

# Vergelijkende onderzoeken over de isolatie van *Salmonella* uit effluënten

Uit het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid

## 1. Inleiding

In verband met epidemiologische onderzoeken over de kringlopen van *Salmonella* in de natuur werden gedurende een half jaar de effluënten van veertien rioolwaterzuiveringsinstallaties op het eiland Walcheren onderzocht. De resultaten van deze onderzoeken zullen te zijner tijd elders worden gepubliceerd. Gezien het frekwente voorkomen van *Salmonella* in dit materiaal met, homogeen verdeeld, een zeer groot aantal kiemen waaronder een groot aantal *Enterobacteriaceae*, was het bijzonder geschikt voor vergelijkende onderzoeken over methodes ter isolatie van *Salmonella* uit effluënten. Een beschrijving van deze methodes en de daarmee verkregen resultaten wordt hieronder gegeven.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Materiaal

De bemonstering der effluënten geschiedde op 2 manieren en wel:

- met tampons; deze bestond uit 1 g alginaatwatten, die in 3 lagen hydrofiel gaas werden gepakt, zodat een cilinder ontstond met een lengte van ca. 20 cm en een doorsnede van 3 cm. Deze cilinder werd vervolgens met touw dichtgesnoerd, zodat er een prop ontstond, die in de stroom van het effluent werd opgehangen. Na 3 tot 4 dagen werd de tampon opgehaald, in dubbele plastic zakken verpakt en naar het laboratorium gezonden, alwaar nog dezelfde dag met het onderzoek werd begonnen.
- met flesjes; hiervoor werden nauwmondse flesjes met een inhoud van 120 ml gebruikt, die met behulp van een knijper, bevestigd aan een stok, in de effluentstroom werden gehouden. Direct na vulling werd het flesje afgesloten met een schroefdop en vervolgens, verpakt in een plastic zak, naar het laboratorium gezonden, waar nog dezelfde dag met het onderzoek werd begonnen.

### 2.2 Media

#### 2.2.1 Voorophopingsmedium

Als voorophopingsmedium (pre-enrichment) werd gebruikt gebufferd peptonwater (recept zie appendix I), in het vervolg aan te duiden met *Pw*. Materiaal in 100 ml van dit medium werd bebroed bij 37 °C.

#### 2.2.2 Ophopingsmedia

- Seleniet-briljantgroen-bouillon volgens Stokes en Osborne (recept zie Rapport van Werkgroep, 1967), in het vervolg aan te duiden met *SB*. Materiaal in 150 ml van dit medium werd bebroed bij 37 °C.
- Natrium-tetrathionaat-briljantgroengalbouillon volgens Muller-Kauffmann (recept zie Rapport van Werkgroep, 1967), in het vervolg aan te duiden met *MK*. Materiaal in 150 ml van dit medium werd bebroed bij 37 °C of 43 °C.
- Kaliumtetrathionaat-Brillantgrün-Galle-Anreicherungs-nährboden (Merck 5172), in het vervolg aan te duiden met *MKA*. Van dit poeder wordt 6,3 g in 100 ml opgelost. Materiaal in dit medium werd bebroed bij 37 °C of 43 °C.
- Seleniet-F ophopingsmedium volgens Leifson (Merck 7717), in het vervolg aan te duiden met *SF*. Van dit poeder wordt 2,3 g in 100 ml opgelost. Materiaal in dit medium werd bebroed bij 37 °C.

#### 2.2.3 Selectieplaat

Hiervoor werd gebruikt briljantgroen-fenolrood-agar en wel in platen met een doorsnede van 15 cm (recept zie Rapport van Werkgroep, 1967) in het vervolg aan te duiden met *BA*. Dit medium werd bebroed bij 37 °C.

#### 2.2.4 Media voor biochemisch onderzoek

- Triple Sugar Iron agar met ureum (recept zie appendix II). Dit medium werd bebroed bij 37 °C.
- Lysine decarboxylase medium (recept Taylor, 1961). Dit medium werd bebroed bij 37 °C.

#### 2.2.5 Serologisch onderzoek

- Polyvalent *Salmonella* serum (RIV No. 625.5).
- Salmonella* O serum (RIV No. 620.5 - 628.5).

### 2.3 Methodes van onderzoek

#### 2.3.1 Tampons

De tampons werden gespoeld in 100 ml fysiologisch zout + 0,1 % pepton, daarna goed uitgedrukt en in tweeën geknipt. De twee delen van de tampon en het

spoelwater werden afzonderlijk onderzocht:

- Tampon deel 1: Direct onderzoek in *SB* of *MK*.
- Tampon deel 2: Voorophoping in *Pw*, overenting van 10 ml na 4 en 18 uur in *SB* en *MK*.
- Spoelwater: Aan 100 ml werd resp. 2,3 g *SF* of 6,3 g *MKA* toegevoegd.

#### 2.3.2 Effluent

Dit werd op twee manieren onderzocht:

- Direct onderzoek door toevoeging van resp. 2,3 g *SF* of 6,3 g *MKA* aan 100 ml.
- Na filtratie van 100 ml door een membraanfilter door middel van een vacuümpomp.

Het filter werd verder onderzocht:

- Direct in *SB* of *MK*.
- Voorophoping in *Pw*, overenting van 10 ml in *SB* en *MK*, na 4 en 18 uur. Afhankelijk van de verontreiniging van het effluent was het soms nodig dit eerst door watten te filteren of af te centrifugeren alvorens het door de membraanfilter te zuigen. Watten of sediment werden dan samen met het bijbehorende filter in één medium onderzocht.

Vanuit de ophopingsmedia werd na 18 en 48 uur uitgestreken op *BA*-platen. Na bebroeding gedurende 20 uur werden verdachte kolonies biochemisch en serologisch onderzocht.

### 2.4 Beoordeling der ophopingsmedia door middel van de selectieplaat

Voor de beoordeling van de ophopingsmedia werd niet alleen het verschil in aantal positieve monsters vergeleken, doch ook het verschil in de resultaten van de uitstrijken uit deze media op de *BA*-plaat. Teneinde de selectiviteit van de media in cijfers weer te geven werd de groei op de *BA*-platen in een puntencode uitgedrukt en wel:

- 1 punt: enkele *Salmonella*-kolonies, meer dan 2 maal zoveel begeleidingsflora;
- 2 punten: 20 - 100 *Salmonella*-kolonies, 1 of 2 maal zoveel begeleidingsflora;
- 3 punten: reincultuur, of vrijwel reincultuur van *Salmonella*.

TABEL I - *Salmonella*-onderzoek van effluënten met verschillende methodes

materiaal	pre-enrichment in Pw 37 °C	aantal (percentage) positieve monsters via ophopingsmedia		
		SB 37 °C	MK 37 °C	MK 43 °C
tampon van effluent	geen	29/47 (62)	12/26 (46)	117/130 (90)
	4 uur	30/46 (65)	24/45 (56)	44/47 (94)
	18 uur	36/47 (77)	32/42 (76)	131/146 (90)
filter van effluent	geen	17/21 (81)	16/26 (62)	62/77 (81)
	4 uur	22/32 (64)	18/27 (67)	60/68 (88)
	18 uur	51/68 (75)	36/63 (57)	61/68 (90)
spoelwater van tampon effluent		SF 37 °C	MKA 37 °C	MKA 43 °C
		4/28 (14)	18/21 (86)	60/77 (78)
		nd	31/49 (64)	87/105 (83)
Pw	gebufferd peptonwater			
SB	Seleniet-briljantgroen-bouillon volgens Stokes en Osborne			
MK	Natrium-tetrathionaat-briljantgroen-galbouillon volgens Muller-Kauffmann			
SF	Seleniet-F			
MKA	Kaliumtetrathionaat-Brillantgrün-Galle-Anreicherungs-nährboden			
Teller	aantal positieve monsters			
Noemer	aantal onderzochte monsters			
nd	niet gedaan			

### 3. Resultaten

In totaal werden onderzocht:

- 175 tampons,
- 112 monsters spoelwater,
- 154 monsters effluent,
- 192 filters van effluent.

Het aantal malen, dat zowel tampon als effluent bij de bemonstering positief was bedroeg 121. De tampon alleen was 12 maal en het effluent alleen 3 maal positief; 10 maal waren zowel tampon als effluent negatief. Aangezien in de loop van het onderzoek bleek, dat het onderzoek van spoelwater minder en geen andere positieve monsters opleverde, dan het onderzoek van de bijbehorende tam-

pons werd het spoelwater niet meer onderzocht. Tevens bleek hierbij, dat bij het gebruik van SF de resultaten in vergelijking met die bij het medium MKA ver achter bleven. Op grond hiervan werd voor het onderzoek van effluent SF niet toegepast. Aangezien het aantal monsters per ophopingsmedium uiteenliep, werd in de tabel het aantal positieve monsters ten opzichte van het aantal onderzochte monsters als breukgetal weergegeven. Het percentage positieve monsters werd afgerond op hele getallen. In tabel I worden de resultaten van de vergelijkende onderzoeken samengevat.

In tabel II is de semi-kwantitatieve be-

TABEL II - *Beoordeling van de verschillende ophopingsmedia met behulp van de BA-plaat*

materiaal	pre-enrichment in Pw 37 °C	puntenwaardering (percentage) van de selectiviteit der ophopingsmedia		
		SB 37 °C	MK 37 °C	MK 43 °C
tampon van effluent	geen	34/87 (39)	15/36 (42)	248/351 (71)
	4 uur	40/90 (44)	30/75 (40)	98/132 (74)
	18 uur	67/108 (62)	38/96 (40)	294/393 (75)
filter van effluent	geen	28/51 (55)	36/48 (75)	135/186 (73)
	4 uur	25/66 (38)	23/54 (43)	153/180 (85)
	18 uur	93/153 (67)	54/108 (50)	123/183 (67)
spoelwater van tampon effluent		SF 37 °C	MKA 37 °C	MKA 43 °C
		4/12 (37)	32/54 (59)	124/180 (69)
		nd	54/93 (58)	209/261 (80)

Puntenwaardering voor de groei op BA-plaat:

- 1 enkele *Salmonella*-kolonies, meer dan 2 maal zoveel begeleidingsflora
- 2 20 - 100 *Salmonella*-kolonies, 1 of 2 maal zoveel begeleidingsflora
- 3 (vrijwel) reincultuur van *Salmonella*
- BA briljantgroen-fenolrood-agar
- Pw gebufferd peptonwater
- SB Seleniet-briljantgroen-bouillon volgens Stokes en Osborne
- MK Natrium-tetrathionaat-briljantgroen-galbouillon volgens Muller-Kauffmann
- SF Seleniet-F
- MKA Kaliumtetrathionaat-Brillantgrün-Galle-Anreicherungs-nährboden
- Teller som der puntenwaardering van de BA-platen
- Noemer maximaal haalbaar aantal punten op de BA-platen
- nd niet gedaan

oordeling der ophopingsmedia samengevat. De selectiviteit van op ophopingsmedia werd beoordeeld naar de resultaten van de uitstrijken vanuit deze media op BA-platen. De groei op de plaat werd in punten uitgedrukt, zoals onder 2.4 vermeld. Per onderzoekmethode werd het percentage berekend van de som van deze punten ten opzichte van de som van de punten van de positieve platen, indien daarop reinculturen zouden zijn gevonden, dat wil zeggen het aantal positieve platen maal 3 (hoogste puntenwaardering) was 100 %.

### 4. Bespreking der resultaten

Uit de tabellen I en II blijkt, dat vrijwel over de gehele lijn de beste resultaten worden verkregen bij een bebroedings-temperatuur van 43 °C, hetzij met het medium MK, hetzij met het medium MKA. Alleen bij het onderzoek van spoelwater voldoet een bebroedingstemperatuur van 37 °C beter, al blijkt de selectiviteit van het medium hoger te zijn bij 43 °C (zie tabel II). Vergelijkt men de verschillende materialen, waarmee effluent kan worden bemonsterd en onderzocht, dan blijkt de isolatie uit tampons met het medium MK bij 43 °C de beste resultaten te geven. De toepassing van een voorophoping is hierbij niet van invloed. Dit is wel het geval indien men filters gebruikt, waarbij na voorophoping van 4 en 18 uur, resp. 7% en 9% meer positieve monsters wordt verkregen dan zonder voorophoping. Overigens blijken door toevoeging van MKA direct aan effluent met daaropvolgende bebroeding bij 43 °C de resultaten zeer behoorlijk te zijn, hetgeen, gezien de snelle werkwijze, van praktisch belang is.

Met betrekking tot de selectiviteit kan worden opgemerkt, dat deze, zoals was te verwachten, parallel loopt met de gunstige isolatie-uitkomsten. Uitstrijken uit de media MK en MKA na bebroeding bij 43 °C op BA-platen geven over de gehele lijn de beste resultaten (vrijwel reinculturen), hetgeen verdere isolatie en identificatie van de salmonellae vergemakkelijkt.

Bij de keuze van de methode van bemonstering moet overigens rekening worden gehouden met twee feiten. Ten eerste geven de resultaten van het onderzoek met tampons een indruk over het voorkomen van *Salmonella* in effluent gedurende een zekere periode en zijn als het ware een tijdopname, terwijl het onderzoek van effluentvloeistof een momentopname is, waarbij het voorkomen van *Salmonella* in effluent op het ogenblik van de bemonstering wordt weergegeven. Ten tweede is de bemonstering met tampons kostbaarder dan de directe bemonstering van effluent, aangezien de, met de hand gemaakte, alginaat-tampons eerst moeten worden ingehangen en na enkele dagen weer moeten worden opgehaald.

Samenvattend kan worden gezegd, dat

als meest economische methode voor het onderzoek van effluent op Salmonella kan worden aanbevolen de toevoeging van 6,3 g Kaliumtetrathionat-Brillantgrün-Galle-Anreicherungs-nährboden aan 100 ml effluentvlocistof met bebroeding bij 43 °C, gevolgd door uitstrijk(en) op briljantgroen-fenolrood-agarplaten.

Ofschoon met deze werkwijze een aanzienlijke besparing met materiaal en tijd wordt verkregen, mag niet uit het oog worden verloren, dat de resultaten slechts een momentopname weergeven betreffende het voorkomen van Salmonella in effluent. Wil men een indruk over een langer tijdsverloop verkrijgen dan is de aangewezen methode het bemonsteren van effluent met tampons, welke dan al of niet na pre-enrichment in natriumtetrathionaat-briljantgroen-galbouillon volgens Muller-Kauffmann bij 43 °C worden bebroed, gevolgd door uitstrijk(en) op BA-platen.

### Literatuur

Rapport van een Werkgroep. *Vergelijkende onderzoeken over de isolatie van Salmonella uit gehakt in 5 laboratoria*. Tijdschr. Diergeneesk., 92 (1967) 355-367.

W. L. Taylor. *Isolation of salmonellae from food samples*. Appl. Microbiol., 9 (1961) 487.

### APPENDIX I

#### Gebufferd peptonwater

Benodigdheden:

1. Pepton	Difco	10 gram
2. NaCl	Merck	5 gram
3. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	Merck	9 gram
4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	1,5 gram
5. Gedestilleerd water		1000 ml

### APPENDIX II

#### Triple Sugar Iron agar met ureum

Oplossing I

Benodigdheden:

1. Gedestilleerd water		1000 ml
2. Pepton	Difco	1 gram
3. Glucose	Difco	1 gram
4. NaCl	Merck	5 gram
5. K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	2 gram
6. Fenolrood opl. 0,2 %	Merck	6 ml
7. Agar	Difco	20 gram
8. Ureumoplossing 20 gew./vol %		80 ml

Oplossing II

1. TSI-agar	Difco	65 gram
2. Gedestilleerd water		1000 ml