	
	NA	CIN	NA	CIN
1,0	< 1,2	< 1,2	> 6	< 0,01
0,5	< 1,2	< 1,2	> 6	< 0,01
0,1	57	49	88	< 1,0

[1] concentratie KOH in 0,5% NaCl en een loogbehandeling door 3 seconden mixen van 0,5 ml monster met 4,5 ml van de loogoplossing

3.5 Discussie

Bij de geleidbaarheidsmeting is uitgegaan van het Campden Yersinia Impedimetric Medium, dat voor melk ontwikkeld is (Walker, 1989). Dit medium gaf goede resultaten met *Y. enterocolitica O:3*, maar de begeleidende flora van varkensgehakt bleek te storen. Om de groei van storende bacteriën te onderdrukken, zijn drie extra selectieve stoffen aan het medium toegevoegd, nl. 10 mg/l malachietgroen, 1 mg/l ticarcilline en 1 g/l kaliumchloraat. In het CYIM/MTK bleek dat *Y. enterocolitica O:3* nauwelijks geremd werd, terwijl met name de andere bacteriën uit de *Enterobacteriaceae*-groep sterk werden geremd. De MTK-toevoeging had ook geen invloed op het verloop van de geleidbaarheidscurve van *Y. enterocolitica O:3*. Uit experimenten met kunstmatig besmet varkensgehakt is gebleken dat de MTK-toevoeging de selectiviteit van het medium duidelijk verbetert. *Ps. fluorescens* werd niet geremd door de MTK-toevoeging, maar uit experimenten met mengculturen van *Y. enterocolitica O:3* en *Ps. fluorescens* is gebleken dat een incubatietemperatuur in de Malthus van 30 ^{0}C veel selectiever is dan 25 ^{0}C.

Toora et al. (1994) hebben aangetoond dat een medium met 4 mg/l irgasan de groei van de meeste gram-negatieve bacteriën remt en dat andere selectieve stoffen, alleen of in combinatie met irgasan, de groei van enkele *Y. enterocolitica* stammen remmen of de groei van irgasan-resistente gram-negatieve bacteriën niet remmen. Zo werd de groei van *Y. enterocolitica O:3* volgens Toora et al. geremd door aan een algemeen medium met 4 mg/l irgasan, 2,0 mg/l ticarcilline toe te voegen en werd de groei zelfs sterk geremd indien 1,0 g/l kaliumchloraat werd toegevoegd. Uit dit onderzoek bleek echter dat de MTK-toevoeging aan het CYIM, waarin ook 4 mg/l irgasan aanwezig is, de groei van andere gram-negatieve bacteriën sterk remde en de groei van *Y. enterocolitica O:3* niet remde. Ook de combinatie 6,7 mg/l ticarcilline en 1,0 g/l kaliumchloraat en de combinatie 10,0 mg/l malachietgroen, 6,7 mg/l ticarcilline en 3,3 g/l kaliumchloraat bleken de selectiviteit van het CYIM te verbeteren en hadden geen effect op de groei van *Y. enterocolitica O:3* (gegevens niet in dit rapport verwerkt). De resultaten in dit onderzoek komen dus niet overeen met die van Toora et al., maar komen wel overeen met die van Wauters et al. (1988) en De Boer et al. (1989), die voor de isolatie van pathogene *Y. enterocolitica O:3* een medium met irgasan, ticarcilline en kaliumchloraat aanbevelen.

In het nieuwe medium met de drie extra selectieve stoffen en bij een incubatietemperatuur in de Malthus Growth Analyzer van 30 ^{0}C bleek, met varkensgehaktmonsters waarin geen *Y. enterocolitica* aanwezig was, toch nog steeds een typische varkensgehaktcurve op te treden. Deze typische varkensgehaktcurve wordt waarschijnlijk veroorzaakt door enkele urease-positieve stammen uit de begeleidingsflora. Voor het ontstaan van de typische varkensgehaktcurve is ureum nodig en de stammen die deze curve veroorzaken hebben een medium met geconcentreerd gehakt nodig om goed te kunnen groeien. Het is dan ook mogelijk gebleken om de typische varkensgehaktcurve te elimineren door het varkensgehaktmonster te verdunnen. Daar dit de gevoeligheid van de

geleidbaarheidsmeting reduceert, is nagegaan of dit verlies in gevoeligheid kan worden gecompenseerd door toepassing van een voorkweek.

Een overnacht voorkweek in ITC bij 15 ^{0}C gevolgd door geleidbaarheidsmeting gaf, vergeleken met hetzelfde varkensgehaktmonster waarop geen voorkweek was uitgevoerd, bij een 10x lagere concentratie *Y. enterocolitica O:3* nog een karakteristieke *Yersinia* curve. Er was dan een factor 400x overmaat aan begeleidende flora t.o.v. *Y. enterocolitica O:3* in het oorspronkelijke monster op tijdstip t=0.

Loogbehandelingen van reinculturen van *Y enterocolitica O:3* en varkensgehaktmonsters gaven wisselende resultaten en gebleken is dat een loogbehandeling alleen selectief is als daarna wordt uitgeplaat of afgestreken op een selectieve CIN-plaat. Het gebruik van loogconcentraties van 0,5% of hoger wordt afgeraden daar *Y. enterocolitica O:3* dan voor meer dan 99% wordt afgedood.

4 ONTWIKKELING VAN EEN PROCEDURE VOOR IMMUNOMAGNETISCHE SCHEIDING

4.1 Inleiding

ImmunoMagnetische Scheiding (IMS) is een immunologische techniek, waarbij gebruik wordt gemaakt van magnetische bolletjes. Deze bolletjes worden gecoat met antilichamen, die zijn gevormd tegen de te isoleren bacterie. Tegen bacteriën gerichte antilichamen kunnen specifiek aan bepaalde bacteriecellen binden. Met behulp van een magneet kan het magnetisch bolletje met daaraan de, via het antilichaam gebonden, bacterie uit de oplossing geëxtraheerd worden. Storende bacteriën en ongewenste stoffen uit het monster worden op deze wijze verwijderd. Bij IMS als voorbehandelingstechniek vindt dus zuivering van de doelbacterie plaats. Aannemelijk is dat de resultaten van de hierna toegepaste screenings- of detectiemethode aanzienlijk zullen verbeteren.

Het doel van dit onderzoek is om m.b.v. de geleidbaarheidsmeting vleesmonsters te screenen op pathogene *Y. enterocolitica*. De screening met de Malthus vindt hetzij rechtstreeks op een monster plaats of na voorkweek van het monster gedurende meerdere dagen. Een verkorting van de ophopingsfase (voorkweek) kan worden bewerkstelligd door een voorbehandeling met immuno-magnetische scheiding uit te voeren. Toepassing van een voorbehandeling met IMS kan de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting verbeteren. De IMS-techniek kan ook in combinatie met de PCR-detectie gebruikt worden.

Kapperud et al. (1993) hebben een oriënterend onderzoek naar het ontwikkelen van methoden voor de detectie van pathogene *Y. enterocolitica* in voedingsmiddelen beschreven, waarbij gebruik is gemaakt van IMS en een tweestaps PCR-techniek. Lund et al. (1988) gebruikten de techniek voor de isolatie van K88$^+$ *Escherichia coli*. Vermunt et al. (1992) onderzochten diverse factoren die van invloed zijn op de binding van *Salmonella livingstone* aan magnetische bolletjes die gecoat waren met een polyclonaal antiserum.

In dit onderzoek zijn verschillende soorten magnetische bolletjes gecoat met monoclonale en polyclonale antisera tegen *Y. enterocolitica O:3* en *Y. enterocolitica O:9*.

4.2 Resultaten Schaap anti-Muis beads

In eerste instantie zijn experimenten uitgevoerd met magnetische bolletjes, diameter 2,8 um en bezet met Schaap anti-Muis IgG moleculen (SaM beads). Deze SaM beads worden gecoat met een muis monoclonaal antiserum tegen *Y. enterocolitica O:3* (Mab O:3). Als testorganisme is dan ook de in Europa meest voorkomende pathogene *Y. enterocolitica* serogroep O:3 gebruikt.

Immunomagnetische scheiding bestaat uit de volgende stappen:

- het coaten van de beads met specifieke antilichamen;
- het incuberen van de beads met een monster;
- het wassen van deze met bacteriën geïncubeerde beads en
- detectie van de op de beads gebonden bacteriën.

In tabel 7 is de invloed van de concentratie beads, het coat- en incubatiemedium en de temperatuur tijdens het coaten van de SaM beads met het Mab O:3 en het incuberen van de SaM-Mab O:3 beads met *Y. enterocolitica O:3* weergegeven.

Tabel 7. Invloed van de beadsconcentratie, het coat- en incubatiemedium en de coat- en incubatietemperatuur op de recovery van *Y. enterocolitica O:3* met SaM-Mab O:3 beads[1].

Temperatuur [°C]	Concentratie *Y. ent. O:3* [kve/ml]	Concentratie beads [1/ml]	Medium[2]	Recovery[3] [%]
8	$1,6.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-BSA	19
8	$1,6.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-caseïne	39
kT	$1,6.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-BSA	26
kT	$1,6.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-caseïne	52
8	$1,6.10^5$	$1,0.10^7$	PBS-BSA	29
8	$1,6.10^5$	$1,0.10^7$	PBS-caseïne	61
kT	$1,6.10^5$	$1,0.10^7$	PBS-BSA	69
kT	$1,6.10^5$	$1,0.10^7$	PBS-caseïne	68
8	$7,2.10^4$	$5,0.10^6$	PBS-BSA	36
8	$7,2.10^4$	$5,0.10^6$	PBS-caseïne	41
8	$7,2.10^4$	$5,0.10^6$	PBS-BSA	0^5
8	$7,2.10^4$	$5,0.10^6$	PBS-caseïne	0^5
10	$1,0.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-BSA	21
10	$1,0.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-caseïne	37
10	$1,4.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-BSA	25^4
10	$1,4.10^5$	$5,0.10^6$	PBS-caseïne	36^4

[1] - beads gecoat met 32,5 ug Mab O:3 per mg SaM beads
- coaten: 1 dag horizontaal schudden bij kamertemperatuur
- incuberen: 60 minuten horizontaal schudden bij kamertemperatuur
- wassen: 5 maal met coat- en incubatiebuffer

[2] - 10 mM PBS buffer pH=7,5 met 0,1% BSA of 0,1% caseïne

[3] - enkelvoudige bepalingen op NA

[4] - 2 dagen oude cellen: 1,4.10e5 *Y. enterocolitica O:3* kve per ml

[5] - ongecoate SaM beads (blanco beads)

Hieruit blijkt dat een beadsconcentratie van $1,0.10^7$ beads/ml hogere recovery's geeft dan $5,0.10^6$ beads/ml, dat PBS-caseïne hogere recovery's geeft dan PBS-BSA en dat het coaten en het incuberen bij kamertemperatuur (kT) hogere recovery's geeft dan wanneer deze beide stappen

worden uitgevoerd bij 8 of 10 ^{0}C. Deze hogere recovery bij kamertemperatuur wordt niet veroorzaakt door groei van *Y. enterocolitica O:3* in de buffer. Ook blijkt dat er geen verschil is in recovery tussen 1 dag en 2 dagen oude *Y. enterocolitica O:3* cellen. De recovery met blanco SaM beads is kleiner dan 1% en dus is de binding van de *Y. enterocolitica O:3* cellen aan de SaM-Mab O:3 beads specifiek.

Uit latere experimenten is gebleken dat de wijze van mengen tijdens het coaten en incuberen wel invloed had. Beiden horizontaal schuddend gaf een recovery van 58%, terwijl bij beiden head over head mengend de recovery 26% bedroeg (zie tabel 8). De wijze van mengen tijdens het wassen van de beads bleek nagenoeg geen invloed te hebben.

Tabel 8. Invloed van de wijze van mengen tijdens het coaten en incuberen.

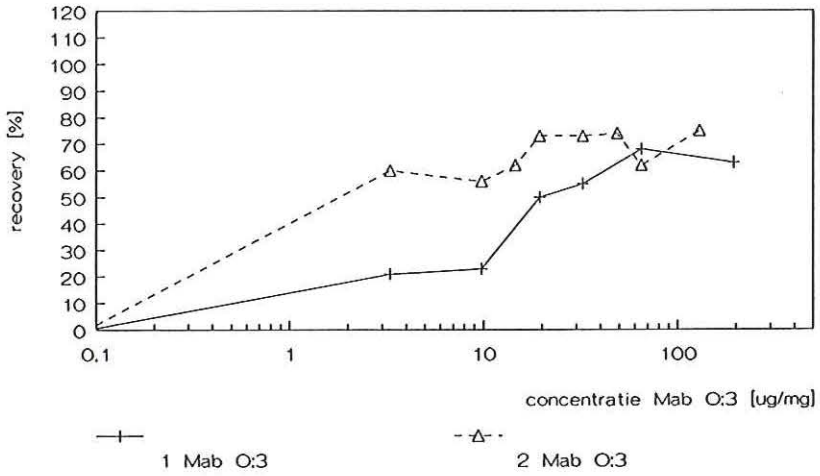
Soort beads	Wijze van coaten en incuberen	Recovery[1] [%]
SaM-Mab O:3	horizontaal schuddend	58
SaM	horizontaal schuddend	0
SaM-Mab O:3	head over head	26
SaM	head over head	0

[1] enkelvoudige bepalingen op NA
buffer: PBS-caseïne
beadsconcentratie: $1,0.10^{7}$ beads per ml
bacterieconcentratie: $1,3.10^{5}$ *Y. enterocolitica O:3* kve per ml
(zie tabel 6 voor de overige omstandigheden)

Vervolgens is in een tweetal experimenten nagegaan wat de optimale coatconcentratie aan muis Mab O:3 was, waarbij de recovery van *Y. enterocolitica O:3* maximaal was. Uit figuur 11 blijkt dat de betreffende concentratie nogal verschilde tussen beide experimenten. Dit verschil werd waarschijnlijk veroorzaakt doordat in beide experimenten een andere batch van het muis Mab O:3 is gebruikt. Er is geconcludeerd dat bij een coatconcentratie van 50 ug Mab O:3 per mg SaM beads de recovery van de *Y. enterocolitica O:3* cellen in ieder geval maximaal zal zijn. Naar aanleiding van bovenstaande resultaten wordt de volgende procedure aanbevolen:

- was de SaM beads 3 maal met PBS-caseïne;
- coat de beads door toevoeging van 50 ug Mab O:3 per mg SaM beads in PBS-caseïne door deze oplossing gedurende 1 dag horizontaal te schudden bij kamertemperatuur;
- was de met Mab O:3 gecoate SaM beads 5 maal met PBS-caseïne, zodat de niet gecoate Mab O:3 moleculen worden verwijderd;
- incubeer 10^{7} SaM-Mab O:3 beads met 1 ml met ± 10^{5} *Y. enterocolitica O:3* kve in PBS-caseïne gedurende 60 minuten horizontaal schuddend bij kamertemperatuur en
- was de monsters 5 maal met PBS-caseïne.

Bovenstaande procedure leidt tot recovery's op Nutriënt Agar van 78 ± 26% (n=2). Indien 32,5 ug Mab O:3 per mg beads werd gebruikt bij het coaten was de recovery 63 ± 8% (n=4). Bij de negatieve controle (blanco SaM beads) bleek nagenoeg geen binding van *Y. enterocolitica O:3* op te treden (recovery's van 0,0-0,2%).



Figuur 11. Bepaling van de optimale coatconcentratie Mab O:3 voor het coaten van SaM beads.

[1] 1,5.10[5] *Y. enterocolitica O:3* kve per ml
[2] 9,0.10[4] *Y. enterocolitica O:3* kve per ml
(de recovery is bepaald door enkelvoudige bepalingen op NA en de overige omstandigheden zijn volgens de aanbevolen procedure)

4.3 Resultaten Schaap anti-Konijn beads

Magnetische bolletjes met een diameter van 2,8 um en een oppervlak dat bezet is met Schaap anti-Konijn IgG moleculen (SaR beads) worden gecoat met een konijn polyclonaal antiserum tegen *Y. enterocolitica O:3* (Pab O:3).

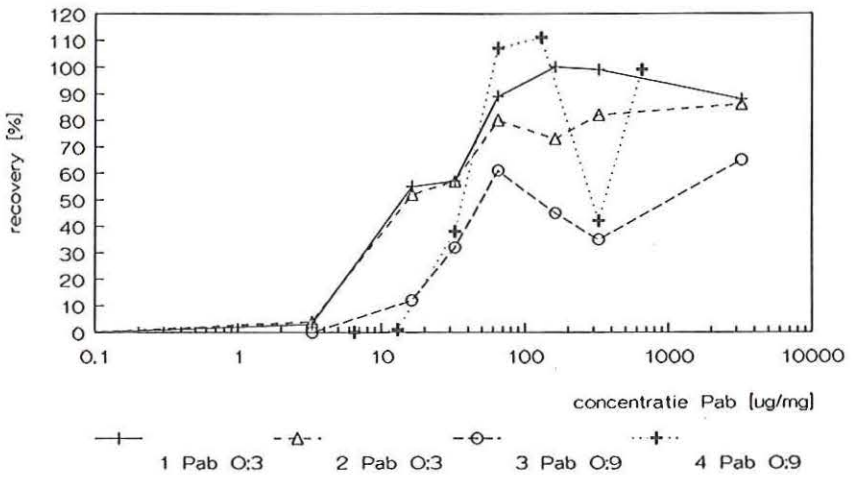
In een tweetal experimenten is nagegaan wat de optimale coatconcentratie aan konijn Pab O:3 was, waarbij de recovery van *Y. enterocolitica O:3* maximaal was. Uit figuur 12 blijkt dat bij een coatconcentratie van 65 ug Pab O:3 per mg SaR beads de recovery van *Y. enterocolitica O:3* maximaal is. De recovery 77 ± 12% (n=3) is vergelijkbaar met de recovery die wordt behaald met muis Mab O:3 gecoate SaM beads (78 ± 26%, n=2).

Verder bleek dat PBS-caseïne als coat- en incubatiebuffer hogere recovery's gaf dan PBS-BSA. Uit eerdere experimenten was ook bij het gebruik van de SaR beads gebleken dat horizontaal schuddend coaten hogere recovery's gaf dan head over head coaten.

Voor het coaten van SaR beads met konijn Pab O:3 wordt dan ook de volgende procedure aanbevolen:

- was de SaR beads 3 maal met PBS-caseïne;
- coat de beads door toevoeging van 65 ug Pab O:3 per mg SaR beads in PBS-caseïne door deze oplossing gedurende 1 dag horizontaal te schudden bij kamertemperatuur;
- was de met Pab O:3 gecoate SaR beads 5 maal met PBS-caseïne, zodat de niet gecoate Pab O:3 moleculen worden verwijderd;
- incubeer 10^7 SaR-Pab O:3 beads met 1 ml met ± 10^5 *Y. enterocolitica O:3* kve in PBS-caseïne gedurende 60 minuten horizontaal schuddend bij kamertemperatuur en
- was de monsters 5 maal met PBS-caseïne.

In twee experimenten met SaR beads die volgens bovenstaande procedure worden gecoat met een konijn polyclonaal antiserum tegen *Y. enterocolitica O:9* (Pab O:9), is ook voor het Pab O:9 bepaald wat de optimale coatconcentratie van het Pab O:9 is. Uit figuur 12 blijkt dat de recovery aan *Y. enterocolitica O:9* maximaal is bij een coatconcentratie van 65 ug Pab O:9 per mg SaR beads. De recovery is dan 84 ± 33% (n=2).



Figuur 12. Bepaling van de optimale coatconcentratie Pab O:3 en Pab O:9 voor het coaten van SaR beads.

[1] 1,5.10[5] *Y. enterocolitica O:3* kve per ml
[2] 5,4.10[4] *Y. enterocolitica O:3* kve per ml
[3] 1,6.10[5] *Y. enterocolitica O:9* kve per ml
[4] 1,9.10[4] *Y. enterocolitica O:9* kve per ml
(de recovery is bepaald door enkelvoudige bepalingen op NA en de overige omstandigheden zijn volgens de aanbevolen procedure)

4.4 Resultaten Tosylactivated beads

Magnetische bolletjes met een diameter van 2,8 um en een oppervlak dat bezet is met zogenaamde Tosylactivated groepen worden gecoat met het muis monoclonaal antiserum dat gericht is tegen *Y. enterocolitica O:3*. De procedure is vergelijkbaar met de procedure die wordt aanbevolen voor de SaM en de SaR beads. De enige verschillen zijn dat nu een 50 mM boraatbuffer pH=9,5 wordt gebruikt voor het wassen en coaten van de beads en dat de gebruikte concentratie voor het coaten 20 ug Mab O:3 per mg Tosylactivated beads is (door de fabrikant aanbevolen). De wasstappen na het coaten en incuberen van de beads met de *Y. enterocolitica O:3* cellen worden weer in de 10 mM PBS buffer pH=7,5 met 0,1% caseïne uitgevoerd. De boraatbuffer met pH=9,5 als coatbuffer is nodig om de reactieve groepen op de Tosylactivated beads te activeren. De recovery van *Y. enterocolitica O:3* met deze beads was 0%. De reden hiervoor is dat het muis monoclonaal antiserum een overmaat aan BSA bevat. De concentratie aan monoclonale antilichamen (Mab O:3) in het serum is 100 ug/ml en de concentratie BSA in het serum is 5000 ug/ml (0,5%). Deze 50 maal overmaat aan BSA zorgt er dus voor dat er voornamelijk BSA aan de Tosylactivated beads gebonden wordt. Voor het coaten van Tosylactivated beads moeten de antisera dus vrij zijn van andere eiwitten. Het is dus niet mogelijk om de Tosylactivated beads te coaten met het Mab O:3; tenzij dit antiserum wordt gezuiverd van de BSA fractie. Het coaten van deze beads met het polyclonale antiserum (Pab O:3), waarin geen BSA aanwezig is, leverde om nog onduidelijke redenen zeer lage recovery's van *Y. enterocolitica O:3* op (zie tabel 9).

Tabel 9. Recovery's van *Y. enterocolitica O:3* met Pab O:3 gecoate Tosylactivated beads.

Concentratie Pab O:3 [ug Pab O:3/mg beads]	Concentratie [kve/ml] *Y. enterocolitica O:3*	Recovery[1] [%]
0,0	$5,4.10^4$	1
32,5	$5,4.10^4$	7
325,0	$5,4.10^4$	13
3250,0	$5,4.10^4$	3
3250,0	$8,6.10^4$	11

[1] enkelvoudige bepalingen op NA

4.5 Specificiteit van de SaM-Mab O:3 en de SaR-Pab O:3 beads

De SaM en SaR beads zijn volgens de aanbevolen procedures gecoat. Om de specificiteit van de IMS-procedure te bepalen zijn de recovery's bepaald van reinculturen van *Y. enterocolitica O:3*,

Pseudomonas fluorescens, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* en *Salmonella typhimurium* (zie tabel 10).

Tabel 10. Recovery's van *Y. enterocolitica O:3*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* en *Salmonella typhimurium* met SaM-Mab O:3 en SaR-Pab O:3 beads.

Stam	Concentratie [kve/ml]	Recovery[1] met SaM-Mab O:3 beads [%]	Recovery[1] met SaR-Pab O:3 beads [%]
Y. ent. O:3	$1,8.10^5$	59,4	63,9
Ps. fluorescens	$1,4.10^5$	37,5	1,7
C. freundii	10^4-10^6 *	0,5	0,3
E. agglomerans	10^4-10^6 *	0,2	0,0
S. typhimurium	10^4-10^6 *	0,2	0,1

[1] enkelvoudige bepalingen op NA
* de referentie (het 100% monster) is niet uitgeplaat en voor de berekening van de recovery is de 100% op 10^6 kve/ml gesteld

Uit de resultaten blijkt dat de specificiteit van de SaR-Pab O:3 beads goed is. De recovery van andere bacteriestammen is minder dan 2%. In het geval van de SaM-Mab O:3 beads is de recovery van *Ps. fluorescens* relatief hoog. Het bleek hier om een niet specifieke binding te gaan, want in agglutinatie en IF-experimenten vond er geen reactie tussen deze bacterie en het pure Mab O:3 antiserum plaats. Zo'n hoge mate van aspecifieke binding is eerder in de literatuur beschreven voor beads met tegen *Salmonella livingstone* gerichte antilichamen. De recovery van *Aeromonas hydrophila* was afhankelijk van het incubatiemedium ca. 50% (Vermunt et al., 1991).

4.6 Invloed van gehakt op de recovery van *Y. enterocolitica O:3*

Om de invloed van monstermateriaal te testen is een 1 op 10 verdunning in PBS-caseïne gemaakt van een oplossing van 5 gram doorstraald varkensgehakt in 20 ml pfz. Hieraan is een reincultuur van *Y. enterocolitica O:3* toegevoegd. De recovery verminderde met de SaM-Mab O:3 beads van 59,4 naar 48,3% en met de SaR-Pab O:3 beads van 63,9 naar 55,0% (zie tabel 11).
Bij gebruik van 5 gram varkensgehakt met een natuurlijke begeleidingsflora is de recovery van de stoorflora 0,1% met de SaM-Mab O:3 beads en 1,3% met de SaR-Pab O:3 beads. Indien *Y. enterocolitica O:3* werd toegevoegd aan deze gehaktmonsters, bleek de recovery van *Y. enterocolitica O:3* 53,3% te zijn bij gebruik van de SaM-Mab O:3 beads en 70,0% bij gebruik van de SaR-Pab O:3 beads (zie tabel 11).
Indien het gehakt niet 1 op 10 werd verdund, maar in een concentratie van 5 gram in 20 ml PBS-

caseïne werd gebruikt, werden de recovery's bij gebruik van de SaM-Mab O:3 verlaagd van 96,4 naar 87,7% en bij gebruik van de SaR-Pab O:3 beads van 141,8 naar 93,0% (zie tabel 11).
Uit de resultaten blijkt dat de recovery enigszins wordt verlaagd door monstermateriaal en/of de begeleidingsflora en dat de recovery van *Y. enterocolitica O:3* bij gebruik van de SaM-Mab O:3 beads weinig verschilt met de recovery bij gebruik van de SaR-Pab O:3 beads. Het grootste en enige significante verschil tussen de beide soorten beads is dat de recovery van *Ps. fluorescens* bij gebruik van de SaM-Mab O:3 beads relatief erg hoog is. Daar het polyclonale antiserum in gebruik veel goedkoper is dan het monoclonale antiserum en van het polyclonale antiserum tegen de meeste serogroepen antisera beschikbaar zijn, is er voor gekozen om verder te werken met de SaR-Pab O:3 beads. Hierbij wordt, tenzij anders vermeld, telkens de aanbevolen procedure gevolgd.

Tabel 11. Recovery van *Y. enterocolitica O:3* in varkensgehaktmonsters met en zonder natuurlijke begeleidingsflora.

PBS-caseïne [ml]	Gehakt-suspensie [ml]	Flora [kve/ml]	Recovery[1] met SaM-Mab O:3 beads [%]	Recovery[1] met SaR-Pab O:3 beads [%]
1,0	-	$1,8.10^5$ *Y. ent. O:3*	59,4	63,9
0,9	0,1 [2] (steriel)	$1,8.10^5$ *Y. ent. O:3*	48,3	55,0
0,9	0,1 [2]	$3,2\ 10^5$ stoorflora	0,1	1,3
0,9	0,1 [2]	$1,8.10^5$ *Y. ent. O:3* $3,2.10^5$ stoorflora	53,3 0,3	70,0 0,2
1,0	-	$4,7.10^4$ *Y. ent. O:3*	96,4	141,8
-	1,0 [3]	$4,7.10^4$ *Y. ent. O:3*	87,7	93,0

[1] enkelvoudige bepalingen op NA
[2] 5 g varkensgehakt gestomacherd met 20 ml pfz
[3] 5 g varkensgehakt gestomacherd met 20 ml PBS-caseïne
(de SaM en de SaR beads zijn volgens de aanbevolen procedures gecoat)

Indien 5 gram varkensgehakt met een natuurlijke begeleidingsflora wordt gestomacherd met 20 ml CYIM/MTK en dit monster onverdund wordt toegevoegd aan de SaR-Pab O:3 beads, neemt de recovery van *Y. enterocolitica O:3* wel sterk af (zie tabel 12). Het medium waarin de incubatiestap plaatsvindt, heeft dus een grote invloed op de recovery. Indien PBS-caseïne werd gebruikt, nam de recovery immers nauwelijks af (zie tabel 11). Het is onwaarschijnlijk dat er afdoding van *Y. enterocolitica O:3* in het CYIM/MTK plaatsvindt en dus wordt de lagere recovery van *Y. enterocolitica O:3* in dit medium waarschijnlijk veroorzaakt door een minder goede binding van de *Y. enterocolitica O:3* cellen aan de SaR-Pab O:3 beads. In dit experiment is de recovery ook bepaald door het monster na de voorbehandeling met IMS een 0,5% loogbehandeling te geven en uit te

platen op CIN agar. De overleving van de referentie (het 100% monster) met OH-CIN was in dit experiment 77,0% voor *Y. enterocolitica O:3* en 1,2% voor de stoorflora.

Tabel 12. Recovery van *Y. enterocolitica O:3* in varkensgehaktmonsters met een natuurlijke begeleidingsflora met SaR-Pab O:3 beads en CYIM/MTK als incubatiemedium.

PBS-caseïne [ml]	Gehakt-suspensie[2] [ml]	Flora [kve/ml]	Recovery[1] op Na [%]	Recovery[1] op OH-CIN [%]
1,0	-	$1,2.10^5$ *Y. ent. O:3*	83,3	45,8
-	1,0	$1,2.10^5$ *Y. ent. O;3* 10^5-10^6 stoorflora*	35,0	37,0
1,0	-	$1,7.10^5$ *Y. ent. O:3*	87,6	53,3
-	1,0	$4,3.10^6$ stoorflora	0,6	0,0
-	1,0	$1,7.10^4$ *Y. ent. O:3* $4,3.10^6$ stoorflora	32,0 0,6	36,1 0,0

[1] enkelvoudige bepaling door uitplaten op deze agar
[2] 5 g varkensgehakt gestomacherd met 20 ml CYIM/MTK
* geschat kiemgetal

4.7 Invloed van de concentratie SaR-Pab O:3 beads op de recovery van *Y. enterocolitica O:3* en begeleidingsflora

In de praktijk zal IMS meestal worden gebruikt op een 10 maal verdund monster. Dat wil zeggen dat 10 gram vleesmonster wordt gestomacherd met 90 ml medium. In dit experiment worden 10 gram varkensgehakt en 10 gram met 25 kGy doorstraald varkensgehakt, dat daarna kunstmatig besmet is met *Y. enterocolitica O:3*, met 90 ml CYIM/MTK gestomacherd. De concentratie van de SaR-Pab O:3 beads is gevarieerd en de recovery van *Y. enterocolitica O:3* en de stoorflora is in enkelvoud op NA bepaald (zie tabel 13).
Uit de resultaten blijkt dat de recovery van *Y. enterocolitica O:3* sterk afneemt bij gebruik van minder beads. Dit was ook al uit eerdere experimenten gebleken. De verhouding *Y. enterocolitica O:3* : stoorflora wordt bij gebruik van minder beads ook niet gunstiger. Het is dus niet verstandig om in het kader van een kostenbesparing minder dan $1,0.10^7$ beads per ml te gaan gebruiken.

Tabel 13. Invloed van de concentratie SaR-Pab O:3 beads.

Concentratie beads [1/ml]	Recovery[1] [%] *Y. enterocolitica O:3*	Recovery[2] [%] stoorflora	Verhouding *Y. ent. O:3*: stoorflora
$1,0.10^7$	73	0,36	203 : 1
$5,0.10^6$	27	0,10	270 : 1
$1,0.10^6$	9	0,05	180 : 1
$1,0.10^5$	1	0,09	11 : 1

[1] $1,7.10^4$ *Y. enterocolitica O:3* kve per ml
[2] $1,4.10^4$ stoorflora kve per ml

4.8 Optimalisatie van de IMS-procedure voor gehaktmonsters

In de proeven met geconcentreerde gehaktsuspensies was het erg moeilijk om ervoor te zorgen dat de beads niet werden verwijderd met de wasbuffer. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door de vetdeeltjes uit het gehakt. De beads gleden bij het verwijderen van de wasbuffer van de wand van het Eppendorfvaatje af. Om het risico van een eventueel verlies van beads te voorkomen, is in dit experiment het monster vóór toevoegen aan de beads gefiltreerd over een 5 um filter. Om de invloed van de samenstelling van de wasbuffer op de recovery van de begeleidingsflora vast te stellen is na incubatie gewassen met 5 verschillende buffers. De resultaten van dit experiment zijn in tabel 14 vermeld.

Tabel 14. Invloed van een wasbuffer met detergens.

Wasbuffer[3]	Recovery[1] [%] *Y. enterocolitica O:3*	Recovery[2] [%] stoorflora
PSB-caseïne	59	2,1
+ 0,05% Tween 20	85	0,9
+ 0,05% Tween 80	65	1,0
+ 0,05% SDS	42	1,9
+ 0,05% Triton X-100	69	1,4

[1] $1,0.10^5$ kve *Y. enterocolitica O:3* per ml (10 g steriel varkensgehakt + 90 ml pfz) (recovery in enkelvoud op NA bepaald)
[2] kiemgetal: $8,6.10^4$ kve per ml (10 g varkensgehakt + 90 ml pfz) (recovery in enkelvoud op NA bepaald)
[3] 2, 3 en 4^{de} wasstap in buffer met detergens
(de monsters zijn over een 5 um filter gefiltreerd voordat ze aan de beads zijn toegevoegd en de overige omstandigheden zijn volgens de aanbevolen procedure)

Door het filtreren is het veel gemakkelijker om de beads te wassen. Zonder vleesdeeltjes is filtratie van het monster niet nodig. Met hoge concentraties varkensgehakt is het filtreren dus sterk aan te

bevelen. Verder blijkt dat het gebruik van een detergens in de wasbuffer de recovery's niet of nauwelijks beïnvloedt. Een wasbuffer met 0,05% Tween 20 heeft zeker geen nadelige invloed op de recovery van *Y. enterocolitica O:3*.

In een experiment waarin 10 gram varkensgehakt en 10 gram met 25 kGy doorstraald varkensgehakt, dat daarna kunstmatig besmet is met *Y. enterocolitica O:3*, worden gestomacherd met 90 ml pfz, zijn de recovery's van de begeleidingsflora en *Y. enterocolitica O:3* bepaald bij verschillende incubatietemperaturen en incubatietijden. De monsters zijn vóór toevoeging aan de beads gefiltreerd over een 5 um filter. De resultaten zijn vermeld in tabel 15.

Tabel 15. Invloed van de incubatietemperatuur en de incubatietijd van beads met bacteriën.

Incubatietemp. [°C]	Incubatietijd [min.]	Recovery[1] [%] *Y. ent. O:3*	Recovery[2] [%] stoorflora
0	60	40	0,1
25	60	60	0,3
25	60	64 [3]	0,2 [3]
25	20	93	0,1

[1] $9{,}1.10^4$ *Y. enterocolitica O:3* kve per ml
[2] $3{,}2.10^5$ stoorflora kve per ml
[3] 2de, 3de en 4de wasstap in PBS-caseïne buffer met 0,05% Tween 20
(de monsters zijn over een 5 um filter gefiltreerd voordat ze aan de beads zijn toegevoegd)

Uit de resultaten blijkt dat 20 minuten incuberen bij kamertemperatuur voldoende is om alle *Y. enterocolitica O:3* cellen aan de beads te binden en dat, zoals ook al uit de eerdere resultaten bleek, drie wasstappen met Tween 20 een relatief goede recovery geeft. Vandaar dat in een volgend experiment een procedure met een incubatietijd van 20 minuten bij kamertemperatuur en drie wasstappen met 0,05% Tween 20 is getest op twee kunstmatig besmette varkensgehakt-monsters (zie tabel 16).

Uit deze resultaten blijkt dat 20 minuten incubatie bij kamertemperatuur en 3 wasstappen met 0,05% Tween 20 goede recovery's geven en dat temidden van geconcentreerd varkensgehakt (0,1 g/ml) met een begeleidingsflora, de recovery van *Y. enterocolitica O:3* met SaR-Pab O:3 beads op deze wijze circa 50% bedraagt en de recovery van stoorflora minder dan 1% is. De zuiveringsfactor voor *Y. enterocolitica O:3* is dus 50-100 maal. Figuur 13 is een schematische weergave van de uiteindelijke procedure.

Tabel 16. Recovery's van *Y. enterocolitica O:3* in kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters na een incubatietijd van 20 minuten en drie wasstappen met 0,05% Tween 20.

Monster	Flora [kve/ml]	Recovery[1] [%]
Y. enterocolitica O:3	$1,1.10^5$ *Y. ent. O:3*	99,1 ± 6,7
varkensgehakt A[2]	$6,0.10^4$ stoorflora	0,4 ± 0,1
varkensgehakt B[2]	$5,2.10^4$ stoorflora	0,3 ± 0,0
Y. ent. O:3/ gehakt A	$1,1.10^5$ *Y. ent. O:3* $6,0.10^4$ stoorflora	44,3 ± 3,8 nb
Y. ent. O:3/ gehakt B	$1,1.10^5$ *Y. ent. O:3* $5,2.10^4$ stoorflora	50,0 ± 2,3 nb

[1] bepaald door twee verschillende monsters uit te platen op NA (n=2)
[2] 10 gram varkensgehakt gestomacherd met 90 ml pfz
nb= niet bepaald
2, 3 en 4de wasstap in PBS-caseïne buffer met 0,05% Tween 20
20 minuten incubatie bij kamertemperatuur

wassen:	was de SaR beads 3 maal met PBS-caseïne
↓	↓
coaten:	coat de SaR beads door toevoeging van 65 ug Pab O:3 per mg SaR beads in PBS-caseïne door deze oplossing gedurende 1 dag horizontaal te schudden bij kamertemperatuur
↓	↓
wassen:	was de met Pab O:3 gecoate SaR beads 5 maal met PBS-caseïne, zodat de niet gecoate Pab O:3 moleculen worden verwijderd
↓	↓
incuberen:	incubeer $1,0.10^7$ SaR-Pab O:3 beads met 1 ml monster in PBS-caseïne gedurende 20 minuten horizontaal schuddend bij kamertemperatuur
↓	↓
wassen:	was de monsters daarna 5 maal met buffer: 1ste en 5de wasstap met PBS-caseïne en de 2de, 3de en 4de wasstap met PBS-caseïne met 0,05% Tween 20

Figuur 13. Schematische weergave van de IMS-procedure met SaR beads.

Uit experimenten met SaR beads die gecoat zijn met een mengsel van Pab O:3 en Pab O:9 bleek dat het mogelijk was om de beads te coaten met beide soorten antilichamen (65 ug Pab O:3 en 65 ug Pab O:9 per mg SaR beads). De recovery was bij een gelijk aantal O:3 en O:9 cellen gelijk aan de recovery's van de reinculturen. Als echter een overmaat van één van de beide serotypen werd gebruikt, daalde de recovery van het serotype dat in een ondermaat aanwezig was.

4.9 Discussie

Uit experimenten met SaM-Mab O:3 beads is gebleken dat een beadsconcentratie van $1{,}0.10^7$ beads per ml hogere recovery's geeft dan $5{,}0.10^6$ beads per ml, dat PBS-caseïne hogere recovery's geeft dan PBS-BSA en dat het coaten en incuberen bij kamertemperatuur hogere recovery's geeft dan wanneer deze beide stappen worden uitgevoerd bij 8 of 10 ^{0}C. Ook is gebleken dat de wijze van mengen tijdens het coaten en incuberen een grote invloed had op de recovery. Beiden horizontaal schuddend gaven hogere recovery's dan beiden head over head mengend. De optimale coatconcentratie aan muis Mab O:3 was 50 ug per mg SaM beads.
Experimenten met SaR-Pab O:3 beads gaven vergelijkbare resultaten. De optimale coatconcentratie aan Pab O:3 was 65 ug per mg SaR beads.
Tosylactivated beads konden niet worden gecoat met het gebruikte Mab O:3, omdat het muis monoclonaal antiserum een overmaat aan BSA bevat. Tosylactivated beads die waren gecoat met het konijn polyclonaal antiserum (Pab O:3) gaven om nog onduidelijke redenen zeer lage recovery's van *Y. enterocolitica O:3*.
De specificiteit van de SaM-Mab O:3 en de SaR-Pab O:3 beads is met elkaar vergeleken. De recovery van de natuurlijke begeleidingsflora bij het gebruik van beide soorten beads was over het algemeen kleiner dan 1%. Het varkensgehakt en de begeleidingsflora verlaagden de recovery van *Y. enterocolitica O:3* slechts in een geringe mate. Omdat alleen bij het gebruik van de SaM-Mab O:3 beads de recovery van een reincultuur van *Pseudomonas fluorescens* erg hoog (37,5%) was, is verder onderzoek uitgevoerd met SaR-Pab O:3 beads. Bovendien is het polyclonale antiserum een factor 100 maal goedkoper in gebruik en zijn van het polyclonale antiserum tegen de meeste serogroepen antisera beschikbaar. Optimalisatie van de procedure liet zien dat een incubatietijd van 20 minuten voldoende was en dat een wasbuffer met 0,05% Tween 20 relatief goede recovery's gaf. In figuur 13 is de uiteindelijke procedure weergegeven.

5 ONDERZOEK VAN PRAKTIJKMONSTERS

5.1 Onderzoek van kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters met geleidbaarheidsmeting

5.1.1 Invloed van voorkweek, loogbehandeling en immunomagnetische scheiding op de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting

In twee afzonderlijke experimenten zijn verschillende varkensgehaktmonsters en kunstmatig met *Y. enterocolitica O:3* besmette varkensgehaktmonsters getest volgens het schema van figuur 14.

monsterbehandeling:	10 g varkensgehaktmonster + 90 ml ITC	
	↓	
	2 minuten stomacheren	→ Malthus[1]
		loog-Malthus[2]
	↓	
voorkweek:	22 uur voorkweek[5] bij 15 °C	→ Malthus[1]
		loog-Malthus[2]
		IMS-Malthus[3]
		IMS-loog-Malthus[4]

Figuur 14. Schematisch overzicht van het experiment met de kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters in de geleidbaarheidsmeting.

[1] Aan 3,0 ml CYIM/MTK is 0,2 ml monster toegevoegd.
[2] Voor een loogbehandeling is 0,5 ml monster bij 4,5 ml 0,5% loog gepipetteerd (zie par. 2.6), van het monster dat een loogbehandeling heeft ondergaan, wordt 0,2 ml in een Malthuscel met 3,0 ml CYIM/MTK gepipetteerd.
[3] Van de voorkweek is 1,0 ml met 1,0.10^7 SaR-Pab O:3 beads geïncubeerd volgens de aanbevolen procedure zoals die in par. 4.3 beschreven is. Van het IMS monster is 0,2 ml in een Malthuscel met 3,0 ml CYIM/MTK gebracht.
[4] Van het restant van het IMS monster ondergaat 0,5 ml een loogbehandeling (zie par. 2.6) en van het monster dat een loogbehandeling heeft ondergaan, wordt 0,2 ml in een Malthuscel met 3,0 ml CYIM/MTK gepipetteerd.
[5] De voorkweek wordt bij 15 °C met 80 rpm in de schudincubator van Gallenkamp geïncubeerd.
(alle monsters in de geleidbaarheidsmeting zijn in tweevoud en de incubatietemperatuur in de Malthus is 30 °C)

In tabel 17 zijn de resultaten vermeld. De gevoeligheid die is weergegeven in kve per g varkensgehakt, is de *Y. enterocolitica O:3* concentratie waarbij nog net een voor *Yersinia* karakteristieke curve ontstaat.

Tabel 17. Gevoeligheden van de diverse methoden in de geleidbaarheidsmeting.

Stoorflora [kve/g]	Methode	Gevoeligheid[1] *Y. ent. O:3* [kve/g]	Verhouding[1] stoorflora: *Y. ent. O:3*
$5,3.10^6$	Malthus	$>1,6.10^5$	<33 : 1
	loog-Malthus	$1,6.10^5$	33 : 1
	VK-Malthus	$8,8.10^4$	60 : 1
	VK-loog-Malthus	$1,6.10^5$	33 : 1
	VK-IMS-Malthus	$1,6.10^3$	3313 : 1
	VK-IMS-loog-Malthus	$>1,6.10^5$	<33 : 1
$3,3.10^7$	Malthus	$>1,5.10^5$	<220 : 1
	VK-Malthus	$8,3.10^4$	398 : 1
	VK-IMS-Malthus	$8,3.10^3$	3976 : 1
	VK-IMS-loog-Malthus	$1,5.10^4$	2200 : 1

[1] concentratie *Y. enterocolitica O:3* en bijbehorende verhouding waarbij nog net een karakteristieke *Yersinia* curve optreedt

Uit de resultaten blijkt dat voorkweek en voorkweek gevolgd door IMS de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting verbeteren. Uitgaande van een kiemgetal van 10^7 kve per gram varkensgehakt zijn circa 10^3-10^4 kve *Y. enterocolitica O:3* per gram varkensgehakt aantoonbaar. Loogbehandelingen geven in deze experimenten wisselende resultaten. In een volgend experiment is de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting vergeleken met de gevoeligheid van een klassieke plaatmethode.

5.1.2 Onderzoek van kunstmatig besmette varkensgehaktmonsters met een klassieke plaatmethode en de geleidbaarheidsmeting

Figuur 15 geeft een schematisch overzicht van het experiment. Vergeleken met het experiment in par. 5.1.1 is het varkensgehakt in de ITC voorkweek een factor 10 meer verdund. In tabel 18 zijn de resultaten van het experiment vermeld. Uit deze resultaten blijkt dat 2 dagen voorkweek in ITC gevolgd door geleidbaarheidsmeting gevoeliger is dan de in de figuur 15 beschreven klassieke plaatmethode. De gevoeligheid van de klassieke plaatmethode is circa 10^4 kve *Y. enterocolitica O:3* per g gehakt temidden van circa 10^6 kve stoorflora per g gehakt. De gevoeligheid in de geleidbaarheidsmeting na 2 dagen voorkweek in ITC is circa 10^3 kve *Y. enterocolitica O:3* per g gehakt en is dus een factor 10 lager dan de beschreven klassieke plaatmethode. De gevoeligheden van beide methoden zijn echter aan de hoge kant en zouden een factor 10-100 lager moeten zijn.

monsterbehandeling:	10 g varkensgehakt + 90 ml pfz	
	↓	
	2 minuten stomacheren	→ Malthus[1]
	↓	
	1,0 ml + 9,0 ml ITC	
	↓	
voorkweek:	2 dagen stilstaand bij 25 °C incuberen	→ Malthus[1]
	↓	
	0,5% loogbehandeling en uitplaten op CIN	
	↓	
	2 dagen bij 30 °C incuberen	
	↓	
	bevestiging van *Yersinia* verdachte kolonies	
	(De Boer et al. 1989)	

Figuur 15. Schematisch overzicht van het experiment met kunstmatig besmet varkensgehakt.

[1] In de geleidbaarheidsmeting wordt telkens 0,2 ml monster aan 3,0 ml CYIM/MTK toegevoegd. Alle monsters in de geleidbaarheidsmeting zijn in tweevoud en de incubatietemperatuur in de Malthus is 30 °C.

In eenzelfde experiment met 3 varkensgehaktmonsters was de gevoeligheid van deze klassieke plaatmethode $7{,}3.10^4$ kve *Y. enterocolitica O:3* per g gehakt temidden van 10^6-10^7 kve stoorflora per g gehakt. De gevoeligheid in de geleidbaarheidsmeting na 2 dagen voorkweek in ITC was in dit experiment gelijk aan de gevoeligheid van de beschreven klassieke plaatmethode. Kunstmatig besmette monsters kunnen zich anders gedragen dan van nature met *Y. enterocolitica* besmette monsters. In een volgend experiment zijn de gevoeligheden van beide methoden dan ook vergeleken door gebruik te maken van tonsillen. Van tonsillen is bekend dat deze in grote aantallen besmet zijn met pathogene *Y. enterocolitica* (De Boer, 1991).

Tabel 18. Gevoeligheden van de geleidbaarheidsmeting en een klassieke plaatmethode met kunstmatig besmet varkensgehakt.

Stoorflora [kve/g]	Methode	Gevoeligheid *Y. ent. O:3* [kve/g]	Verhouding stoorflora: *Y. ent. O:3*
$1,5.10^6$	plaatmethode	$8,1.10^3$	185 : 1
	Malthus	$4,6.10^4$ *	33 : 1 *
	VK-Malthus	$8,1.10^2$ *	1852 : 1 *
$2,9.10^6$	plaatmethode	$8,1.10^3$	358 : 1
	Malthus	$8,1.10^4$ *	36 : 1 *
	VK-Malthus	$8,1.10^1$ *	35802 : 1 *
$8,5.10^5$	plaatmethode	$8,1.10^4$	10 : 1
	Malthus	$4,6.10^4$ *	18 : 1 *
	VK-Malthus	$8,1.10^3$ *	105 : 1 *

* concentratie *Y. enterocolitica O:3* en bijbehorende verhouding waarbij nog net een karakteristieke *Yersinia* curve optreedt

5.2 Onderzoek van varkenstonsillen met een klassieke plaatmethode en de geleidbaarheidsmeting

Figuur 16 is een schematisch overzicht van het met de varkenstonsillen uitgevoerde experiment. Er zijn 22 varkenstonsillen getest. Deze zijn in tabel 20 als monster 1 tot en met 22 vermeld. Monster 23 is tonsil 20 en is kunstmatig besmet met $1,6.10^3$ kve *Y. enterocolitica O:3* per g tonsil. Monster 24 is tonsil 21 en is kunstmatig besmet met $1,6.10^4$ kve *Y. enterocolitica O:3* per g tonsil. Monster 25 is een reincultuur van *Y. enterocolitica O:3* en bevat dus geen monstermateriaal.
De stammen die na identificatie (De Boer et al., 1989) worden beschouwd te behoren tot het geslacht *Yersinia*, zijn daarna beoordeeld op agglutinatie met het Pab O:3 en het Pab O:9 antiserum. In tabel 19 zijn de resultaten vermeld.

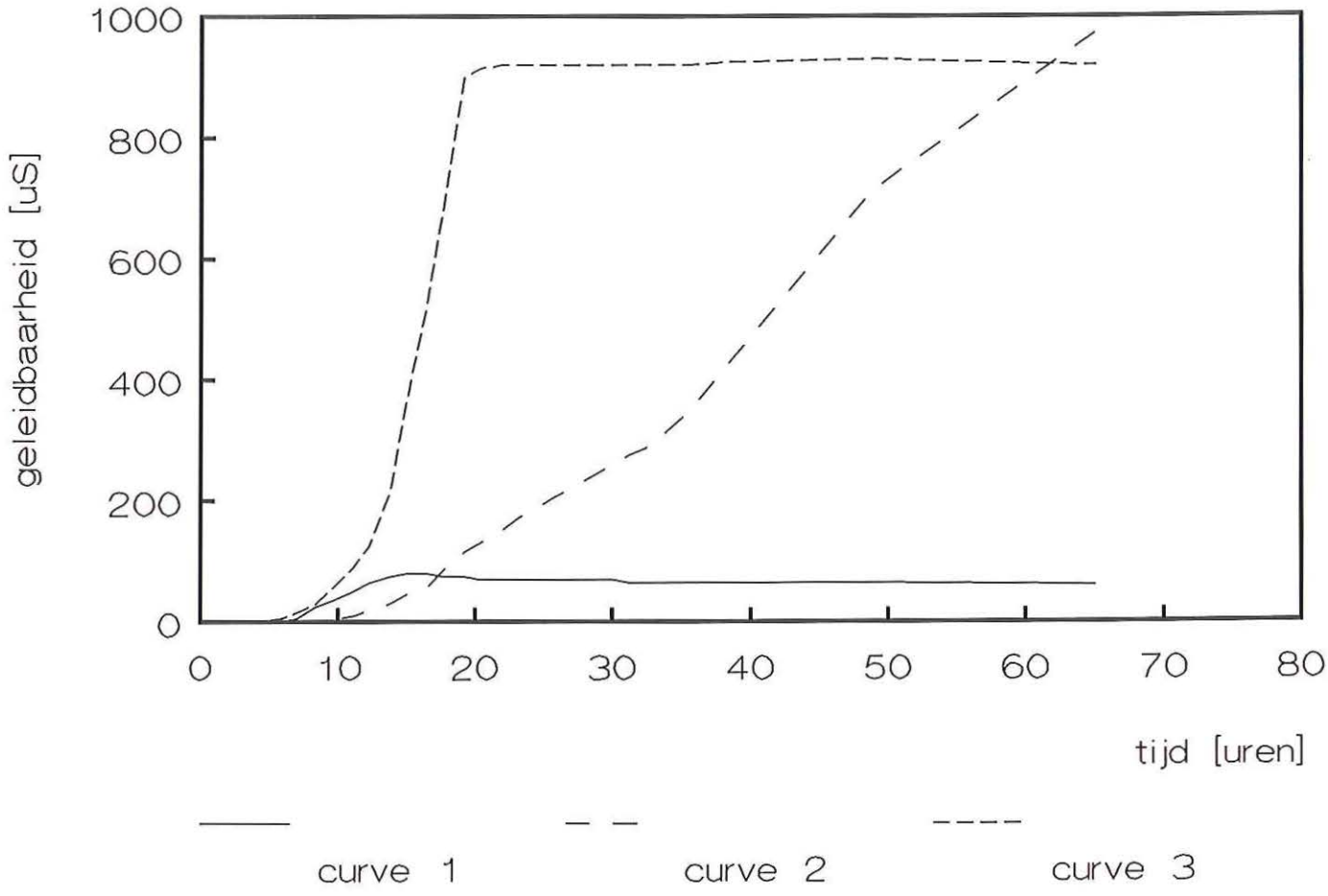
monsterbehandeling:	10 g varkenstonsil + 90 ml pfz	
	↓	
	2 minuten stomacheren	→ Malthus[1]
	↓	
	1,0 ml monster + 10,0 ml ITC	
	↓	
voorkweek:	2 dagen stilstaand bij 24 °C incuberen	→ Malthus[1]
	↓	
	0,5% loogbehandeling en uitplaten op CIN	
	↓	
	2 dagen bij 30 °C incuberen	
	↓	
	bevestiging van *Yersinia* verdachte kolonies	
	(De Boer et al. 1989)	

Figuur 16. Schematisch overzicht van het experiment met de varkenstonsillen.

[1] In de geleidbaarheidsmeting is 0,2 ml monster toegevoegd aan een Malthuscel met 3,0 ml CYIM/MTK. Alle monsters in de geleidbaarheidsmeting zijn in tweevoud en de incubatietemperatuur in de Malthus is 30 °C.

Uit de resultaten blijkt dat met deze klassieke plaatmethode uit 19 van de 22 tonsillen *Yersinia* stammen konden worden geïsoleerd. Deze *Yersinia* stammen behoorden allemaal tot de soort *Y. enterocolitica* en waren allemaal van het O:3 serotype. Uit de positieve controles, de twee kunstmatig besmette tonsillen (monsters 23 en 24) en de *Y. enterocolitica O:3* reincultuur (monster 25), zijn ook *Y. enterocolitica O:3* stammen geïsoleerd. Er is geen *Yersinia* stam geïsoleerd die met het Pab O:9 agglutineerde. Uit 3 van de 22 tonsillen (nl. monsters 5, 10 en 17) werd met de klassieke plaatmethode geen *Yersinia* geïsoleerd. Van de CIN-plaat van monster 5 is wel een kolonie met een grotere diameter (circa 0,6 cm) en een bobbelig oppervlak geïsoleerd. Deze stam is met een API 20 E als een *Pasteurella* geïdentificeerd. Deze *Pasteurella* is zeer nauw verwant met *Y. enterocolitica*. *Y. enterocolitica* werd voorheen *Pasteurella X* genoemd. De CIN-plaat van monster 10 bevatte geen kolonies en van de CIN-plaat van monster 17 is een kolonie geïsoleerd die minder rood en een iets grotere diameter (circa 0,4 cm) had dan een kolonie van *Y. enterocolitica O:3*. Met API 20 E is deze stam geïdentificeerd als *Pseudomonas cepacia*. De 19 monsters waaruit m.b.v. de klassieke plaatmethode isolatie van *Y. enterocolitica O:3* mogelijk was, gaven, na 2 dagen voorkweek in ITC, in de geleidbaarheidsmeting een karakteristieke *Yersinia* curve. De met de plaatmethode negatieve monsters 10 en 17 gaven in deze geleidbaarheidsmeting geen verdacht signaal. Het met de plaatmethode negatieve monster 5 gaf wel een verdacht signaal. Dit is natuurlijk niet verwonderlijk, daar uit dit monster de aan *Y. enterocolitica* verwante *Pasteurella* is geïsoleerd. Er is dus een zeer goede overeenkomst tussen de klassieke plaatmethode en de

geleidbaarheidsmeting na twee dagen voorkweek in ITC. Uit de Malthuscellen van de 19 met de geleidbaarheidsmeting positieve monsters is m.b.v. een loogbehandeling en uitplaten op CIN agar *Y. enterocolitica O:3* geïsoleerd. Hiermee is aangetoond dat de karakteristieke *Yersinia* curve in deze monsters het gevolg is van de aanwezigheid en groei van *Y. enterocolitica O:3* cellen. Geleidbaarheidsmeting van de 22 monsters zonder voorkweek gaf 1 *Yersinia* karakteristieke curve, 16 verdachte curven, 4 minder verdachte curven en 1 niet verdachte curve. In de geleidbaarheidsmeting worden verdachte signalen en *Yersinia* curven als positief beschouwd. Van de 16 verdachte curven waren monster 5 en 17 vals positief, waren van de 4 minder verdachte curven de monsters 6, 15 en 18 vals negatief en was de niet verdachte curve van monster 9 ook vals negatief. Geleidbaarheidsmeting zonder voorkweek gaf dus slechte resultaten. Figuur 17 laat het verschil tussen een niet verdachte, minder verdachte en een verdachte curve zien.



Figuur 17. Het onderscheid tussen een niet verdachte, minder verdachte en een verdachte curve.

curve 1= het niet verdachte signaal dat ontstaat in de geleidbaarheidsmeting na twee dagen voorkweek in ITC van tonsil 17
curve 2= het minder verdachte signaal dat ontstaat in de geleidbaarheidsmeting zonder voorkweek van tonsil 6
curve 3= het verdachte signaal dat ontstaat in de geleidbaarheidsmeting na twee dagen voorkweek in ITC van tonsil 2

Tabel 19. Het aantonen van *Yersinia* in varkenstonsillen.

Monster	Plaatmethode[1] 2 dagen ITC → loog-CIN		Malthus 2 dagen ITC → Malthus		
	Yersinia	*Y. ent. O:3* aggl. met Pab O:3	Helling [uS/uur]	Maximum [uS]	Signaal[2]
1	+	+	159	1069	+++
2	+	+	144	926	+++
3	+	+	157	1002	+++
4	+	+	140	884	+++
5	-	-	91	1048	++
6	+	+	137	1012	+++
7	+	+	163	1054	+++
8	+	+	139	978	+++
9	+	+	112	939	+++
10	geen kol.	n.v.t.	6*	149*	-
11	+	+	144	1003	+++
12	+	+	153	975	+++
13	+	+	161	985	+++
14	+	+	128	808	+++
15	+	+	165	1053	+++
16	+	+	159	1017	+++
17	-	-	12*	67*	-
18	+	+	132	991*	+++
19	+	+	150	973	+++
20	+	+	119	951	+++
21	+	+	161	990	+++
22	+	+	122	992*	+++
23	+	+	103	997	+++
24	+	+	166	1043	+++
25	+	+	134	1058	+++

* in enkelvoud bepaald
[1] + = positief; - = negatief en geen kol. = geen kolonies op de plaat
[2] maximale helling [uS/uur]:
- 0-20 = signaal - → signaal niet verdacht → monster negatief
- 20-50 = signaal + → signaal minder verdacht → monster negatief
- 50-100 = signaal ++ → signaal verdacht → monster positief
- >100 = signaal +++ als het maximum hoger is dan 800 [uS] → *Yersinia* curve → monster positief

5.3 Onderzoek van varkenstongen met de ISO-methode en de geleidbaarheidsmeting

Door de ISO wordt momenteel in een concept een kweekmethode voorgesteld voor de detectie van pathogene *Y. enterocolitica's* (ISO/DIS 10273). Dit ISO-concept is in dit experiment gebruikt als klassieke methode. Figuur 18 geeft een schematisch overzicht van het met de varkenstongen uitgevoerde experiment. Er zijn 17 tongen getest. Een reincultuur van *Y. enterocolitica O:3* is als positieve controle meegenomen. In dit experiment is een PSB voorkweek i.p.v. een voorkweek in ITC in de geleidbaarheidsmeting getest. Dit is gedaan om na te gaan of een kortere voorkweek mogelijk was. Voorkweek van 1 dag in ITC is waarschijnlijk te kort voor dit sterk selectieve medium. In tabel 20 zijn de resultaten vermeld.

monsterbehandeling:	10 g varkenstong + 40 ml pfz		
	↓		
	2 minuten stomacheren		→ Malthus[1]
	↓	↓	
voorkweek:	0,5 ml monster + 9,5 ml ITC	20 ml monster + 20 ml 2x geconcentreerd PSB	
	↓	↓	na 1 dag VK in PSB: → Malthus[1]
	↓	↓	IMS-Malthus[2]
	3 dagen stilstaand bij 25 °C incuberen	3 dagen schuddend bij 26 °C incuberen	
	↓	↓	
	uitplaten op SSDC	uitplaten op CIN en 0,25% loogbehandeling en uitplaten op CIN	

Figuur 18. Schematisch overzicht van het experiment met de varkenstongen.

[1] In de geleidbaarheidsmeting is 0,2 ml monster toegevoegd aan 3,0 ml CYIM/MTK.
[2] Van de voorkweek in PSB is 1,0 ml geïncubeerd met 1,0.10⁷ SaR-Pab O:3 beads volgens de procedure zoals die in par. 4.8 beschreven is.
(alle monsters in de geleidbaarheidsmeting zijn in tweevoud en de incubatietemperatuur in de Malthus is 30 °C)

Uit de resultaten blijkt dat met de ISO-procedure uit alle 17 varkenstongen *Yersinia* stammen konden worden geïsoleerd. Uit 10 van de 17 varkenstongen konden *Y. enterocolitica* stammen worden geïsoleerd en 2 van deze 10 *Y. enterocolitica* stammen waren pathogeen en bleken van het O:3 serotype te zijn. Uit de positieve controle werden ook pathogene *Y. enterocolitica O:3* stammen geïsoleerd. De meeste *Yersinia* en *Y. enterocolitica* stammen werden geïsoleerd met de PSB voorkweek gevolgd door een 0,25% loogbehandeling en uitstrijken op CIN agar. Met de ITC

voorkweek gevolgd door uitstrijken op SSDC agar werden uit slechts 3 varkenstongen *Yersinia* stammen geïsoleerd en de 2 positieve monsters gaven geen of geen verdachte kolonies op SSDC agar. De geleidbaarheidsmeting na 1 dag voorkweek in PSB geeft voor 3 varkenstongen een karakteristieke *Yersinia* curve, geeft voor 7 varkenstongen een verdachte curve en geeft voor 7 varkenstongen een minder verdachte curve. Met de geleidbaarheidsmeting na 1 dag voorkweek in PSB worden van de 17 monsters 8 monsters vals positief gevonden (monsters 1, 3, 4, 5, 6, 8, 15 en 16). Uit deze 8 vals positieve monsters werden met de ISO-procedure wel *Yersinia* stammen geïsoleerd, maar uit niet alle 8 de monsters konden *Y. enterocolitica* stammen worden geïsoleerd. Vals negatieve signalen worden niet gevonden. De twee varkenstongen waaruit m.b.v. de ISO-procedure pathogene *Y. enterocolitica O:3* stammen zijn geïsoleerd (monsters 2 en 14), geven in de geleidbaarheidsmeting immers een verdacht signaal.

Tabel 20. Het aantonen van *Yersinia* in varkenstongen.

Monster	ISO[1] 3 dagen ITC → SSDC		ISO[1] 3 dagen PSB → CIN en OH-CIN					Malthus 1 dag VK in PSB → Malthus		
	Yers.	*Y. ent.*	CIN *Yers.*	CIN *Y. ent.*	OH-CIN *Yers.*	OH-CIN *Y. ent.*	OH-CIN path. *Y. ent.*	Helling [uS/uur]	Maximum [uS]	Signaal[2]
1	g kol.	-	+	-	+	-		124	1108	+++
2	-	-	-	-	+	+	+	58	1223	++
3	+	-	-	-	+	+	-	109	1133	+++
4	g kol.	-	-	-	+	-	-	58	1205	++
5	+	-	-	-	-	-	-	75	1133	++
6	g kol.	-	-	-	+	+	-	55	1145	++
7	-	-	-	-	+	+	-	33	986	+
8	g kol.	-	-	-	+	-	-	57	1156	++
9	-	-	-	-	+	-	-	49	1185	+
10	-	-	-	-	+	+	-	40	931	+
11	g kol.	-	-	-	+	+	-	33[3]	1021[3]	+
12	-	-	-	-	+	+	-	43	1115	+
13	g kol.	-	-	-	+	+	-	40	1090	+
14	g kol.	-	-	-	+	+	+	53	1145	++
15	g kol.	-	-	-	+	+	-	52	1100	++
16	+	-	-	-	+	-	-	100	1155	+++
17	-	-	-	-	+	-	-	45	992	+
Y. ent. O:3	+	+	+	+	+	+	+	128[1]	1001[1]	+++

[1] + = positief en - = negatief
[2] maximale helling [uS/uur]:
- 0-20 = signaal - → niet verdacht → monster negatief
- 20-50 = signaal + → minder verdacht → monster negatief
- 50-100 = signaal ++ → verdacht → monster positief
- >100 = signaal +++ als het maximum hoger is dan 800 [uS] → *Yersinia* curve (zeer verdacht) → monster positief

[3] in enkelvoud bepaald

Het basismedium voor de fermentatie van L-rhamnose, sucrose en D-salicine, zoals dat door het ISO-concept wordt voorgeschreven, voldoet niet, omdat door omzetting van het pepton zuur gevormd wordt waardoor het medium ook van rood naar geel verkleurt en de reactie als vals positief beoordeeld wordt. Dit basismedium is vervangen door een ander basismedium (zie hoofdstuk 2).

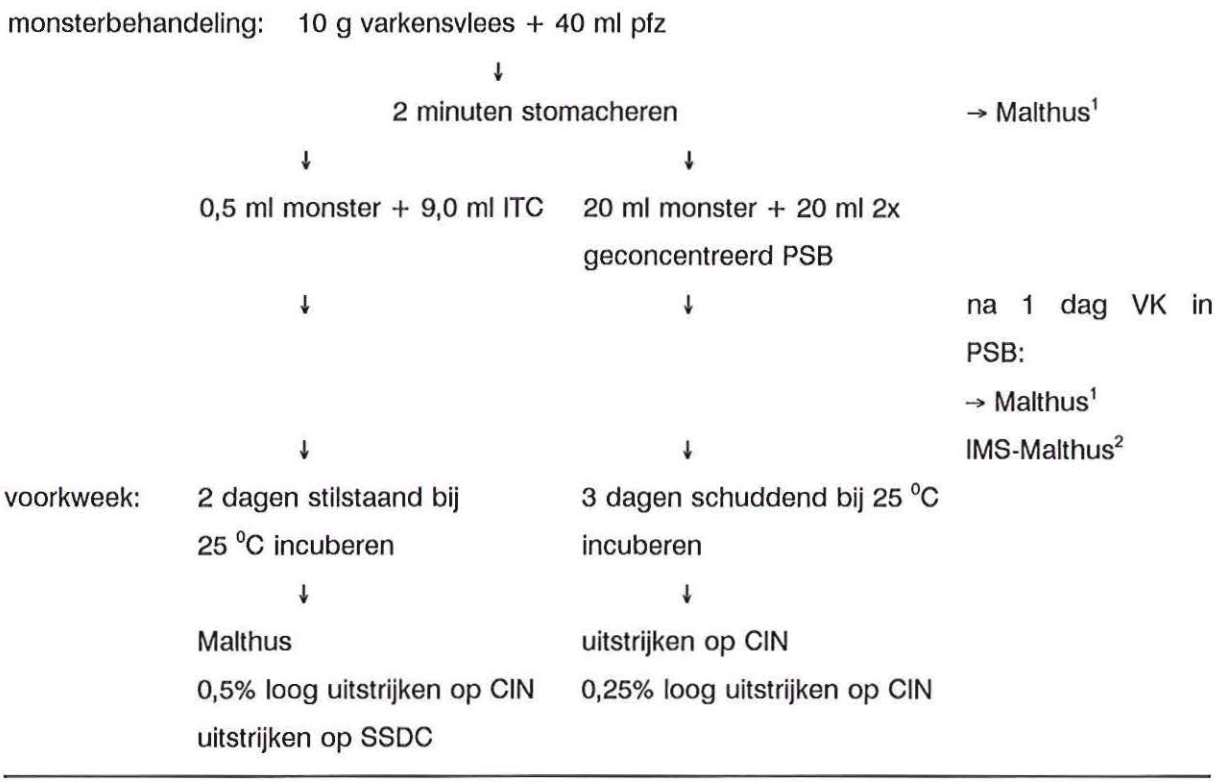
5.4 Onderzoek van varkensvlees met de ISO-methode en de geleidbaarheidsmeting

Daar de geleidbaarheidsmeting met de PSB voorkweek veel vals positieve signalen geeft en deze signalen in een aantal gevallen door andere *Yersinia* stammen dan de pathogene *Y. enterocolitica* stammen worden veroorzaakt, is in dit experiment een geleidbaarheidsmeting met een PSB voorkweek vergeleken met een geleidbaarheidsmeting met een voorkweek in ITC. Deze ITC voorkweek gaf in het experiment met de varkenstonsillen slechts 1 vals positief signaal en dat signaal werd waarschijnlijk veroorzaakt door een *Pasteurella species*. Het CYIM/MTK geeft verdachte signalen voor monsters die andere *Yersinia's* bevatten dan *Y. enterocolitica*. Het is dus interessant om te weten welke signalen ontstaan in de geleidbaarheidsmeting als de monsters geen *Yersinia* stammen bevatten en om die reden zijn in dit experiment varkensvleesmonsters getest. Varkensvleesmonsters zijn over het algemeen minder besmet met *Yersinia's*. Figuur 19 geeft een schematisch overzicht van het met varkensvleesmonsters uitgevoerde experiment. Er zijn 20 varkensvleesmonsters getest. Monster 21 is monster 10 en is kunstmatig besmet met *Y. enterocolitica O:3*, monster 22 is monster 20 en is kunstmatig besmet met *Y. enterocolitica O:3* en monster 23 is een reincultuur van *Y. enterocolitica O:3*. De IMS-procedure is uitgevoerd zoals in par. 4.8 beschreven is. In tabel 21 zijn de resultaten vermeld.
De uit de monsters 7, 10, 14 en 18 geïsoleerde *Y. enterocolitica* stammen zijn allemaal niet pathogeen en de uit de monsters 21 t/m 23 geïsoleerde *Y. enterocolitica* stammen zijn allemaal pathogeen en van het O:3 serotype. Uit de resultaten blijkt dat met de klassieke plaatmethode, zoals die beschreven is door De Boer et al. (1989), geen monster positief werd gevonden voor *Y. enterocolitica* en uit slechts 1 monster werd een *Yersinia* stam geïsoleerd. Met het ISO-concept werden 4 monsters positief gevonden voor *Y. enterocolitica* en uit 2 andere monsters werden nog *Yersinia* stammen geïsoleerd. Met geen van de beide methoden werden echter pathogene *Y. enterocolitica's* in de varkensvleesmonsters aangetoond. De *Yersinia* en de niet pathogene *Y. enterocolitica* stammen worden voornamelijk geïsoleerd op de OH-CIN-plaat na een voorkweek in PSB. De geleidbaarheidsmeting na 1 dag voorkweek in PSB geeft voor de 4 monsters waarin met de ISO-methode *Y. enterocolitica* werd aangetoond een verdacht signaal. Uit de Malthuscellen van deze monsters was isolatie van *Y. enterocolitica* mogelijk en dus wordt het signaal waarschijnlijk veroorzaakt door aanwezigheid en groei van deze *Y. enterocolitica* stammen. Deze geleidbaar-

heidsmethode geeft echter ook nog 6 andere vals positieve signalen, waarbij uit slechts één van deze 6 monsters een *Yersinia* stam is geïsoleerd (zie tabel 21 monster 17). De andere 5 vals positieve signalen zijn afkomstig van andere stammen (zie tabel 21 monsters 2, 9, 11, 16 en 19). Voorkweek van 2 dagen in ITC gevolgd door geleidbaarheidsmeting gaf alleen voor monster 10 een verdacht signaal. Uit de Malthuscel van dit monster werd een *Y. enterocolitica* stam geïsoleerd. Met een voorkweek van 2 dagen in ITC gevolgd door de geleidbaarheidsmeting werd dus slechts 1 monster vals positief gevonden.

Met een PCR, waarbij gebruik werd gemaakt van algemene 16S r-RNA primers voor *Yersinia*, werd een duidelijke band op de gel waargenomen bij de 4 monsters uit de Malthuscellen waarin *Y. enterocolitica* is aangetoond. Hiermee is de aanwezigheid van *Yersinia* bevestigd. Bevestiging van verdachte monsters uit de geleidbaarheidsmeting met PCR is dus in principe mogelijk.

Bevestiging met immunofluorescentie voor *Y. enterocolitica O:3* vanuit de Malthus van niet met *Y. enterocolitica O:3* besmette varkensvleesmonsters gaf veel vals positieve uitslagen. Verder onderzoek richt zich op het voorkomen van de aspecifieke binding van het antiserum en/of het FITC-conjugaat.



Figuur 19. Schematisch overzicht van het experiment met varkensvlees.

[1] In de geleidbaarheidsmeting is 0,2 ml monster toegevoegd aan een Malthuscel met 3,0 ml CYIM/MTK.
[2] De IMS-procedure is uitgevoerd zoals in par. 4.8 beschreven is. Van het monster is na IMS 0,2 ml toegevoegd aan een Malthuscel met 3,0 ml CYIM/MTK.
(alle monsters in de geleidbaarheidsmeting zijn in tweevoud en de incubatietemperatuur in de Malthus is 30 °C)

Tabel 21. Het aantonen van *Yersinia* in varkensvlees.

Monster	De Boer[1] 2 dgn ITC 0,5%OH→CIN		De Boer/ISO[1] 2 dgn ITC →SSDC		ISO[1] 3 dgn PSB →CIN		ISO[1] 3 dgn PSB 0,25%OH→CIN		Malthus 1 dag PSB→Malthus			Malthus 1 dag PSB→ Malthus→ 1 dag PSB→ 0,25%OH→CIN[1]		Malt. 2 dgn ITC→ Malt.	Malthus 2 dgn ITC→ Malthus→ CIN[1] en 0,25%OH→CIN[1]	
	Yers.	*Y. ent.*	*Yers.*	*Y. ent.*	*Yers.*	*Y. ent.*	*Yers.*	*Y. ent.*	Hell.[2]	Max. [uS]	Sign.[2]	*Yers.*	*Y. ent.*	Sign.[2]	*Yers.*	*Y. ent.*
1	-	-	-	-	-	-	-	-	45	1116	+	-	-	-	nb	nb
2	-	-	-	-	-	-	-	-	55	1268	++	-	-	-	nb	nb
3	-	-	-	-	-	-	-	-	12	120	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	30	991	+	-	-	-	nb	nb
5	-	-	-	-	-[3]	-	-	-	44	1082	+	-	-	-	nb	nb
6	-	-	-	-	-	-	-	-	10	188	-	-	-	-	nb	nb
7	-	-	-	-	-	-	+	+[3]	61	1158	++	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	39	1071	+	-	-	-	nb	nb
9	-	-	-	-	-[3]	-	-	-	63	1134	++	-	-	-	nb	nb
10	+	-	+	-	-[3]	-	+	+[3]	58	1178	++	+	+	+++	+	+
11	-	-	-	-	-[3]	-	-	-	82	1151	++	-	-	-	nb	nb
12	-	-	-	-	-	-	-	-	13	172	-	-	-	-	nb	nb
13	-	-	-	-	-	-	-	-	13	202	-	-	-	-	nb	nb
14	-	-	-	-	-	-	+	+[3]	55	1187	++	+	+	-	nb	nb
15	-	-	-	-	-	-	+	-	27	876	-	-	-	-	nb	nb
16	-	-	-	-	-	-	-	-	73	1187	++	-	-	-	nb	nb
17	-	-	-	-	-	-	+	-	89	1205	++	+	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	+	+[3]	85	1187	++	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-[3]	-	-	-	65	1130	++	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	15	205	-	-	-	-	nb	nb
21	+	+	+	+	nb	nb	+	+	190	1138	+++	+	+	+++	+	+
22	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	175	1079	+++	+	+	+++	nb	nb
23	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb	112	970	+++	+	+	+++	nb	nb

[1] + = positief; - = negatief en nb = niet bepaald
[2] maximale helling [uS/uur]:
- 0-20 = signaal - → niet verdacht
- 20-50 = signaal + → minder verdacht
- 50-100 = signaal ++ → verdacht
- > 100 = signaal +++ als het maximum hoger is dan 800 [uS] → *Yersinia* curve (zeer verdacht)

[3] de gevonden *Y. enterocolitica's* zijn niet pathogeen
monster 21 = monster 10 en kunstmatig met *Y. enterocolitica O:3* besmet
monster 22 = monster 20 en kunstmatig met *Y. enterocolitica O:3* besmet
monster 23 = een reïncultuur van *Y. enterocolitica O:3*

5.5 Discussie

Met de geleidbaarheidsmetingen na een voorkweek in ITC of PSB werden geen vals negatieve signalen waargenomen. Een voorkweek van 1 dag in PSB gaf zowel in het experiment met de varkenstongen als in het experiment met de varkensvleesmonsters een groot aantal vals positieve signalen (waarschijnlijk veroorzaakt door een *Pasteurella species*). Een voorkweek van 2 dagen in ITC gaf in het experiment met de varkenstonsillen 1 vals positief signaal en gaf ook in het experiment met de varkensvleesmonsters 1 vals positief signaal. Met een voorkweek van 2 dagen in ITC worden dus minder vals positieve signalen gevonden dan met een voorkweek van 1 dag in PSB. In het experiment met de varkenstonsillen is echter geen voorkweek in PSB uitgevoerd en aangezien 19 van de 22 monsters besmet waren met *Y. enterocolitica O:3* is het dus niet verwonderlijk dat er met de ITC voorkweek slechts 1 monster vals positief werd gevonden.

De resultaten van de geleidbaarheidsmetingen komen goed overeen met de resultaten van de klassieke plaatmethoden. Met een voorkweek van 2 dagen in ITC gevolgd door uitstrijken op OH-CIN en SSDC agar worden veel minder *Yersinia* en niet pathogene *Y. enterocolitica* stammen geïsoleerd dan met een voorkweek van 3 dagen in PSB gevolgd door uitstrijken op CIN en OH-CIN agar. Volgens De Boer et al. (1989) worden met een voorkweek in ITC voornamelijk pathogene *Y. enterocolitica's* van het O:3 serotype geïsoleerd en worden, vergeleken met een voorkweek in BOS of PBSSB, veel minder *Yersinia's* van de niet pathogene biogroep 1A geïsoleerd. In het experiment met de varkenstongen werden uit 2 van de 17 monsters pathogene *Y. enterocolitica O:3* stammen geïsoleerd. Deze beide pathogenen zijn echter geïsoleerd op een OH-CIN-plaat na een voorkweek in PSB. Op de overeenkomstige SSDC-platen na een voorkweek in ITC konden deze pathogenen niet geïsoleerd worden. Het is mogelijk dat de SSDC-plaat te selectief is en dat de beide pathogenen wel zouden zijn geïsoleerd indien de ITC voorkweek zou zijn afgestreken op OH-CIN agar. Op dit moment is een keuze voor één van de beide voorkweken dus niet mogelijk. Voor het screenen van vleesmonsters met de geleidbaarheidsmeting worden dan ook beide voorkweken aanbevolen.

Met een PCR-techniek waarbij gebruik werd gemaakt van algemene 16S r-RNA primers voor *Yersinia*, is gebleken dat bevestiging met PCR van verdachte monsters uit de geleidbaarheidsmeting in principe mogelijk is.

6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Bij een incubatietemperatuur in de Malthus van 25 ^{0}C ontstaat voor *Y. enterocolitica O:3* in het CYIM een karakteristieke *Yersinia* curve en varkensgehakt met een natuurlijke begeleidingsflora geeft een typische varkensgehaktcurve. De selectiviteit van het medium verbetert door toevoeging van 10 mg/l malachietgroen, 1 mg/l ticarcilline en 1 g/l kaliumchloraat. Met name de *Enterobacteriaceae* worden door deze MTK-toevoeging sterk in groei geremd. Een verdere verbetering van de selectiviteit treedt op door de incubatietemperatuur in de Malthus te verhogen van 25 naar 30 ^{0}C. Door deze temperatuurverhoging groeit *Y. enterocolitica* sneller en de groei van *Pseudomonaceae* wordt niet beïnvloed. In het nieuwe medium met de drie extra selectieve stoffen (MTK) en bij een incubatietemperatuur van 30 ^{0}C bleek, voor varkensgehaktmonsters waarin geen *Y. enterocolitica* aanwezig was, toch nog steeds een typische varkensgehaktcurve op te treden. Deze typische varkensgehaktcurve wordt waarschijnlijk veroorzaakt door meerdere urease-positieve stammen uit de natuurlijke begeleidingsflora en deze stammen hebben zowel ureum als varkensgehakt in het medium nodig om deze typische varkensgehaktcurve te geven. Door het varkensgehakt minimaal een factor 80 maal te verdunnen ($1{,}3.10^{-2}$ g/ml), werd de typische varkensgehaktcurve geëlimineerd. De curve bereikt dan een maximum van ca. 300 uS. Het verdunnen van het varkensgehaktmonster vermindert de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting. Dit verlies in gevoeligheid kan worden gecompenseerd door toepassing van een voorkweek.

Ook het toepassen van een loogbehandeling biedt perspectieven voor het verbeteren van de gevoeligheid van de geleidbaarheidsmeting, maar het gebruik van loogconcentraties van 0,5% of hoger is niet aan te bevelen daar *Y. enterocolitica O:3* dan voor meer dan 99% wordt afgedood. Ondanks dit hoge percentage afdoding werden met een 0,5% loogbehandeling uit 19 van de 22 varkenstonsillen *Y. enterocolitica O:3* stammen geïsoleerd. De varkenstonsillen waren waarschijnlijk in hoge mate besmet, waardoor de *Y. enterocolitica O:3* stammen ondanks een grote afdoding door de loogbehandeling toch nog op een CIN-plaat geïsoleerd konden worden.

Immunomagnetische scheiding met magnetische bolletjes die bezet waren met een secundair antiserum, gaven, bij het coaten van 50 ug Mab O:3/mg SaM beads en 65 ug Pab O:3/mg SaR beads, recovery's van reinculturen van *Y. enterocolitica O:3* van ca. 77%. Essentiële stappen in de procedure zijn: gebruik van $1{,}0.10^{7}$ beads per ml, gebruik van een PBS-caseïne buffer, een coat- en incubatietemperatuur van 25 ^{0}C en horizontaal schuddend coaten en incuberen. Andere microorganismen gaven recovery's van ca. 1%. Alleen bij het gebruik van de SaM-Mab O:3 beads was de recovery van een reincultuur van *Ps. fluorescens* erg hoog (37,5%). Het varkensgehakt en de begeleidingsflora verlaagden de recovery van *Y. enterocolitica O:3* slechts in geringe mate.

Daar de recovery van *Ps. fluorescens* met de SaR-Pab O:3 beads veel lager is dan met de SaM-Mab O:3 beads, het polyclonale antiserum een factor 100x goedkoper in gebruik is en van het polyclonale antiserum tegen de meeste serogroepen antisera beschikbaar zijn, is verder onder-

zoek uitgevoerd met de SaR-Pab O:3 beads. Optimalisatie van de procedure liet zien dat een incubatietijd van 20 minuten voldoende was en dat een wasbuffer met 0,05% Tween 20 relatief goede recovery's gaf.

Het onderzoek met praktijkmonsters van varkensgehakt, varkenstonsillen, varkenstongen en varkensvlees liet zien dat de resultaten van de geleidbaarheidsmeting goed overeenkomen met de resultaten van de klassieke plaatmethoden. Na een voorkweek in PSB of ITC werden met de geleidbaarheidsmeting geen vals negatieve signalen waargenomen. Voorkweek van 1 dag in PSB gaf echter wel een groot aantal vals positieve signalen. In een experiment met 20 varkensvlees-monsters gaf voorkweek van 2 dagen in ITC 1 vals positief signaal en voorkweek van 1 dag in PSB gaf 10 vals positieve signalen. Aangezien niet één van de 20 varkensvleesmonsters besmet was met pathogene *Y. enterocolitica's*, afgaand op de resultaten van de klassieke methode, kan er geen uitspraak gedaan worden over het voorkomen van vals negatieve signalen. Met de klassieke methode werden, in het experiment met de varkenstongen, met de voorkweek van 3 dagen in ITC gevolgd door uitstrijken op OH-CIN en SSDC agar veel minder *Yersinia* en niet pathogene *Y. enterocolitica* stammen geïsoleerd dan met een voorkweek van 3 dagen in PSB gevolgd door uitstrijken op CIN en OH-CIN agar. Volgens de Boer et al. (1989) worden met een voorkweek in ITC voornamelijk pathogene *Y. enterocolitica's* van het O:3 serotype geïsoleerd en worden, vergeleken met een voorkweek in BOS of PBSSB, veel minder *Yersinia's* van de niet pathogene biogroep 1A geïsoleerd.

Met de door de ISO voorgestelde plaatmethode werden twee varkenstongen die besmet waren met pathogene *Y. enterocolitica O:3*, na een voorkweek van 3 dagen in ITC gevolgd door uitstrijken op SSDC, negatief beoordeeld. Deze beide monsters werden wel positief gevonden na 3 dagen voorkweek in PSB gevolgd door een afstrijk op OH-CIN. Het is mogelijk dat de SSDC-plaat te selectief is en dat de beide pathogenen wel zouden zijn geïsoleerd indien de ITC voorkweek zou zijn afgestreken op OH-CIN agar. Op grond van deze resultaten is op dit moment nog geen keuze voor één van de beide voorkweken mogelijk. Voor het screenen van vleesmonsters met de geleidbaarheidsmeting worden dan ook beide voorkweken aanbevolen.

Met een PCR, waarbij gebruik werd gemaakt van algemene 16S r-RNA primers voor *Yersinia*, werd een duidelijke band op de gel waargenomen bij de 4 varkensvleesmonsters uit de Malthuscellen waarin *Y. enterocolitica* werd aangetoond en die in de geleidbaarheidsmeting een verdacht signaal gaven. Bevestiging van verdachte monsters uit de geleidbaarheidsmeting met PCR is dus mogelijk.

Verder onderzoek met grote aantallen praktijkmonsters (zowel onbesmette als hoog en laag met pathogene *Y. enterocolitica* besmette monsters) waarin de voorkweken in PSB en ITC met elkaar vergeleken worden, kan uitwijzen of een keuze voor één van de beide voorkweken mogelijk is of dat beide gehanteerd dienen te worden. Ook kan met de urease-positieve stammen die uit de varkensvleesmonsters zijn geïsoleerd (zie tabel 21 op blz. 56), onderzocht worden of een verdere

verbetering van de selectiviteit van het CYIM/MTK mogelijk is. Hiertoe kunnen opnieuw een aantal selectieve stoffen getest worden die *Y. enterocolitica O:3* niet in groei remmen (zie tabel 4 op blz. 23). Een andere selectieve stof die getest kan worden, is $CaCl_2$. Volgens Toora et al. (1994) bevordert 0,01% $CaCl_2$ de groei van *Y. enterocolitica*. Indien er een selectieve stof gevonden wordt die de groei van pathogene *Y. enterocolitica's* bevordert of andere bacteriën en niet pathogene *Y. enterocolitica's* remt, kan die stof eventueel ook in een nieuw te ontwikkelen voorkweekmedium gebruikt worden.

Met immunomagnetische scheiding kunnen SaR beads gecoat worden met een mix van het Pab O:3 en Pab O:9 antiserum en met deze beads kunnen praktijkmonsters onderzocht worden op de aanwezigheid van de in Europa meest voorkomende pathogene serotypen. In verder onderzoek zal de thans ontwikkelde IMS-procedure worden toegepast als voorbehandelingstechniek voor de geleidbaarheidsmeting en de PCR-techniek. Voor deze PCR-detectie en voor de PCR-bevestiging van de in de geleidbaarheidsmeting verdachte monsters, zullen op specifieke DNA-fragmenten van zowel pathogene als niet pathogene serotypen van *Y. enterocolitica* primers gekozen worden en zal de bijbehorende probe voor bevestiging worden gesynthetiseerd. Behalve de PCR-techniek zal voor de bevestiging van de aanwezigheid van pathogene *Y. enterocolitica* in verdachte monsters uit de geleidbaarheidsmeting ook de immunofluorescentie-techniek worden geoptimaliseerd.

Het onderzoek dient afgerond te worden met een implementatie van de ontwikkelde methoden.

LITERATUURLIJST

Boer de, E..
Pathogenen in de voedselketen.
PostAcademisch Onderwijs Natuurwetenschappen (1988).

Boer de, E., J.F.M. Nouws, E. Nijland en A.H.J.W. Smulders.
Varkens(vlees) als bron van pathogene *Yersinia enterocolitica*.
Diergeneeskd., deel 116, afl. 6 (1991).

Boer de, E., W.M. Seldam en E. Nijland.
Isolatie en identificatie van *Yersinia enterocolitica* en verwante soorten uit voedingsmiddelen.
De Ware(n)-Chemicus, 19, blz. 227-245 (1989).

Christensen, S.V..
The *Yersinia enterocolitica* situation in Denmark.
Contr. Microbiol. Immunol., 9, p. 93-97 (1987).

Eden, R. and G. Eden.
Impedance Microbiology.
Research Studies Press LTD. John Wiley & Sons Inc., New York, p. 170 (1984).

ISO/DIS 10273
General guidance for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

Kapparud, G., T. Vardund, E. Skjeve, E. Hornes and T.E. Michaelsen.
Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reaction and colorimetric detection of amplified DNA.
Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, no. 9, p. 2938-2944 (1993).

Knecht en Doornbos.
Bacteriologie voor Laboratorium en Kliniek 2.
Heron reeks, tweede herziene druk (1991).

Lund, A., A.L. Hellemann and F. Vartdal.
Rapid isolation of K88$^+$ *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles.
Journal of Clinical Microbiology, 56, p. 3478-3481 (1988).

Nesbakken, T..
Enumeration of *Yersinia enterocolitica O:3* from the porcine oral cavity, and its occurence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse.
Int. Journal Food Microbiol., 6, p. 287-293 (1988).

Tauxe, R.V., G. Wauters, B. Goossens, R. van Noyen, J. Vandepitte, S.M. Martin. P. DeMol and G. Thiers.
Yersinia enterocolitica infections and pork: The missing link.
Lancet, p. 1129-1132 (1987).

Toora, S., E. Bundu-Amoako, R.F. Ablett and J. Smith.
Evaluation of different antimicrobial agents used as selective supplements for isolation and recovery of *Yersinia enterocolitica*.
Journal of Applied Bacteriology, 77, p. 67-72 (1994).

Vermunt, A.E.M., A.A.J.M. Franken and R.R. Beumer.
Isolation of *Salmonellas* by immunomagnetic separation.
Journal of Applied Bacteriology, 72, p. 112-118 (1992).

Walker, S.J..
Development of an impedimetric medium for the detection of *Yersinia enterocolitica* in pasteurized milk.
Proceedings International Seminar in Santander, Spain, p. 289 (1989).

Wauters, G., K. Kandola and M. Janssens.
Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*.
Contr. Microbiol. Immunol., 9, p. 14-21 (1987).

Wauters, G., V. Goossens, M. Janssens and J. Vandepitte.
New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork.
Applied and Environmental Microbiology, 54, p. 851-854 (1988).

BIJLAGE I SAMENSTELLING VAN DE MICROBIOLOGISCHE MEDIA

A Kant en klare media

Voor de bereiding zijn de instructies van de fabrikant gevolgd.

Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine agar (CIN)

Yersinia Selective Agar Base (Oxoid CM653) + Yersinia Antibiotic Supplement (Oxoid SR109E)

Violet Red Bile Glucose agar (VRBG)

Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid CM485)

MacCONKEY agar

MacCONKEY Agar No.3 (Oxoid CM115)

Cetrimide-Fucidine-Cephaloridine agar (CFC)

Pseudomonas Agar Base (Oxoid CM559) + Pseudomonas C-F-C Selective Supplement (Oxoid SR103E)

Nutriënt Agar (NA)

Nutriënt Agar (Difco)

B Zelf bereide media

Campden Yersinia Impedimetric Medium (CYIM)

Samenstelling basismedium:

bacteriological pepton (Oxoid L37)	20,0 g
D-mannitol	20,0 g
natriumchloride	1,0 g
gedestilleerd water	1000 ml

Los de ingrediënten op in het water. Stel de pH op 8,0 en steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C. Laat het medium hierna afkoelen tot 50 ^{0}C.

Yersinia Antibiotic Supplement (Oxoid SR109E):

cefsulodine	7,5 mg
irgasan	2,0 mg
novobiocine	1,25 mg

Los de ingrediënten aseptisch op in 2 ml ethanol en 3 ml steriel gedestilleerd water.

Samenstelling compleet CYIM:

basismedium	1000 ml
Yersinia Antibiotic Supplement (YAS)	10 ml
40 % steriele ureum-oplossing (Oxoid SR020K)	4 ml

Voeg het YAS en de ureum-oplossing aseptisch toe aan het tot 50 ^{0}C afgekoelde basismedium en meng zorgvuldig.

Campden Yersinia Impedimetric Medium met MTK-toevoeging (CYIM/MTK)

Samenstelling basismedium:

bacteriological pepton (Oxoid L37)	20,0 g
D-mannitol	20,0 g
natriumchloride	1,0 g
kaliumchloraat ($KClO_3$)	1,0 g
malachietgroen (Merck)	10,0 mg
gedestilleerd water	1000 ml

Los de ingrediënten op in het water. Stel de pH op 8,0 en steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C. Laat het medium hierna afkoelen tot 50 ^{0}C.

Yersinia Antibiotic Supplement (Oxoid SR109E):

cefsulodine	7,5 mg
irgasan	2,0 mg
novobiocine	1,25 mg

Los de ingrediënten aseptisch op in 2 ml ethanol en 3 ml steriel gedestilleerd water.

Ticarcilline-oplossing:

ticarcilline (Sigma)	10,0 mg
gedestilleerd water	10,0 ml

Los de ticarcilline op in het gedestilleerde water en steriliseer door filtratie.

Samenstelling compleet CYIM/MTK:

basismedium	1000 ml
Yersinia Antibiotic Supplement (YAS)	10 ml
40% steriele ureum-oplossing (SR020K)	4 ml
ticarcilline-oplossing	1 ml

Voeg het YAS, de ureum- en de ticarcilline-oplossing aseptisch toe aan het tot 50 ^{0}C afgekoelde basismedium en meng zorgvuldig.

ITC voorkweekmedium

Samenstelling basismedium:

trypton (Difco)	10,0 g
gistextract (Difco)	1,0 g
natriumchloride	5,0 g
magnesiumchloride ($MgCl_2.6H_2O$)	60,0 g
kaliumchloraat ($KClO_3$)	1,0 g
malachietgroen (Merck)	10,0 mg
gedestilleerd water	1000 ml

Los de ingrediënten op in het water en steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C. Laat het medium hierna afkoelen tot 50 ^{0}C.

Irgasan-oplossing:

irgasan (DP 300 Ciba-Geigy)	10,0 mg
ethanol	10,0 ml

Los de irgasan op in de ethanol.

Ticarcilline-oplossing:

ticarcilline (Sigma)	10,0 mg
gedestilleerd water	10,0 ml

Los de ticarcilline op in het gedestilleerde water en steriliseer door filtratie.

Samenstelling compleet ITC:

basismedium	1000 ml
irgasan-oplossing	1 ml
ticarcilline-oplossing	1 ml

Voeg de irgasan- en de ticarcilline-oplossing aseptisch toe aan het tot 50 ^{0}C afgekoelde basismedium en meng zorgvuldig.

Het BOS voorkweekmedium

Zie De Boer et al. (1989) voor de beschrijving en bereiding van dit medium.

Minimaal Medium (MM)

Samenstelling:

ammoniumdi-waterstoffosfaat ($NH_4H_2PO_4$)	1,0 g
magnesiumsulfaat ($MgSO_4.7H_2O$)	0,2 g
kaliumchloride (KCl)	0,2 g
natriumchloride (NaCl)	1,5 g
gedestilleerd water	1000 ml

Los de ingrediënten op in het water en stel de pH op 8,0. Steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C.

BIJLAGE II SAMENSTELLING VAN DE BUFFERS

10 mM PBS buffer pH=7,5 met 0,1% BSA (PBS-BSA)

Bereiding van 0,1 M fosfaatbuffer pH=7,5:

Oplossing A:

di-natriumwaterstoffosfaat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	17,8 g
gedestilleerd water	1000 ml

Los het zout in het water op.

Oplossing B:

natriumdi-waterstoffosfaat ($NaH_2PO_4.H_2O$)	13,8 g
gedestilleerd water	1000 ml

Los het zout in het water op.

Voeg beide oplossingen (A en B) in zodanige hoeveelheden bij elkaar, zodat de pH 7,5 wordt.

Samenstelling PBS-BSA buffer:

BSA (Albumin, Bovine Fraction V van Sigma)	0,25 g
natriumchloride	2,19 g
0,1 M fosfaatbuffer pH=7,5	25 ml
gedestilleerd water	225 ml

Los de NaCl en de BSA op in de 10 mM fosfaatbuffer pH=7,5. Controleer de pH en steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C.

10 mM PBS buffer pH=7,5 met 0,1% caseïne (PBS-caseïne)

Samenstelling PBS-caseïne buffer:

caseïne (nach Hammarsten van Merck)	0,25 g
natriumchloride	2,19 g
0,1 M fosfaatbuffer pH=7,5	25 ml
gedestilleerd water	225 ml

Los de NaCl en de caseïne op in de 10 mM fosfaatbuffer pH=7,5. Controleer de pH en steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C.

50 mM boraatbuffer pH=9,5

Samenstelling:

boorzuur (H_3BO_3)	1,55 g
gedestilleerd water	500 ml

Los het boorzuur op in het water en stel de pH op 9,5. Steriliseer gedurende 15 min. bij 121 ^{0}C.