

Project 505.0030

Ontwikkeling van microbiologische onderzoeksmethoden voor diverse landbouw- en visserijproducten.

Rapport 91.49

Oktober 1991

Vergelijking tussen het tetrathionaatmedium volgens Müller-Kauffmann en Rappaport-Vassiliadis ophopingsmedium voor de isolatie van *Salmonella*

A.A.M. Peters-Groenen

ir. A.E.M. Vermunt

afdeling: Microbiologie

Medewerkers: medewerkers afdeling microbiologie

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

afdelingshoofden onderzoekafdelingen

afdeling Microbiologie (6x)

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

circulatie

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Wetenschap en Technologie

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 METHODE EN MATERIAAL	6
2.1 <i>Salmonella</i> isolatie methoden	6
2.2 Selectieve ophopingsmedia	7
2.2.1 Tetrathionaat medium volgens Müller-Kauffmann (MK)	7
2.2.2 Rappaport-Vassiliadis ophopingsmedium (RV)	7
2.2.3 Seleniet-cysteïne medium (SC)	7
2.3 Monstermateriaal	7
2.4 Statistische analyse	8
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	8
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	10
5 LITERATUUR	10
BIJLAGEN	
1 Tabellen 2 tot en met 5	

{ 1

{ 1

SAMENVATTING

In dit onderzoek zijn 2 verschillende selectieve ophopingsmedia voor de isolatie van *Salmonella* met elkaar vergeleken; tetrathionaat volgens Müller-Kauffmann (MK) en Rappaport-Vassiliadis malachietgroen magnesiumchloride bouillon (RV).

Het MK-medium is opgenomen in ISO-voorschriften zoals ISO 6785 (1), terwijl het RV-medium sinds 1 juni 1990 in ISO 6579 (2) is opgenomen. In ISO 6579 was in een eerdere editie ook Müller-Kauffmann als selectief ophopingsmedium opgenomen.

In totaal zijn 1579 produkten onderzocht, bestaande uit 94 kipprodukten, 249 visprodukten, 82 diervoeders, 1144 melkpoeders, en 10 diverse monsters. Van deze produkten kregen 82 monsters de eindbeoordeling "*Salmonella* positief in 25 gram".

Indien wordt gekeken naar de verschillende bovengenoemde produktgroepen dan kan geconcludeerd worden dat bij onderzoek van de "processed foods" (diervoeders en melkpoeders) MK als selectief ophopingsmedium betere resultaten lijkt op te leveren, terwijl bij rauwe produkten (vis- en kipprodukten) juist RV betere resultaten lijkt op te leveren.

()

()

1 INLEIDING

Salmonella is een gramnegatief micro-organisme, dat door middel van aanwezigheid in een voedselprodukt bij consumptie, na innesteling in het darmkanaal ziekte kan veroorzaken. Dit pathogene karakter van *Salmonella* bacteriën maakt het noodzakelijk om voedselprodukten op aanwezigheid van *Salmonellae* te controleren.

Het *Salmonella* onderzoek bestaat uit 4 basisstappen:

1. Voorophoping

Het te onderzoeken produkt wordt in een verrijkt niet-selectief medium gebracht om eventueel aanwezige, beschadigde *Salmonella* cellen in een optimale conditie te brengen. Tevens vindt er vermeerdering van de aanwezige micro-organismen plaats.

2. Selectieve ophoping

De aanwezige micro-organismen worden verder vermeerderd, echter door de aanwezigheid van groeiremmende stoffen zal het aantal niet-*Salmonella* bacteriën afnemen, terwijl het aantal eventueel aanwezige *Salmonella* bacteriën toeneemt.

3. Selectieve isolatie

Door de aanwezigheid van groeiremmende stoffen in dit vaste voedingsmedium worden niet-*Salmonellae* geremd, terwijl kolonies van *Salmonella* bacteriën een karakteristiek uiterlijk vertonen.

4. Biochemische en serologische bevestiging

Vermoedelijk positieve kolonies van *Salmonellae* worden bevestigd door middel van een biochemische reeks en door middel van een serologische techniek: agglutinatiereactie met behulp van specifiek anti-*Salmonella* O-serum.

De nadruk in dit onderzoek ligt voornamelijk op de isolatie van *Salmonellae*; hierbij dient de aanwezige begeleidende flora in het produkt zo weinig mogelijk storing tijdens de analyse te geven. Om dit effect te bereiken is de bovengenoemde 2e basisstap van het onderzoek, de selectieve ophoping, van groot belang. Er zijn verschillende selectieve ophopingsmedia, die door de aanwezigheid van remstoffen de groei van begeleidende flora zoveel mogelijk afremmen. Selectieve ophopingsmedia, die thans veel worden gebruikt zijn:

tetrathionaatbouillon volgens Müller-Kauffmann (genoemd in ISO 6785 (1)) en

Rappaport-Vassiliadis malachietgroen magnesiumchloride bouillon (genoemd in ISO 6579 (2)).

Voor calciumcaseïnaat- en ondermelkpoeder vonden Northolt e.a. (3) dat de resultaten van een MK-medium dat in het laboratorium uit de ingrediënten werd bereid, overeenkwamen met de

resultaten van het RV-medium. Overigens bleek dat ook in dit laboratorium de resultaten van het in het laboratorium uit de ingrediënten bereide MK-medium beter waren dan de resultaten van commercieel verkrijgbare gedroogde preparaten.

Uit onderzoek van Bolder (4) bleek dat voor kippehuid en eiprodukten het RV-medium het hoogste aantal *Salmonella* isolaties gaf.

Het tetrathionaatmedium bevat een combinatie van 3 remstoffen namelijk gal, briljantgroen en natriumtetrathionaat. De eerste 2 ingrediënten remmen grampositieve bacteriën (5,6). Tevens zijn coli-achtigen gevoeliger voor briljantgroen dan *Salmonellae*. Tetrathionaat werkt selectief tegen andere darmbacteriën dan *Salmonella*. Het Rappaport-Vassiliadismedium bevat magnesiumchloride en malachietgroen, welke tezamen de groei van de normale gramnegatieve flora remmen. De meeste *Salmonella*, behalve *Salmonella typhi*, kunnen ongehinderd groeien.

Een ander belangrijk verschil tussen de beide media is de verhouding tussen de hoeveelheid voorophopingsmedium en de hoeveelheid selectief ophopingsmedium. Bij het tetrathionaatmedium volgens Müller-Kauffmann dient aan 100 ml van het medium 10 ml van het geïncubeerde voorophopingsmedium toegevoegd te worden, terwijl bij het gebruik van het Rappaport-Vassiliadismedium aan 10 ml van dit medium 0,1 ml van het geïncubeerde voorophopingsmedium wordt toegevoegd.

Een derde verschil tussen beide media is de zuurgraad van het medium. De begin-pH van het RV-medium is $5,5 \pm 0,1$, terwijl de begin-pH van het MK-medium $7,0 \pm 0,1$ bedraagt. Aan het MK-medium wordt voor neutralisatie van overmatige zuurproductie calciumcarbonaat toegevoegd. Doelstelling van dit onderzoek is na te gaan wat het verschil is in het aantal positieve *Salmonella* isolaties tussen beide bovengenoemde selectieve ophopingsmedia.

Het onderzoek is uitgevoerd in alle monsters, die in de periode van 13-06-1988 tot en met 31-08-1990 routinematig op aanwezigheid van *Salmonellae* op het RIKILT zijn onderzocht. Het betreft 5 categorieën monsters namelijk kipprodukten, visprodukten, diervoeders, melkpoeders en diverse monsters, waartoe alle monsters, niet tot de eerste vier categorieën behorend, in ondergebracht werden.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 *Salmonella* isolatie methoden

Tijdens de periode van 13-06-1988 tot en met 30-04-1989 is de *Salmonella* isolatie uitgevoerd conform intern analysevoorschrift A46 (7).

Vanaf 01-05-1989 is de *Salmonella* isolatie uitgevoerd zoals beschreven in RSV A0046 (8) of RSV A0405 (9). Dit zijn vergelijkbare methoden zoals beschreven in de ISO-voorschriften 6785 (1) en 6579 (2).

Op de volgende punten wordt van de ISO-voorschriften afgeweken:

De begin-pH van het Rappaport-Vassiliadis ophopingsmedium was $5,5 \pm 0,1$ in plaats van $5,2 \pm 0,1$, zoals in het ISO-voorschrift wordt genoemd.

Ook werd in plaats van 2 verschillende isolatiemedia alleen Brilliant Green Agar als isolatie-medium gebruikt.

2.2 Selectieve ophopingsmedia

De media zijn bereid volgens de onderstaande procedures.

2.2.1 Tetrathionaatbouillon volgens Müller-Kauffmann (MK)

Er is in dit onderzoek uitsluitend gebruik gemaakt van MK-medium dat in het laboratorium uit de ingrediënten is bereid en niet van commercieel verkrijgbare preparaten.

Voor de bereiding van het MK-medium, zie Rikilt-voorschriften A46 (7), respectievelijk RSV A0046 (8) onder punt 5.2.

2.2.2 Rappaport-Vassiliadis malachietgroen magnesiumchloride bouillon (RV)

Voor de bereiding van het RV-medium, zie ISO-6579, Annex B.2 (2).

2.2.3 Seleniet-cysteïne medium (SC)

Voor de bereiding van het SC-medium, zie RSV A0405 (9).

2.3 Monstermateriaal

Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van monsters, welke routinematig voorhanden waren en als zodanig op de aanwezigheid van *Salmonellae* getest werden. In de meeste gevallen is 25 gram van het monster in onderzoek genomen. Bij onderzoek van babyvoeding en interventie-melkpoeders zijn respectievelijk 50 en 200 gram monstermateriaal in bewerking genomen.

De aangeboden monsters zijn in 5 groepen te verdelen, afhankelijk van de aard van het produkt, te weten:

- diervoeders (diarmelen, vismelen, huisdiervoer)
- melkpoeders (babyvoeding, kindervoeding), afkomstig van het Voedselvoorzienings In- en Verkoop Bureau
- visprodukten (mosselen, garnalen, oesters), afkomstig van de RVV
- kipprodukten (hele kip, kippenekvel, eiprodukten), afkomstig van RVV-kring Apeldoorn

- diversen, waaronder afvalmonsters, broodverbetermiddel en filet americain.

In totaal zijn 1579 monsters onderzocht, waarvan 82 diervoeders, 1144 melkpoeders, 249 visprodukten, 94 kipprodukten en 10 diverse monsters.

2.4 Statistische analyse

Voor de vergelijking van de resultaten van de ophopingsmedia komt een tweezijdige tekentoets in aanmerking. Deze toets is toegepast op de monsters waarvoor de ophopingsmedia een verschillend resultaat opleveren.

Als MK en RV gelijkwaardig zijn, mag men verwachten dat dit gemiddeld in de helft van de gevallen in het voordeel van MK uitvalt. Door berekening van een tweezijdige overschrijdingskans (P) kan men toetsen of de hypothese van gelijkwaardigheid onwaarschijnlijk is (Bij $P < 0,05$ is er een significant verschil aangetoond).

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

Van het totale aantal onderzochte monsters van 1579 zijn 82 monsters "*Salmonella* positief" bevonden. Een monster is positief bevonden indien na 24 uur en/of na 48 uur *Salmonella* kan worden geïsoleerd uit het selectieve ophopingsmedium.

In tabel 1 zijn de resultaten weergegeven.

Tabel 1 Resultaten van *Salmonella* isolaties uit alle monsters

categorie	totaal aantal monsters	aantal <i>Salmonella</i> positieve monsters
diervoeders	82	12
melkpoeders	1144	6
visprodukten	249	5
kipprodukten	94	59
diverse monsters	10	0
totaal	1579	82

In tabel 2 tot en met 5 (bijlage 1) zijn per produktgroep de resultaten van de *Salmonella* positief beoordeelde monsters weergegeven, waarbij de resultaten na zowel 24 uur als 48 uur incubatie van beide selectieve ophopingsmedia zijn vermeld. Indien sprake was van gebruik van een derde selectieve ophopingsmedium, namelijk het seleniet-cysteïne (SC) medium, dan is de uitslag in de tabel vermeld.

Bij de diervoeders (tabel 2) blijkt dat in 8 gevallen uit RV *Salmonella* wordt geïsoleerd en in 10 gevallen uit MK. (In 2 gevallen wordt dus alleen uit MK *Salmonella* geïsoleerd).

Dit verschil tussen MK en RV blijkt niet statistisch significant te zijn. Door het lage aantal waarnemingen, hetgeen tot een laag onderscheidingsvermogen leidt, mag uit dit resultaat echter niet de conclusie worden afgeleid dat er geen verschil zou bestaan tussen beide ophopingsmedia.

Bij de produktgroep melkpoeders (tabel 3) blijkt dat in 6 gevallen *Salmonella* is geïsoleerd uit MK, terwijl uit RV geen enkele keer *Salmonella* wordt geïsoleerd. Dit is statistisch significant. Helaas waren al deze 6 monsters afkomstig van hetzelfde productiebedrijf. Doordat er dus waarschijnlijk sprake is van dezelfde begeleidingsflora, zal onderzoek van andere monsters moeten worden uitgevoerd, teneinde een algemene conclusie hierover te mogen trekken. Bij deze monsters werd ook het SC-medium als selectief ophopingsmedium gebruikt. Hierbij bleek ook geen *Salmonella* geïsoleerd te kunnen worden.

4 van de 5 positief beoordeelde visprodukten (tabel 4) laten zien dat de aantoonbaarheid van *Salmonella* uit RV en MK nauwelijks verschil geeft. In 1 visprodukt wordt wel *Salmonella* geïsoleerd uit RV (na 24 uur) en niet uit MK, maar de resultaten zijn niet statistisch significant.

Bij de produktgroep kipprodukten (tabel 5) blijkt dat in 11 van de 59 positief bevonden monsters *Salmonella* alleen uit RV en slechts 1 maal alleen uit MK is geïsoleerd. Dit is statistisch significant. Indien wordt gekeken naar het aantal monsters waaruit *Salmonella* geïsoleerd kon worden blijkt dat dit vaker uit RV is dan uit MK, namelijk 58 monsters werden positief bevonden met RV en 48 monsters met MK. Helaas waren deze monsters afkomstig van hetzelfde productiebedrijf. Doordat er dus waarschijnlijk sprake is van dezelfde begeleidingsflora, zal onderzoek van andere monsters moeten worden uitgevoerd, teneinde een algemene conclusie hierover te mogen trekken.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Bij de produktgroep melkpoeders is in 6 gevallen geen *Salmonella* geïsoleerd uit RV, terwijl dit wel gebeurde uit MK. Hoewel deze 6 monsters alle afkomstig waren van hetzelfde productiebedrijf en dus meer onderzoek nodig is, wordt aanbevolen bij onderzoek van melkpoeders naast RV in ieder geval MK als selectief ophopingsmedium te gebruiken. Voor onderzoek van melk- en melkprodukten is MK ook nog steeds opgenomen in ISO-voorschrift 6785 (1). Bij de produktgroep diervoeders is bij gebruik van MK als selectief ophopingsmedium een groter aantal (hoewel niet statistisch significant) positief bevonden monsters geconstateerd. Bij onderzoek van bovengenoemde poedervormige produkten ("processed foods") lijkt MK als ophopingsmedium

geschikter, omdat dit ophopingsmedium een hoger aantal *Salmonella* isolaties geeft.

Bij onderzoek van vis- en kipprodukten geeft RV als selectief ophopingsmedium juist een groter aantal (statistisch significant) *Salmonella* positieve monsters te zien. Hoewel de kipprodukten alle afkomstig waren van hetzelfde productiebedrijf en dus meer onderzoek nodig is, wordt hierbij aanbevolen zeker RV als selectief ophopingsmedium te gebruiken. Dit is ook opgenomen in het algemene ISO-voorschrift 6579 (2). Bij onderzoek van vis- en kipprodukten lijkt RV dus geschikter als selectief ophopingsmedium. Dit stemt overeen met resultaten uit het onderzoek van Bolder (4).

LITERATUUR

Bolder, N.M.

De vergelijking van *Salmonella*-isolatiemethoden (1986).

COVP-mededeling No 451.

Division of microbiology. Center for food safety and applied nutrition, U.S. Food and drug administration. Bacteriological analytical manual, 6th edition.

Intern analysevoorschrift A46, 3^e oplage (1985-08-08)

ISO 6785. Milk and Milkprodukts

Detection of *Salmonella*, first edition, 1985-11-15.

ISO 6579. Microbiology

General guidance on methods for the detection of *Salmonella*, second edition, 1990-06-01.

Mossel, D.A.A., S.K. Tamminga

Onderzoek op *Salmonella* en *Arizona*. Methoden voor het microbiologisch onderzoek van levensmiddelen (1980) Zeist: Uitgeverij P.C. Noordervliet, p. 91-100

Northolt, M.D., J. Stadhouders, W. v. Asseldonk

Vergelijking van het Rappaport-Vassiliadismedium met het Müller-Kauffmannmedium voor het aantonen van *Salmonella*'s in caseïnaat en melkpoeder (1985).

Netherlands Milk and Dairy Journal, 39, 49-55.

RSV A0046: Diervoeders, diervoedergrondstoffen, gedenatureerde melk- en weipoeder

Aantonen van *Salmonella* - grensreactie.

RSV A0405: Melkpoeder/kindervoeding (porridgemix) - Aantonen van *Salmonella* - grensreactie.

TABEL 2 Resultaten produktgroep DIERVOEDERS

monster	produktsoort	MK 24	RV 24	MK 48	RV 48	MK tot	RV tot
1	diermeel	pos	neg	neg	pos	pos	pos
2	diervoeder	pos	pos			pos	pos
3	diervoeder	pos	pos			pos	pos
4	diermeel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	diermeel	pos	neg	pos	neg	POS	NEG
6	diermeel	pos	pos			pos	pos
7	diermeel	pos	neg	pos	neg	POS	NEG
8	diermeel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9	vismeel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10	vismeel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	10					10	8

TABEL 3 Resultaten produktgroep MELKPOEDERS

monster	produktsoort	MK 24	RV 24	SC 24	MK 48	RV 48	SC 48	MK tot	RV tot
1	magere mp	neg	neg	neg	pos	neg	neg	POS	NEG
2	magere mp	pos	neg	neg	pos	neg	neg	POS	NEG
3	magere mp	pos	neg	neg	pos	neg	neg	POS	NEG
4	magere mp	neg	neg	neg	pos	neg	neg	POS	NEG
5	magere mp	neg	neg	neg	pos	neg	neg	POS	NEG
6	magere mp	pos	neg	neg	pos	neg	neg	POS	NEG
	6							6	0

TABEL 4 Resultaten produktgroep VISPRODUKTEN

monster	produktsoort	MK 24	RV 24	MK 48	RV 48	MK tot	RV tot
1	mosselen	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	mosselen	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	mosselen	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	mosselen	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	mosselen	neg	pos	neg	neg	NEG	POS
	5					4	5

TABEL 5 Resultaten produktgroep KIPPRODUKTEN

monster	produktsort	MK 24	RV 24	MK 48	RV 48	MK tot	RV tot
1	kip	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
2	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	kip	pos	pos	neg	pos	pos	pos
4	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	kip	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
6	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10	kip	neg	neg	pos	pos	pos	pos
11	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
12	kip	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
13	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
14	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
15	kip	pos	pos	pos	pos	pos	pos
16	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
17	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
18	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
19	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
20	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
21	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
22	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
23	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
24	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
25	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
26	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
27	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
28	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
29	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
30	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
31	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
32	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
33	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
34	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
35	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
36	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
37	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
38	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
39	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
40	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
41	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
42	nekvel	pos	pos	neg	pos	pos	pos
43	nekvel	pos	pos	neg	pos	pos	pos
44	nekvel	pos	pos	neg	pos	pos	pos
45	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
46	nekvel	neg	pos	pos	neg	pos	pos
47	nekvel	pos	pos	neg	pos	pos	pos
48	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
49	nekvel	pos	pos	neg	pos	pos	pos
50	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
51	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
52	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
53	nekvel	pos	pos	pos	pos	pos	pos
54	nekvel	pos	neg	neg	neg	POS	NEG
55	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
56	nekvel	pos	pos	neg	pos	pos	pos
57	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
58	nekvel	neg	pos	neg	pos	NEG	POS
59	nekvel	pos	pos	neg	pos	pos	pos
59						48	58