

**Ontwikkeling van een ééndagsmethode voor
het opsporen van *Listeria monocytogenes*
en *Salmonella***

Wetenschappelijk ondersteuningsprogramma
voor de normalisatie

deel II

Eindverslag

Federale Diensten voor
WETENSCHAPPELIJKE, TECHNISCHE
EN CULTURELE AANGELEGENHEDEN

Wetenschappelijk Ondersteuningsprogramma voor de Normalisatie: deel II
1/5/1996-31/7/1998

NO 1002

27/11/98

EINDRAPPORT

Ontwikkeling van een ééndagsmethode voor het opsporen van *Listeria monocytogenes* en *Salmonella*

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Departement voor Kwaliteit van Dierlijke Producten

Lieve Herman (coördinator), Nancy Rijpens

Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle

Tel.: 09/2521861; Fax: 09/2525085; e-mail: L. Herman@clo.fgov.be

Universiteit Gent, facult. Diergeneeskunde, Vakgroep Diergeneeskundig Toezicht op Eetwaren

Lieven De Zutter

Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke,

Tel.: 09/2647455; Fax: 09/2647491; e-mail: lieven.dezutter@rug.ac.be

Micro-Smedt

Jef De Smedt

Atealaan 17, 2200 Herentals

Tel.: 014/230021; Fax: 014/214181

NV Innogenetics S.A.

Rudi Rossau, Geert Jannes

Industriepark Zwijnaarde 7, box 4

Tel. 09/2410711; Fax: 09/2410907; e-mail: Geert_Jannes@innogenetics.be

1. INLEIDING	5
2. METHODOLOGIE	7
GEBRUIKTE STAMMEN.....	7
VERGELIJKING VAN DE GROEI VAN GESTRESSEERDE <i>SALMONELLA</i> EN <i>L. MONOCYTOGENES</i> IN VERSCHILLENDE SELECTIEVE EN NIET-SELECTIEVE AANRIJKINGSMEDIA.....	7
CONVENTIONELE <i>SALMONELLA</i> DETECTIE	7
CONVENTIONELE DETECTIE VAN <i>L. MONOCYTOGENES</i>	8
PCR-BEVESTIGING VAN VERMOEDELIJKE <i>SALMONELLA</i> KOLONIES	8
PCR-BEVESTIGING VAN VERMOEDELIJKE <i>L. MONOCYTOGENES</i> KOLONIES.....	8
VLUGGE DETECTIE VAN <i>SALMONELLA</i> , GEBRUIK VAN IMS.....	9
3. RESULTATEN	10
DETECTIE VAN <i>SALMONELLA</i>	10
<i>Groei van gestresseerde Salmonella in verschillende niet-selectieve aanrijkmiddelen</i>	10
<i>Groei van gestresseerde Salmonella in verschillende niet-selectieve aanrijkmiddelen in aanwezigheid van vlees en vleesproducten</i>	10
SNELLE DETECTIE VAN <i>SALMONELLA</i> SPP.....	12
Zuivelproducten	12
Vleesproducten.....	13
POOLING VAN MONSTERS.....	15
Zuivel.....	15
Pooling van melkpoeder.....	15
Pooling van roomijs.....	16
Pooling van Goudse kaas	16
Poolen van ei-product	17
Besluit.....	18
Vlees.....	18
Besluit.....	19
DETECTIE VAN <i>L. MONOCYTOGENES</i>	20
<i>Deel 1: Aanrijking van Listeria monocytogenes</i>	20
Groei van gestresseerde <i>L. monocytogenes</i> in verschillende niet-selectieve en selectieve aanrijkmiddelen.....	20
A/ niet selectieve aanrijkingen.....	20
B/ Selectieve aanrijkingen	21
C/ Combinatie van media.....	22
Groei van gestresseerde <i>L. monocytogenes</i> in verschillende niet-selectieve en selectieve aanrijkmiddelen in aanwezigheid van voedingsmiddelen.....	23
A/ In het eerste aanrijkmiddel.....	23
Goudse kaas	23
Rauwmelkse kaas	23
B/ In een combinatie van vooraanrijking en aanrijking	24
Met Goudse kaas	24
Met vleesproducten	24
Gekookte ham	25
Salami	25
Isolatie van <i>L. monocytogenes</i> uit natuurlijk besmet vers vlees en vleesproducten	28
Conclusie deel 1:	29
<i>Deel 2: Optimalisatie van de PCR</i>	30
Zuivelproducten.....	30
Vleesproducten.....	31
Conclusie Deel 2	31
<i>Deel 3: Staalvoorbereiding voor de PCR</i>	32
Staalvoorbereiding gebaseerd op IMS	32
Staalvoorbereiding gebaseerd op filtratie	32

Staalvoorbereiding gebaseerd op IMS en filtratie	32
Vergelijking IMS en filtratie als staalvoorbereiding	33
Conclusie deel 3:	33
Deel 4: Evaluatie van een aantal detectieprotocols voor <i>L. monocytogenes</i> in kaas	34
Detectie van <i>L. monocytogenes</i> in natuurlijk gecontamineerde kazen uit de handel	34
Detectie van <i>L. monocytogenes</i> in kazen kunstmatig gecontamineerd met <i>L. monocytogenes</i> cellen	35
Kunstmatige contaminatie van kazen op basis van gepasteuriseerde melk met 5 kve gestresseerde <i>L. monocytogenes</i> cellen	35
Kunstmatige contaminatie van kazen op basis van rauwe melk met 5 kve gestresseerde <i>L. monocytogenes</i> cellen	36
Kunstmatige contaminatie van kazen op basis van rauwe melk met 5000 kve gestresseerde <i>L. monocytogenes</i> cellen	36
Kunstmatige contaminatie van kazen op basis van rauwe melk met 5-10 niet gestresseerde <i>L. monocytogenes</i> cellen	37
Conclusie deel 4	37
Deel 5: Snelle detectie van <i>L. monocytogenes</i> uit natuurlijk besmette vleesproducten met PCR	39
Conclusie Deel 5:	40
Algemeen besluit	40
RESULTATEN I.V.M. DE GEZAMELIJKE AANRIJING VAN <i>SALMONELLA</i> EN <i>L. MONOCYTOGENES</i> IN ZUIVELPRODUCTEN	41
<i>Consumptie-ijs zonder Ferrioxamine E</i>	41
<i>Consumptie-ijs met Ferrioxamine E</i>	41
<i>Goudse kaas zonder Ferrioxamine E</i>	41
<i>Goudse kaas met Ferrioxamine E</i>	42
<i>Rauwmelkse kaas</i>	42
<i>Besluit</i>	42
4. BESLUITEN EN AANBEVELINGEN	43
BESLUITEN MET BETREKKING TOT HET GEVOERDE ONDERZOEK	43
<i>Detectie van Salmonella in zuivelproducten, vlees en vleesproducten</i>	43
<i>Detectie van Listeria monocytogenes in zuivelproducten, vlees en vleesproducten</i>	44
<i>Gezamenlijke methode voor detectie van Listeria monocytogenes en Salmonella</i>	44
AANBEVELINGEN	44
5. SYNTHESE VAN HET ONDERZOEK	46
SITUERING EN DOELSTELLING	46
RESULTATEN EN CONCLUSIE	47
<i>Detectie van Salmonella</i>	47
<i>Detectie van Listeria monocytogenes</i>	48
6. BIJLAGEN	50
REFERENTIELIJST	50
LIJST VAN PUBLICATIES VOORTVLOEIEND UIT HET ONDERZOEK	50
GEDETAILEERDE RESULTATEN	51
<i>Artikel, aanvaard voor publicatie in 'International Journal of Food Microbiology'</i>	51
Abstract	51
1. Introduction	52
2. Materials and methods	54
3. Results	56
3.1. Development of a detection protocol	56
3.2. Development of an internal control for PCR	57
4. Discussion and conclusions	57
4.1. Development of a detection protocol	57
4.2. Development of an internal control for PCR	57
Acknowledgements	59
References	59
Table 1 Comparison of conventional and short method for the detection of stressed <i>S. panama</i> in different dairy products	62

Table 2. Comparison of conventional and short method for the detection of stressed <i>S. typhimurium</i> in different dairy products.....	63
Figure 1.....	63
Figure 2.....	64
OVERZICHT NORMEN WAARNAAR VERWEZEN WORDT.....	66

1. Inleiding

Besmette voedingsmiddelen kunnen fungeren als ziektebron voor de consument. Van de diverse bacteriën, die voedselintoxicatie of -infectie kunnen veroorzaken, is *Salmonella* de meest voorkomende oorzaak. Een andere infectie die eerder sporadisch vastgesteld wordt maar in een groot aantal gevallen dodelijk verloopt, is listeriosis, veroorzaakt door *Listeria monocytogenes*. Om deze reden wordt veel aandacht besteed aan het opsporen van *Listeria monocytogenes* in voedingsmiddelen. Beide voedselinfecterende bacteriën staan dan ook bovenaan op de lijst van ongewenste micro-organismen in voedingsmiddelen. Op Europees niveau werd de nodige aandacht aan deze bacteriën gegeven. Dit resulteerde in een aantal richtlijnen, waarin onderzoek op de aanwezigheid van één of beide bacteriesoorten voorgeschreven wordt:

- richtlijn 91/492/EEG tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften voor de productie en het in de handel brengen van levende tweekleppige weekdieren
- richtlijn 92/46/EEG inzake de gezondheidsvraagstukken voor de productie en het in de handel brengen van verse melk, hittebehandelde melk en producten op basis van melk
- richtlijn 92/117/EEG inzake maatregelen voor de bescherming tegen bepaalde zoönoses en bepaalde zoönoseverwekkers bij dieren en in producten van dierlijke oorsprong ten einde door voedsel overgedragen infecties en vergiftigingen te voorkomen
- richtlijn 93/43/EEG inzake levensmiddelenhygiëne
- richtlijn 94/65/EG tot vaststelling van voorschriften voor de productie en het in de handel brengen van gehakt vlees en vleesbereidingen
- beschikking 94/356/EG tot vaststelling van bepalingen ter uitvoering van richtlijn 91/493/EEG van de raad wat de interne gezondheidscontroles van de visserijproducten betreft.
- beschikking 95/409/EG tot vaststelling, met betrekking tot *Salmonella*, van de voorschriften voor de steekproefgewijze microbiologische test van vers rund- en varkensvlees met als bestemming Finland en Zweden.
- beschikking 95/411/EG tot vaststelling, met betrekking tot *Salmonella*, van de voorschriften voor de steekproefgewijze microbiologische test van vers vlees van pluimvee met als bestemming Finland en Zweden.

Volgende richtlijnen verwijzen naar een microbiologische controle van de producten indien dit nodig geacht wordt:

- richtlijn 64/433/EEG betreffende de gezondheidsvoorschriften voor de productie en het in de handel brengen van vers vlees
- richtlijn 77/99/EEG betreffende de gezondheidsvoorschriften voor de productie en het in de handel brengen van vleesproducten en bepaalde andere producten van dierlijke oorsprong.
- richtlijn 92/45/EEG betreffende de gezondheidsvoorschriften en veterinairerechtelijke voorschriften voor het doden van vrij wild en het in de handel brengen van vlees van vrij wild.

De eigen nationale wetgeving verplicht het onderzoek van *Salmonella* en *Listeria monocytogenes* in zuivelproducten (K.B. van 15/12/1994, B.S. van 3/2/95) en het onderzoek op *Salmonella* in gehakt vlees en vleesbereidingen (K.B. van 4/7/96, B.S. 3/9/96). Dit laatste K.B. verplicht de betrokken bedrijven autocontroles, gebaseerd op de principes van HACCP, uit te voeren. Binnen

dit kader neemt,, gezien de aard van de producten, het onderzoek op *Salmonella* en *Listeria monocytogenes* een belangrijke plaats in.

Anderzijds eisen diverse importerende landen afwezigheid van hogervermelde pathogenen in de ingevoerde voedingsmiddelen. Deze eis wordt ook gesteld door sommige landen van de EG. Dit is het geval voor levering van vlees en vleesproducten in Zweden en Finland.

Voor het onderzoek op *Listeria monocytogenes* werd op internationaal vlak recent door de International Standard Organisation een standaard ISO-methode aanvaard. Sommige landen, zoals Frankrijk en USA, hebben een nationaal aanvaarde methode. Voor de opsporing van *Salmonella* bestaat de International Standard ISO 6579. Al deze methoden zijn zeer arbeidsintensief en tijdrovend. Gebruik maken van dergelijke (conventionele) methoden voor de controle van voedingsmiddelen is sterk remmend op het bedrijfsleven. De handel in verse bederfbare producten wordt hierdoor praktisch uitgesloten, daar de resterende houdbaarheid bij het bekomen van het resultaat van het laboratoriumonderzoek te gering is. Hierdoor worden leveringen van verse producten aan landen zoals Zweden uitgesloten.

Anderzijds worden zendingen, die niet onderzocht werden verstuurd met het risico dat deze geweigerd worden op basis van onderzoek in het ontvangend land. Dergelijke gevallen schaden het imago van de leverancier en zelfs van de sector.

In dit kader is de ontwikkeling van snelle methoden voor het opsporen van pathogene bacteriën in voedingsmiddelen een dringende noodzaak geworden. Om aan deze behoefte te voldoen werd een consortium opgericht, dat op een relatief korte tijd de mogelijkheid wilde onderzoeken om snelle detectiemethoden te ontwikkelen. Het consortium omvatte 2 laboratoria (CLO-DVK en RUG-LHT) en 2 adviserende organisaties. Gezien het belang van *Salmonella* en *Listeria monocytogenes* werd voor deze pathogenen een onderzoek naar detectiemethoden uitgevoerd. Het consortium wilde methoden ontwikkelen die toelaten deze pathogenen in 24 tot max. 32 u te detecteren.

2. Methodologie

Gebruikte stammen

De stammen *S. typhimurium* ALM 40 en *S. panama* ALM 41 werden aangekocht als referentiemateriaal bij het RIVM, Bilthoven, Nederland in capsules die ongeveer 5 kve gestresseerde cellen bevatten. *S. enteritidis* LMG 10395 werd gebruikt voor de constructie van de interne PCR controle.

L. monocytogenes 5 en 5000 ALM 92 gelulen, aangekocht bij het RIVM, omvatten respectievelijk ongeveer 5 kve en 5000 kve gestresseerde cellen.

Vergelijking van de groei van gestresseerde *Salmonella* en *L. monocytogenes* in verschillende selectieve en niet-selectieve aanrijksmedia

Een capsule met ongeveer 5 kve gestresseerde *S. panama* cellen werd toegevoegd aan 250 ml gebufferd pepton water (BPW) (Oxoid Ltd., London, England), trypton soya broth (TSB) (Oxoid), of universeel vooraanrijksmedium (UPB) (Difco Laboratories, Detroit, MA, USA) en geïncubeerd bij 37 °C. Na 4, 6, 8, 16 en 24 u incubatie werden 10-voudige verdunningen van het vooraanrijksmedium uitgeplaat op trypton soya agar (TSA) (Oxoid). De groei werd gevolgd door tellen van de kolonies, gegroeid op TSA.

Voor *L. monocytogenes* werd op dezelfde wijze de groei getest in hogervermelde niet-selectieve aanrijkingen. Bovendien werd de groei in volgende selectieve media gevolgd: 'enrichment broth' (EB, Oxoid), Fraser en 1/2 FR (Oxoid), 'University of Vermont medium I en II (UVM I en UVM II, Oxoid). Ook werden op dezelfde wijze verschillende combinaties van vooraanrijking en aanrijking getest.

Conventionele *Salmonella* detectie (gedeeltelijk overgenomen uit publicatie)

Voor de vergelijking van groei van *Salmonella* in aanwezigheid van voedingsmiddelen werd initieel de voorverrijking opgewarmd tot 37°C voor het toevoegen van het voedingsmiddel en de gelule met de gestresseerde *Salmonella* kiemen. Tevens werd een isolatie uitgevoerd op verdunningen van de geïncubeerde voorverrijkingen.

'For the following experiments one reference capsule containing an average of 5.9 *S. typhimurium* or *S. panama* cells was added to 25 ml of preheated BPW, and incubated at 37°C until dissolved (approximately 30 min). Twenty-five gram of food product was stomached for 1-2 min in 200 ml of BPW, added to the dissolved reference capsule, and subsequently incubated for 16-20 hours at 37°C. After preenrichment 0.1 ml of BPW was brought in 9.9 ml of RV and/of op Diassalm. Beide media werden geïncubeerd bij 42°C. After 20-24 hours (and 40-48 hours of incubation the enrichment medium) was streaked onto XLD agar. Presumptive *Salmonella* colonies were identified using biochemische testen (voor vlees) of PCR (voor zuivel) as described further.'

Ook werden isolaties uitgevoerd op natuurlijk besmet verse vlees. Dezelfde hoger beschreven isolatiemethoden werden hiertoe aangewend.

De gebruikte isolatieprotocollen worden vermeld in de sectie Resultaten.

Conventionele detectie van *L. monocytogenes*

De verschillende aanrijksprotocollen die werden uitgetest voor *L. monocytogenes* zijn beschreven in de sectie Resultaten. Als conventionele methode werd telkens 100 µl (DKV) of 10 µl (LHT) van de aanrijkscultuur uitgestreken op een selectieve agar plaat (Oxford agar, Oxoid). De vermoedelijke *L. monocytogenes* kolonies werden bevestigd d.m.v. PCR zoals hieronder beschreven (DKV) of d.m.v. biochemische testen (LHT).

PCR-bevestiging van vermoedelijke *Salmonella* kolonies

Presumptieve *Salmonella* kolonies werden gesuspenderd in 100 µl H₂O. Na centrifugatie (5 minuten - 12000 × g) werd het bacterieel pellet gesuspenderd in 100 µl 0,05 M NaOH, 0,125% SDS en 17 minuten bij 90°C geplaatst. Van dit lysaat werd 1 µl gebruikt in de PCR.

PCR-reactiemengsel:

- 1 µl lysaat
- 1 × PCR-buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, pH 8,3)
- 1,5 mM MgCl₂
- 200 µM van elk; dATP, dGTP, dCTP en dTTP
- 50 pmol van elke primer (ST11/ST15) (Aabo *et al.*, 1993, Mol. Cell. Probes 7, 171-178)
- 1,5 eenheden AmpliTaq DNA-polymerase

Het PCR-programma omvatte:

- een initiële denaturatie bij 95°C van 1 minuut
- 30 cycli bestaande uit: 15 s denaturatie bij 95°C, 15 s annealing bij 57°C, en 30 s elongatie bij 72°C
- een finale elongatie van 8 minuten bij 72°C

PCR-bevestiging van vermoedelijke *L. monocytogenes* kolonies

Presumptieve *Listeria* kolonies werden gesuspenderd in 100 µl H₂O. Na centrifugatie (5 minuten - 12000 × g) werd het bacterieel pellet gesuspenderd in 100 µl 0,05 M NaOH, 0,125% SDS en 17 minuten bij 90°C geplaatst. Van dit lysaat werd 1 µl gebruikt in de PCR.

PCR-reactiemengsel:

- 1 µl lysaat
- 1 × PCR-buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, pH 8,3)
- 1,5 mM MgCl₂
- 200 µM van elk; dATP, dGTP, dCTP en dTTP
- 50 pmol van elke primer (LM1/LM2) (Border *et al.*, 1990, Lett. Appl. Microbiol. 11, 158-162)
- 1,5 eenheden AmpliTaq DNA-polymerase

Het PCR-programma omvatte:

- een initiële denaturatie bij 95°C van 1 minuut
- 30 cycli bestaande uit: 15 s denaturatie bij 95°C, 15 s annealing bij 50°C, en 30 s elongatie bij 72°C
- een finale elongatie van 8 minuten bij 72°C

Vlugge detectie van Salmonella, gebruik van IMS

'One reference capsule containing an average of 5.9 *S. typhimurium* or *S. panama* cells was added to 25 ml of preheated BPW (Oxoid), and incubated at 37°C until dissolved (approximately 30 min). Twenty-five grams of food product was stomached for 2 min in 200 ml of BPW, added to the dissolved reference capsule, and subsequently incubated for 16 hours at 37°C. To 1 ml of BPW 20 µl of Dynabeads anti-*Salmonella* (DynaL A. S., Oslo, Norway) were added, subsequently the mixture was rotated for 10-15 min at room temperature. The magnetic particles were separated from the BPW applying a magnet for 5-10 min at room temperature. The magnetic beads were washed twice with 1 ml PBS (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween-20, pH=7.4). Alternatively, one ml of BPW was filtrated through a Whatman nr. 4 filter (Whatman, Kent, England) using plastic filterholders. The obtained filtrate was centrifuged for 5 min at 13000 g and the pellet was washed with 100 µl of H₂O.

For method A the pellet obtained after IMS or filtration was used for PCR as described below. For method B the pellet obtained after IMS was suspended in 1 ml of RV, incubated at 42°C for 4 hours, and centrifuged for 5 min at 13000 g. The obtained pellet was used for PCR as described below.

The pellets obtained from method A after IMS, and from method B were dissolved in 10 µl of lysis solution (0.05 M NaOH, 0.125% SDS). The pellets obtained from method A after filtration were dissolved in 100 µl of lysis solution. Both lysis solutions were heated for 17 min at 90°C.

PCR was performed in a final volume of 50 µl containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween-20, 0.01% gelatine, 200 µM of each dNTP, 2.5 U of AmpliTaq DNA-polymerase (Perkin Elmer), 100 pmol of primer ST11 and ST15 and 5 µl of crude cell lysate. The mixture was subjected to 30 cycles of amplification in a thermal cycler (Cetus 9600 in DVK; 2400 in LHT, Perkin Elmer) as described in section above'.

3. Resultaten

Het project had tot doel methoden te ontwikkelen om *Salmonella* en *L. monocytogenes* in voedingsmiddelen op te sporen in 24 tot max. 32 u met behoud van de gevoeligheid en de specificiteit van de conventionele methoden. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een combinatie van klassieke kweekmethododes, immunomagnetische scheiding en de PCR-techniek.

De twee uitvoerende partners in het project, het CLO-DVK en de RUG-LHT, onderzochten respectievelijk de detectie in zuivelproducten en de detectie in vlees - en vleeswaren.

Detectie van Salmonella

Groei van gestresseerde *Salmonella* in verschillende niet-selectieve aanrijkingsmedia.

Tabel: Telling van *Salmonella* in voorverrijkmingsmedia na verschillende incubatietijden

incubateduur	TSB	BPW	UPB
4 u	/	/	/
6 u	/ - 10 ²	/	/
8 u	/ - 10 ³	/ - 10 ³	/ - 10 ³
16 u	10 ⁷ - 10 ⁸	10 ⁷ - 10 ⁸	10 ⁷ - 10 ⁸
20-24 u	10 ⁸ - 10 ⁹	10 ⁸ - 10 ⁹	10 ⁸ - 10 ⁹

/: < 10kve/ml

Slechts na 8 u incubatie van de media worden telbare aantallen *Salmonella* in sommige aanrijkingsmedia waargenomen. Het aantal is echter te laag om een PCR-detectie op uit te voeren. Een deel van de RV-verrijkingen waren positief na 8 u vooraanrijking. Alle isolaties waren positief met RV na een vooraanrijking van 16-24u. Geen effect werd waargenomen van de gebruikte vooraanrijkingsmedia.

Groei van gestresseerde *Salmonella* in verschillende niet-selectieve aanrijkingsmedia in aanwezigheid van vlees en vleesproducten.

Diverse vooraanrijkingsmedia werden gebruikt. Na 16 u en 20 u werd overgeënt op Diassalm. tevens werden de verdunningen 1/100 en 1/1000 van de voorverrijkingen onderzocht met Diassalm. Dit onderzoek werd uitgevoerd op 11 monsters filet american en 6 monsters salami.

Tabel: Isolatie van gestresseerde *Salmonella* uit gelulen in aanwezigheid van vlees

voorverrijking- medium	verdunning	incubatielijd (in uren)	aantal positieve monsters	
			filet american	salami
TSB	-	16	6	4
	1/100		0	2
	1/1000		0	1
	-	20	5	5
	1/100		1	4
	1/1000		0	2
UPB	-	16	6	6
	1/100		1	4
	1/1000		1	1
	-	20	5	6
	1/100		3	5
	1/1000		1	4
BPW	-	16	7	4
	1/100		2	3
	1/1000		1	2
	-	20	6	6
	1/100		3	4
	1/1000		2	4

Met TSB als voorverrijkingmedium werden minder goede resultaten bekomen, zowel wat betreft aantal positieve isolaties als wat betreft aantal aanwezige *Salmonella* in het medium. Ook de pH van het medium na incubatie was lager (in een aantal gevallen <5) dan deze van de ander voorverrijkingmedia. Met BPW en UPB + salami werden alle monsters positief bevonden. In aanwezigheid van vers vlees werden een aantal voorverrijkingen negatief bevonden. Isolaties op verdunningen van vooraanrijkingen wees uit, dat in aanwezigheid van vlees de groei van *Salmonella* in de voorverrijkingen nadelig beïnvloed werd.

Door het vooroplossen van de gelule in 25 ml voorverrijking bij 37°C verhoogde het aantal positieve isolaties in aanwezigheid van vers vlees. Ook het aantal voorverrijkingen met een hoger aantal *Salmonella* steeg.

Tabel: Effect van het vooroplossen van de gelule met gestresseerde *Salmonella* op de isolatie in aanwezigheid van filet american (16 monsters)

Vooroplossen van gelule	Verrijkmings-medium	TBS		BPW		UPB	
		direct	1/100	direct	1/100	direct	1/100
-	RV	5	0	11	4	6	2
+		11	3	11	5	11	4
-	DIA	6	1	7	2	4	2
+		10	5	12	6	10	5

Vooroplossen van de gelule had geen effect op de isolatieresultaten in aanwezigheid van salami.

Snelle detectie van Salmonella spp.

Zuivelproducten

De resultaten werden verwerkt in een publicatie met als titel 'Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy products using immunomagnetic separation and PCR' die werd aanvaard voor publicatie in het 'International Journal of Food Microbiology'. De leden van het consortium werden opgenomen als auteurs van het artikel. Het artikel is bijgevoegd als bijlage bij dit eindverslag.

Samenvatting van de resultaten beschreven in het artikel:

Een snelle detectiemethode voor *Salmonella* in zuivelproducten werd ontwikkeld. Omwille van het feit dat zuivelstalen, natuurlijk besmet met *Salmonella* niet voldoende voor handen waren, werd het onderzoek uitgevoerd d.m.v. kunstmatige besmetting met ongeveer 5,9 gestresseerde *Salmonella* cellen (RIVM, Nederland). Deze *Salmonella* cellen werden toegevoegd aan 25 g van diverse zuivelproducten.

Voor gepasteuriseerd eigeel, eigeelpoeder, ijs, en kaas op basis van gepasteuriseerde melk werd PCR toegepast na 16 u aanrijking in gebufferd peptone water (BPW). Immunomagnetische scheiding (IMS) en een alkalische lysemethode werden gebruikt als staalvoorbereiding. Voor melkpoeder, volledig ei, eiwit en rauwmelkse kaas werd de 16 u aanrijking in BPW gevolgd door IMS en een selectieve aanrijking in Rappaport-Vassiliadis medium voor 4 u. In dit geval werd PCR toegepast op de selectieve aanrijkingcultuur na centrifugatie en alkalische lyse. Voor volledig ei en eiwit werd aan het BPW 20 µg ijzer ammonium citraat of ijzer chloride /ml toegediend.

Voor de PCR werden de primers ST11 en ST15 (Aabo et al., Mol. Cell. Probes, 7: 171-178) gebruikt. Via deze primers wordt een fragment van 429 bp geamplifieerd. Een interne PCR-controle werd ontwikkeld die vermenigvuldigd wordt door middel van dezelfde ST11 en ST15 primers maar resulteert in de amplificatie van een kleiner fragment van 240 bp.

Vleesproducten

- In de eerste plaats werd onderzocht hoeveel *Salmonella* in een voorverrijking nodig waren om te komen tot een positieve isolatie. Daartoe werden geïncubeerde voorverrijkingen met salami en filet american beënt met gekende aantallen *S. panama* (vanuit een 3-voudige verdunningsreeks). Vervolgens werd overgeënt op de verrijkingsmedia. Bij deze proef werd ook het effect van IMS op de detectielimiet van *Salmonella* in voorverrijkingsmedia bestudeerd.

Tabel: Aantal *Salmonella* nodig in voorverrijking om een positieve isolatie te bekomen met en zonder IMS

	salami		filet american	
	BPW	UPB	BPW	UPB
RV	1,96-3,36	2,30-4,47	2,04-3,28	1,92-3,86
IMS + RV	3,36-4,34	3,30-4,34	2,17-3,88	1,92-3,32
DIA	1,96-3,34	1,95-2,25	1,85-3,88	3,23->4,38
IMS + DIA	1,96-2,99	2,15-2,30	2,78-3,86	2,25-3,97

Het aantal *Salmonella*, nodig in de voorverrijking, om een positieve isolatie te bekomen was zeer variërend (10^2 - 10^3). IMS verlaagde in geen geval het aantal *Salmonella* vereist om tot een positief resultaat te komen.

- Detectie van gestresseerde *Salmonella* in aanwezigheid van vlees met de PCR. Twee reeksen monsters werden onderzocht.

Bij de eerste reeks werd PCR uitgevoerd op BPW na filtratie en centrifugatie van 1,5ml filtraat. De neerslag werd opgelost in 100µl SDS/NaOH. Tevens werd IMS uitgevoerd op 2ml BPW. De beads werden opgelost in 40µl. Op 20µl werd PCR uitgevoerd en 20µl werd overgebracht in RV. Na 4u incubatie werd 1ml van de RV gebruikt voor PCR en uitgestreken op XLD.

Tabel: Vergelijking van de conventionele en de korte isolatiemethode (PCR) voor de detectie van gestresseerde *Salmonella* in aanwezigheid van vlees.

Vleessoort	Aantal monsters	Direct op BPW			IMS+4u RV		IMS+24 u RV
		DIA	PCR	IMS-PCR	PCR	XLD	XLD
salami	15	14	15	8	10	13	12
filet american	15	2	10	6	7	8	12

De PCR-resultaten vermeld in bovenstaande tabel werden bekomen bij onderzoek van 1 µl van het DNA-extract opgelost in 100 µl SDS/NaOH. Bij gebruik van 5 µl voor de PCR lag het aantal positieve resultaten veel lager.

Bij de tweede reeks monsters werd naast DIA ook RV gebruikt als aanrijking. Per monster werden 3 x IMS uitgevoerd: 1/ op 2ml voor PCR, 2/ op 2ml voor RV-PCR en 3/ op 1 ml voor RV cultuurmethode. Na IMS werd de PCR uitgevoerd op de ene helft van het extract in 10 µl en de andere helft in 100 µl SDS/NaOH.

Tabel: Vergelijking van de conventionele en de korte isolatiemethode (PCR) voor de detectie van gestresseerde *Salmonella* in aanwezigheid van vlees (reeks 2).

Vleessoort	Aantal monsters	Direct op BPW						IMS+4u RV		IMS+ 24 u RV	
		RV	DIA	PCR	IMS-PCR	PCR	XLD	PCR	XLD		
		100µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl	10µl	100µl		
salami	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
gekookt ham	10	10	10	10	-	-	-	10	-	-	-
filet american	10	8	2	7	5	4	3	8	6	4	10

Gestresseerde *Salmonella* werd voor 100% gedetecteerd met de PCR-techniek. In aanwezigheid van filet american leverde IMS-(RV)-PCR minder positieve resultaten op. PCR na filtratie werden op één uitzondering na het zelfde aantal positieve monsters gevonden als met de RV. Opmerkelijk was evenwel dat met IMS-RV 24 u meer positieve monsters werden gevonden dan met RV.

- Detectie van *Salmonella* in natuurlijk besmette monsters met PCR.

De gebruikte detectieprotocollen en de bekomen resultaten zijn weergegeven in tabel 6. Voor alle protocollen werd uitgegaan vanuit 225 ml BPW met 25 g monster en geïncubeerd gedurende 16 u. PCR werd uitgevoerd op 1 µl van een extractie gemaakt met 10 µl SDS/NaOH.

Tabel: Gebruikte protocollen en resultaten bij de detectie van *Salmonella* uit natuurlijk besmette monsters rood en pluimveevlees

a/ protocol met IMS: 76 monsters

100 µl op DIA	36
100 µl in RV	27
1 ml centrif. en PCR	30
1 ml IMS en PCR	7
100 µl in 0,9ml RV, na 4u PCR	25

2 ml IMS, in 2 ml RV	na 4 u op 1 ml PCR	28
	na 24 u op XLD	34

b/ protocol zonder IMS: 90 monsters

100 µl DIA		40
100 µl RV		24
1 ml centrif. PCR	30 cycli	21
	35 cycli	25
0,2 ml in 1,8 ml RV	na 4 u op 1 ml PCR	
	30 cycli	20
	35 cycli	26
	na 24 u op XLD	41

In totaal werden 41 monsters positief met de protocol met IMS. Bij 2 monsters was de PCR positief (bij 1 monster waren de 4 PCR-onderzoeken positief), maar kon met de gebruikte cultuurmethoden geen *Salmonella* stam geïsoleerd worden. Door een nieuwe PCR uit te voeren met 35 cycli op monsters die negatief met de PCR waren maar positief voor een cultuurmethode werden 4 extra monster positief bevonden. Onmiddellijk uitvoering van een PCR op IMS product gaf slechte resultaten. Om deze reden werden een volgende reeks monsters onderzocht zonder IMS. PCR met 35 cycli leverde betere resultaten op dan PCR met 30 cycli. In beide reeksen viel het lager aantal positieve monsters met RV op. Bij gebruik van kleine volumes RV beënt in een verhouding 1/10 en geïncubeerd in een afgesloten recipient (Eppendorf buisje) verhoogde het aantal positieve resultaten aanzienlijk. Deze resultaten benaderden deze bekomen met DIA.

Pooling van monsters

Zuivel

Voor dit onderzoek werden volgende protocols uitgetest op diverse zuivelproducten:

methode A = 16 u BPW, IMS, 4 u RV, PCR

methode B = 16 u BPW, PCR

XLD 1 = 16 u BPW, 20-24 u RV, XLD, PCR

XLD 2 = 16 u BPW, 44-48 u RV, XLD, PCR

Pooling van melkpoeder

- 5 × 25 g Melkpoeder ingezet in 3 verschillende volumes BPW met 1 ampule

	<u>Meth. A</u>	<u>XLD1</u>	<u>XLD2</u>
1,125 l	zw+	-	-
0,5 l	zw+	-	+

0,25 l - - -

- 6 × (5 × 25 g Melkpoeder ingezet in 500 ml BPW met 1 ampule)

Meth.A	6 × +
XLD1	5 × +
XLD2	5 × +

Het is mogelijk om 125 g melkpoeder te poolen in een totaal volume van 500 ml BPW en te testen via PCR.

Pooling van roomijs

- 5 × (125 g roomijs ingezet in 250 ml BPW met 1 ampule)

Meth. B	4 × zwak +
XLD 1	4 × +

- 3 × (125 g roomijs ingezet in 250/500 ml BPW met 1 ampule)

	<u>Ola</u>		<u>IJsboerke</u>			
	<u>MethB</u>	<u>XLD 1</u>	<u>XLD 2</u>	<u>MethB</u>	<u>XLD 1</u>	<u>XLD 2</u>
500 ml	3+(1zw)	2+	2+	3+(1zw)	3+	3+
250 ml	3+	2+	3+	2+	2+	3+

- 3 × (75 g roomijs ingezet in 250/500 ml BPW met 1 ampule)

	<u>Meth.B</u>	<u>IJsboerke</u>	
		<u>XLD 1</u>	<u>XLD 2</u>
500 ml	3+	2+	3+
250 ml	3+(2zw)	2+	3+

- 3 × (75 g roomijs ingezet in 500 ml BPW met 1 ampule)

	<u>Unic</u>			<u>IJsboerke</u>		
	<u>MethB</u>	<u>XLD 1</u>	<u>XLD 2</u>	<u>MethB</u>	<u>XLD 1</u>	<u>XLD 2</u>
500 ml	3+(3zw)	3+	3+	0+	1+	1+

Pooling van roomijs is niet echt aan te raden, zowel via de snelle PCR-methode als via de conventionele methode.

Pooling van Goudse kaas

- 5 × 25 g Goudse kaas ingezet in 3 verschillende volumes BPW met 2 ampules

<u>Meth. B</u>	<u>XLD1</u>	<u>XLD2</u>
----------------	-------------	-------------

1,125 l	+	+	+
0,5 l	+	-	+
0,25 l	-	-	-

- 3 × (5 × 25 g Goudse kaas ingezet in 500 ml BPW met 1 ampule)

Meth. B	3 × +
XLD 1	3 × +
XLD 2	3 × +

Het is mogelijk om 125 g Goudse kaas te poolen in 500 ml BPW zowel via de snelle PCR-methode als via de conventionele methode.

Poolen van rauwmelkse kaas

- 5 × 25 g rauwmelkse kaas ingezet in 3 verschillende volumes BPW met 1 ampule

	<u>Meth.A</u>	<u>XLD1</u>	<u>XLD2</u>
1,125 l	-	-	-
0,5 l	-	-	-
0,25 l	-	-	-

- 3 × 25 g rauwmelkse kaas ingezet in 3 verschillende volumes BPW met 1 ampule

	<u>Meth. A</u>	<u>XLD1</u>	<u>XLD2</u>
1,125 l	-	-	-
0,5 l	-	-	-
0,25 l	-	-	-

Het is niet mogelijk om rauwmelkse kaas te poolen.

Poolen van eiproduct

- 5 × 25 g eiproduct ingezet in 3 verschillende volumes BPW met 1 ampule

	<u>Meth.B</u>	<u>XLD 1</u>	<u>XLD 2</u>
1,125 l	+	-	-
0,5 l	+	-	-
0,25 l	+	-	-

- 5 × 25 g eiproduct ingezet in 250 ml BPW met 1 ampule

Meth.B	5 × +
--------	-------

XLD1 5 × +
XLD2 5 × +

- 10 × 25 g eiproduct ingezet in 500 ml BPW met 1 ampule

BPW 10 × +
XLD1 10 × +
XLD2 10 × +

Het is mogelijk om tot 250 g eiproduct te poolen in 500 ml BPW zowel via de snelle PCR-methode als via de conventionele methode.

Besluit

Pooling voor de detectie van *Salmonella* is mogelijk voor melkpoeder, Goudse kaas en eiproduct, zowel via de snelle PCR-methode als via de conventionele methode. Voor roomijs en kazen op basis van rauwe melk is pooling niet aan te raden.

Vlees

Voor dit onderzoek werden volgende protocols uitgetest op 125 g product in 250 ml en 500 ml BPW:

- A BPW 16u, DIA
- B BPW 16u, RV
- C BPW 16u, PCR (35 cycli)
- D BPW 16u, 200µl in 1,8 ml RV 4u, PCR
- E BPW 16u, 200µl in 1,8 ml RV 24u, XLD

In het onderzoek werden 8 monsters salami en 10 monsters filet american besmet met gestresseerde *Salmonella* en onderzocht.

	volume BPW	A	B	C	D	E
salami	250 ml	3	4	0	1	7
	500 ml	8	8	6	5	8
filet american	250 ml	1	8	0	2	7
	500 ml	1	9	1	1	7

Om de toegevoegde *Salmonella* te isoleren uit een monster van 125 g diende een volume van 500 ml BPW toegevoegd te worden. Met PCR kon slechts een gedeelte van de positieve monsters *Salmonella* (bij filet american slechts enkele) gedetecteerd worden.

Bij 3 monsters filet american werd naast de gebruikelijke enting van de RV met 100µl ook 10µl uitgetest.

	250ml	500ml
100µl RV	2	2
10µl	0	1

Deze resultaten wijzen erop, dat het aantal *Salmonella* in de BPW-cultuur waarschijnlijk laag is. In dit geval is het aantal *Salmonella* te laag om een PCR-detectie uit te voeren. Er kan dus gesteld worden dat pooling van monsters goede resultaten oplevert met de cultuurmethode, maar niet met de PCR-techniek.

Besluit

Voor de detectie van *Salmonella* in zuivel- en vleesprodukten werd de doelstelling van het project bereikt.

Detectie van *L. monocytogenes*

Deel 1: Aanrijking van *Listeria monocytogenes*

Groei van gestresseerde *L. monocytogenes* in verschillende niet-selectieve en selectieve aanrijkmingsmedia

A/ niet selectieve aanrijkingen

- Hiertoe werd aan de vooraanrijkmingsmedia een capsule met gestresseerde *Listeria monocytogenes* (RIVM, 5 kve/ml) toegevoegd waarna de groei gevolgd werd door middel van uitplating.

Er werd ook uitgetest of het vooroplossen van de capsule in een kleine hoeveelheid voorverwarmd medium, waarbij achteraf de rest van het medium (op kamertemperatuur) werd toegevoegd een positief effect had op de groei.

	<u>zonder vooroplossen</u>	<u>met vooroplossen</u>
TSB 16 uur	67%: 10^5 , 33%: /	66%: 10^5 , 33%: /
20 uur	50%: 10^7 , 33%: 10^6 , 17%: /	66%: 10^8 , 33%: /
BPW 16 uur	17%: 10^5 , 17%: 10^4 , 17%: 10^3 , 49%: /	66%: 10^3 , 33%: 10^4
20 uur	17%: 10^7 , 17%: 10^6 , 66%: /	66%: 10^6 , 33%: 10^5
UPB 16 uur	100%: /	66%: 10^4 , 33%: 10^5
20 uur	33%: 10^5 , 67%: /	66%: 10^7 , 33%: 10^6

OPM. / : geen groei waarneembaar

Zonder vooroplossen waren, afhankelijk van het medium, na 16 en 20 uur incubatie, respectievelijk 30→100% en 15→70% van de stalen negatief. Met vooroplossen was in TSB, na 16 en 20 uur incubatie nog steeds 33% van de stalen negatief. In UPB en BPW was er significante verbetering van de groei waar te nemen wanneer de capsules vooropgelost worden.

Na 20 uur incubatie waren opmerkelijk hogere aantallen aanwezig dan na 16 uur incubatie.

Tabel : Groei van gestresseerde *L. monocytogenes* in voorverrijkingen na vooroplossen van de gelulen (3 bepalingen)

incubatielijd	BPW	UBP
16 u	10^3	10^3-10^4
20	10^5	10^5-10^6
24	10^6-10^7	10^7-10^8

Het aantal *L. monocytogenes* kiemen lag iets lager dan in de voorgaande proef. Verlenging van de incubatie tot 24u laat een aanzienlijke bekomende groei toe.

- Na vooroplossen van de gelulen werd ook de groei bij roerende incubatie gevolgd.

Tabel :Effect van roerende incubatie op de groei van gestresseerde *L. monocytogenes*

incubatie incubatietijd	stationair		roerend	
	BPW	UPB	BPW	UPB
16	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴
20	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶
24	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷

Roerend incuberen gaf geen effect op het aantal bekomen cfu.

- Effect van de toevoeging van Ferrioxamine E aan de aanrijkingsmedia op de groei van *L. monocytogenes*

Tabel : Groei van gestresseerde *L. monocytogenes* in aanrijkingsmedia met Ferrioxamine E

Incubatietijd	ferrioxamine E	BPW	UPB
16 u	-	3,79*	3,79
	+	4,65	4,24
20 u	-	5,21	5,88
	+	6,67	6,49
24 u	-	7,06	7,75
	+	7,98	8,13

* gemiddeld log N/ml van 4 bepalingen

De aanwezigheid van Ferrioxamine E bevorderde de groei van *L. monocytogenes* in beide aanrijkingsmedia.

B/ Selectieve aanrijkingen

- Opvolging van de groei door middel van tellingen. Deze experimenten werden uitgevoerd op identieke wijze als hierboven.

		<u>zonder vooroplossen</u>	<u>met vooroplossen</u>
EB	16 uur	100%: /	100%: /
	20 uur	75%: /, 25%: 40/ml	33%: 10/ml, 67%: /
	24 uur	50%: 10 ² , 50%: /	100%: /
UVM I	16 uur	100%: /	100%: /
	20 uur	25%: 10 ² , 25%: 10/ml, 50%: /	100%: /
	24 uur	67%: 10 ² , 33%: 20/ml	33%: 50/ml, 67%: /
UVM II	16 uur	100%: /	100%: /
	20 uur	100%: /	100%: /
	24 uur	100%: /	100%: /
½ FR	16 uur	100%: /	nb
	20 uur	100%: /	nb
½ FR	16 uur	100%: /	nb
	20 uur	100%: /	nb
OPM.	/	: geen groei waarneembaar	
	nb	: niet bepaald	

De groei van gestresseerde *L. monocytogenes* was opvallend slecht in de selectieve media. Er was geen positief effect waarneembaar bij het vooroplossen van de gelulles.

C/ Combinatie van media

- na 16 uur vooraanrijking in BPW ($4 \times 10^3/\text{ml} \rightarrow 4 \times 10^4/\text{ml}$) werd 1 ml overgeënt in 9 ml aanrijkmiddel (BPW, 1/2 FR, of 1/4 FR), de groei werd dan gevolgd door uitplating

	<u>BPW</u>	<u>1/2 FR</u>	<u>1/4 FR</u>
3 uur	$4 \times 10^3 \rightarrow 4 \times 10^4$	$10^3 \rightarrow 10^4$	$10^3 \rightarrow 10^4$
4 uur	$1,5 \times 10^4$ - n.t.	3×10^3 - 3×10^4	3×10^3 - n.t.
5 uur	n.t.	5×10^3 - n.t.	5×10^3 - n.t.

OPM. n.t. = niet telbaar wegens te hoge aantallen aanwezig op de plaat

Er was geen afsterving van *Listeria* door overenting in selectieve media. De groei kwam het snelst op gang in het niet-selectieve medium (BPW), daarna in het minst selectieve medium (1/4 FR).

- Isolatie van gestresseerde *L. monocytogenes* na korte niet-selectieve aanrijking

Na vooroplossen van de gelule in 20 ml BPW werd 80 ml BPW aan toegevoegd. Volgende protocols werden op deze aanrijking toegepast:

- A na 1u1/2 dubbel geconcentreerde 1/2 FR, OX
 B na 1u1/2 dubbel geconcentreerde 1/2 FR, IMS, FR 5u, OX
 C na 1u1/2 dubbel geconcentreerde 1/2 FR, IMS, FR 24u, OX
 D na 1u1/2 dubbel geconcentreerde 1/2 FR, FR 24u, OX
 A, B, C en D protocols werd ook uitgevoerd na 5u1/2 incubatie van BPW
 Aantal bepalingen: 10

incubatielijd BPW	A	B	C	D
1u1/2	1	5	10	7
5u1/2	4	9	10	10

Betere resultaten werden bekomen na 5u1/2 aanrijking in BPW. Het gebruik van IMS na dergelijke incubatietijd gaf geen effect na gebruik van FR.

- Isolatie van gestresseerde *L. monocytogenes* na vooroplossen van gelule in selectieve aanrijking

Hiertoe werd een eerste aanrijking gedurende 24u bij 30°C uitgevoerd in 1/2 Frazer. Vervolgens werd 0,1ml van deze cultuur overgeënt op Frazer. Na 24 u bij 37°C werd uitgestreken op het selectief agarplaat Oxford. Geen enkele van de 10 geteste gelulen werden positief bevonden. Dit resultaat wees aan, dat isolatie van dergelijke gestresseerde *L. monocytogenes* stammen in selectieve aanrijkmiddelen zoals voorgeschreven door de Afnor-methode, niet mogelijk was.

Groei van gestresseerde L. monocytogenes in verschillende niet-selectieve en selectieve aanrijkmiddelen in aanwezigheid van voedingsmiddelen.

A/ In het eerste aanrijkmiddel

Hiertoe werd aan het vooraanrijkmiddel een capsule met gestresseerde *L. monocytogenes* én 25 g voedingsmiddel toegevoegd. De capsules werden opgelost in een kleine hoeveelheid voorverwarmd medium waarna achteraf het homogenaat van voedingsmiddel en medium (op kamertemperatuur) toegevoegd werd. Als media werd gebruik gemaakt van BPW, TSB, UPB en 1/2 FR. Daarna werd na 16 uur en na 20 uur incubatie, 100 µl geënt op het selectieve medium Oxford. De presumptieve *Listeria* kolonies werden bevestigd met PCR.

Goudse kaas

Wanneer 100 µl van het aanrijkmiddel werd uitgeplaat, werd in slechts 20% van de gevallen *Listeria* teruggevonden na incubatie in UPB of BPW.

Wanneer 1 ml van de vooraanrijking werd uitgeplaat waren 30→60% van de stalen positief. BPW gaf een beter resultaat dan UPB of 1/2 FR.

Rauwmelkse kaas

Wanneer 1 ml van de vooraanrijking werd uitgeplaat was slechts 0-10% van de stalen positief. Ook hier gaf BPW een iets beter resultaat dan UPB of 1/2 FR.

B/ In een combinatie van vooraanrijking en aanrijking

Met Goudse kaas

Hiertoe werd aan het vooraanrijkmiddel (BPW) een capsule met gestresseerde *Listeria monocytogenes* en 25 g Goudse kaas toegevoegd.

- Na 16 uur vooraanrijking in BPW (1/3 positief) werd 1 ml overgeënt in 9 ml aanrijkmiddel (BPW, 1/2 FR of 1/4 FR), de groei werd dan gevolgd door uitplating en de kolonies bevestigd door PCR. Na 3, 4 en 5 uur aanrijking werd voor alle media in 30% van de gevallen *Listeria* teruggevonden. Het brengt dus niet op om na vooraanrijking een korte aanrijking (3-5 uur) in te voegen aangezien ook in de oorspronkelijke vooraanrijkingen 30% positief bevonden werd.
- Na 16 uur vooraanrijking in BPW (1/3 positief) werd een gelijk volume dubbel geconcentreerd aanrijkmiddel (1/2 FR of FR) toegevoegd. De groei werd dan gevolgd door uitplating en de kolonies bevestigd door PCR. Na 3, 4 en 5 uur aanrijking werd voor alle media in 30% van de gevallen *Listeria* teruggevonden. Het vermijden van de 10 × verdunning (door overenting) brengt dus niets op.
- Na 16 uur vooraanrijking in BPW (1/3 positief) werd IMS uitgevoerd op 1 ml vooraanrijking. De gewassen pellet werd opgelost in 2 ml 1/2 FR en verder geïncubeerd. Tevens werd van de vooraanrijking 0,1 ml en 1 ml overgeënt in 9,9 ml en 9 ml 1/2 FR respectievelijk. De groei werd dan gevolgd door uitplating en de kolonies bevestigd door PCR. Na 3 uur aanrijking werden 80% van de stalen waarop IMS werd toegepast tussen vooraanrijking en aanrijking positief bevonden. De aantallen varieerden van 20/ml tot 10²/ml. De stalen waar geen IMS werd toegepast werden allen negatief bevonden.
- Na 16 uur vooraanrijking in BPW (1/3 positief) werd IMS uitgevoerd op 1 ml vooraanrijking. De gewassen pellet werd opgelost in 2 ml 1/2 FR en verder geïncubeerd bij 30°C, 35°C en 37°C. De groei werd dan gevolgd door uitplating en de kolonies bevestigd door PCR. Na 3 uur aanrijking werden 100% van de stalen dewelke geïncubeerd werden bij 30°C positief bevonden. Er waren 10² *Listeria*/ml aanwezig. Bij een incubatietemperatuur van 35°C en 37°C waren 70% van de stalen positief. De aantallen waren echter niet hoog genoeg om PCR-detectie toe te laten.
- Na 16 uur vooraanrijking in BPW (1/3 positief) werd IMS uitgevoerd op 1 ml vooraanrijking. De gewassen pellet werd opgelost in 2 ml 1/2 FR en verder geïncubeerd bij 30°C. De groei werd dan gevolgd door uitplating en de kolonies bevestigd door PCR. Na 5 uur en 24 uur aanrijking werden 100% van de stalen positief gevonden in aantallen van 10³/ml en ≥10⁴/ml respectievelijk. Een aanrijking van 24 uur zou dus PCR-detectie moeten toelaten.
- Om de invloed te testen van de hoeveelheid kaas die wordt ingezet, werd 10 maal 25 g en 10 maal 2,5 g rauwmelkse kaas ingezet in 225 ml medium (1/2 FR voor 24 u - FR voor 3 u en 19 u - Oxford uitplating voor 48 u). Na 3 u FR werden voor beide entingen geen positieve platen bekomen. Na 19 u FR werden voor de enting van 25 g 1 positief staal en voor de enting van 2,5 g 2 positieve stalen bekomen.

Met vleesproducten

In dit onderzoek werden volgende isolatieprotocollen gebruikt:

De gelules met gestresseerde *L. monocytogenes* werden steeds vooroplost bij 37°C gedurende 30 min en vervolgens toegevoegd aan het homogenaat op kamertemperatuur

A°	1/2 FR 24u, 0,1 ml in 10 ml FR 24u, OX
A	16u BPW, 0,1 ml in 10 ml 1/2 FR 24u, OX
A'	A + 0,1ml in FR 24 u, OX
B	16u BPW, 10 ml in 90 ml 1/2 FR 24u, OX
B'	B + 0,1ml in FR 24 u, OX
C	16u BPW, 0,1 ml in 10 ml FR 24u, OX

Tevens werd een korte aanrijking (1u1/2 en 5u1/2) in 100 ml BPW uitgetest

Na incubatie werd dubbelgeconcentreerd FR toegevoegd. Volgende enting werden hierop uitgevoerd:

a	OX
b	IMS, FR 5u, OX
c	IMS, FR 24u, OX
d	FR, OX

Gekookte ham

- Gebruikmakend van protocol A° werden 5 op de 10 onderzochte monsters positief bevonden.

- Vijf monsters voorverpakte gekookte ham (met laag en hoge aantal bacteriën) werden onderzocht met de protocollen A, B en C. Alle monsters werden met de verschillende methoden positief bevonden. Met methoden A en B waren de monsters reeds positief na 1/2 FR.

- verkorte aanrijking leverde volgende resultaten op (8 monsters)

incubatietijd BPW	a	b	c	d
1u1/2	0	0	4	2
5u1/2	0	0	4	2

Verkorting van de niet-selectieve verminderde het aantal positieve isolaties

Salami

- Gebruikmakend van protocol A° werden 2 op de 12 onderzochte monsters positief bevonden.

- Twee monsters salami werden onderzocht met de protocollen A, B en C. De aanrijking BPW werd niet alleen overgeënt na 16 u maar ook na 20 u en 24 u. Tevens werd UPB gebruikt als aanrijkmiddel.

Incubatielijd in uren	UPB			BPW		
	A	B	C	A	B	C
16	1	1	0	0	0	0
20	1	1	0	1	1	0
24	1	0	0	0	0	0

- Drie monsters salami werden onderzocht met de protocols A, A', B, B' en C.

Incubatielijd in uren	UPB					BPW				
	A	A'	B	B'	C	A	A'	B	B'	C
16	0	0	1	2	0	0	0	2	3	0
20	0	0	1	1	0	1	1	0	3	0
24	1	1	0	1	0	2	2	0	2	1

Deze protocols gaven geen goede resultaten. Alleen met protocol B' werden alle monsters positief bevonden. Dit protocol neemt echter 3 dagen in beslag. Binnen het kader van het project was dit dan ook geen bruikbaar protocol.

- Ferrioxamine E bleek de groei van *L. monocytogenes* te stimuleren. Voorgaande proef werd herhaald. Aanrijkingsmedia met en zonder Ferrioxamine E werden aangewend. In dit onderzoek werden 5 monsters opgenomen.

Incubatie in uren	Ferrio- xamine E	BPW					UPB				
		A	A'	B	B'	C	A	A'	B	B'	C
16	-	1	1	3	3	0	1	2	1	2	1
	+	1	1	3	3	1	1	2	0	2	2
20	-	1	1	1	3	0	0	0	0	2	0
	+	1	1	2	3	1	1	2	2	2	1
24	-	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
	+	0	1	2	2	0	2	2	2	3	2

Toevoeging van Ferrioxamine E verhoogde het aantal positieve isolaties. Toch werd met geen enkel protocol een voldoende aantal positieve resultaten bekomen om verder onderzoek mee uit te voeren.

- verkorte aanrijking leverde volgende resultaten op (16 monsters)

incubatielijd BPW	a	b	c	d
1u1/2	0	0	5	2
5u1/2	0	1	3	3

Verkorting van de aanrijking gaf een duidelijke negatieve invloed op de isolatieresultaten. Geen invloed van de incubatielijd werd waargenomen.

- Wegens het lage aantal positieve resultaten met hoger gebruikte protocols werden een aantal varianten op deze protocols uitgetest.

- D 16u BPW met en zonder Ferrioxamine E, 10 ml in 90 ml BPW 24u, OX
- E 16u BPW met en zonder Ferrioxamine E, 10 ml in 90 ml 1/4 FR 24u, OX
- F 16u BPW met en zonder Ferrioxamine E, 10 ml in 90 ml 1/2 FR 24u, OX
- G 16u BPW met en zonder Ferrioxamine E, 100 ml in 100 ml (dubbel geconcentreerd) 1/2 FR 24u, OX
- H 16u BPW met en zonder Ferrioxamine E, 100 ml in 100 ml (dubbel geconcentreerd) 1/4 FR 24u, OX
- G1 2,5g in 225 ml BPW met en zonder Ferrioxamine E, 100 ml in 100 ml (dubbel geconcentreerd) 1/2 FR 24u, OX
- H1 2,5g in 225 ml BPW met en zonder Ferrioxamine E, 100 ml in 100 ml (dubbel geconcentreerd) 1/4 FR 24u, OX
- G' 25 ml van homogenaat 1/10 in BPW met en zonder Ferrioxamine E 16u, 100 ml in 100 ml (dubbel geconcentreerd) 1/2 FR 24u, OX
- H' 25 ml van homogenaat 1/10 in BPW met en zonder Ferrioxamine E 16u, 100 ml in 100 ml (dubbel geconcentreerd) 1/4 FR 24u, OX
- I 16u BPW, IMS op 2 ml, op OX en 1 ml 1/2 FR, OX na 5 en 24 u
- I' 16u BPW, 10 ml in 10ml (dubbel geconcentreerd) 1/2 FR, OX na 5 en 24 u
- J 25 ml van homogenaat 1/10 in BPW, IMS op 2 ml, op OX en 1 ml 1/2 FR, OX na 5 en 24 u
- J' 25 ml van homogenaat 1/10 in BPW, OX en 10 ml in 10ml (dubbel geconcentreerd) 1/2 FR, OX na 5 en 24 u

* Zeven monsters werden onderzocht met de protocols D, E en F. Het aantal *L. monocytogenes* op OX was voor alle protocols met uitzondering van 1 monster laag ($<10^4$ /ml aanrijkmiddel) of werden geen verdachte kolonies waargenomen. Toevoeging van Ferrioxamine E verhoogde het aantal *L. monocytogenes* cellen in de aanrijkingen niet.

* Vijf monsters werden onderzocht met de protocols G en H. Dezelfde resultaten werden bekomen als in de voorgaande proef: lage aantallen werden waargenomen.

* Geen verbetering van de opbrengst werd bekomen bij het gebruik van de protocols G1 en H1 op 2 monsters.

* Vijf monsters werden onderzocht met de protocols G' en H'. Duidelijke betere groei van de toegevoegde gestresseerde *L. monocytogenes* stammen werd waargenomen. Reeds na 16u BPW werden aantallen tot 10/ml medium aangetroffen. Na 5u 1/2 en 1/4 FR werd reeds een groei met een factor van ongeveer 10 vastgesteld. Na 24u was het aantal op OX bij 4 monsters niet meer te tellen. Ferrioxamine E had geen positief effect op de vastgesteld groei.

* Veertien monsters werden onderzocht met de protocols I, I', J en J'.

protocol	aantal positieve monsters		
	0 u 1/2 FR	5u 1/2 FR	24 u 1/2 FR
I	1	0	4
I'	0	0	0
J	7	3	13
J'	4	6	10

Reductie van de hoeveelheid salami toegevoegd aan BPW geeft een duidelijk positief effect op het aantal positieve isolaties. Goede resultaten werden slechts bekomen na 24 u aanrijking in 1/2 FR. Met IMS werden meer monsters positief (13 op 14 onderzochte monsters) bevonden.

Isolatie van L. monocytogenes uit natuurlijk besmet vers vlees en vleesproducten.

Vers vlees en verhitte vleesproducten werden onderzocht met de volgende protocols:

1. 25 g monster in 1/2 FR 24u, FR 24u, OX
2. 25 g monster in 225 ml BPW met Ferrioxamine 16 u, OX en FR (dubbel geconcentreerd), OX na 5 en 24 u
3. 2,5 g monster in 225 ml BPW met Ferrioxamine 16 u, OX en FR (dubbel geconcentreerd), OX na 5 en 24 u

Biochemisch negatieve OX platen werden met PCR onderzocht.

	1	2		3			
		direct	na 5 u	na 24 u	direct	na 5u	24 u
gehakt vlees	17	0	5	8	5	8	10
verhitte vleesproducten	6	3	5	4	3	5	5

Bij gebruik van een niet-selectieve aanrijking werden minder natuurlijk besmette monsters positief bevonden dan na directe aanrijking in de selectieve aanrijking. Het gebruik van een niet selectieve aanrijking is dan ook niet aangewezen.

CONCLUSIE DEEL 1:

- Gestresseerde *Listeria* groeien in het algemeen zeer slecht en dit vooral in de aanwezigheid van voedingsmiddelen (voedselcomponenten én competitieve nevenflora).
- Een vooraanrijking in BPW van 16 uur, eventueel gevolgd door IMS en een aanrijking van 24 uur in 1/2 FR lijkt noodzakelijk om gestresseerde *Listeria* te detecteren in voedingsmiddelen gebruik makend van PCR. Een aanrijksperiode tussen 5 en 24 uur is omwille van praktische redenen onmogelijk, omdat de meeste labo's gesloten zijn tussen 18 uur 's avonds en 8 uur 's morgens.
- Er werd geen duidelijk positief effect waargenomen van een verlaging van het entingspercentage dat normaal 25 g in 225 ml medium bedraagt.

Deel 2: Optimalisatie van de PCR

A/ Zuivelproducten

Hiertoe werd een *Listeria*-negatief voedingsmiddel (Goudse kaas of rauwmelkse kaas) 16 uur aangerijkt in BPW. In dit aanrijktingsmedium werd een verdunning van *Listeria monocytogenes* aangelegd. Gebruik makend van de meest optimale staalvoorbereiding uit deel 1 kon de gevoeligheid van de PCR geoptimaliseerd worden door verschillende PCR-reactiemengsels te vergelijken.

Een standaard PCR-mengsel (50 µl) dat gebruikt werd wanneer NaOH en SDS gebruikt werden in de staalvoorbereiding bestond uit: 50 pmol van elke primer, 1,5 eenheden AmpliTaq DNA-polymerase, 1 × PCR-buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, pH 8,3), 200 µM dNTP, 0,01% gelatine en 0,5% Tween-20

- Een verdubbeling van de primerhoeveelheid van 50 pmol naar 100 pmol gaf een beter resultaat.
- Wanneer 5 µl van de bereiding in de PCR gebruikt werd, gaf dit een beter resultaat dan wanneer 1 µl gebruikt werd. Dit was enkel zo voor de staalvoorbereiding gebaseerd op filtratie, hier werd in plaats van 1/100 van het lysaat, 1/20 van het lysaat in de PCR gebruikt. Voor de staalvoorbereidingen gebaseerd op IMS of IMS en filtratie werd in plaats van 1/10, _ van het lysaat in de PCR gebracht.
- In de aanwezigheid van 5 µl van de bereiding in de PCR was 0,3%→0,5% Tween-20 en 0,006→0,01% gelatine optimaal.
- Een verhoging van de hoeveelheid AmpliTaq DNA-polymerase van 1,5 naar 2,5 eenheden gaf een verbetering van het resultaat.
- Beide uitgeteste primerkoppels; LM1/LM2 (Border *et al*, 1990, Lett. Appl. Microbiol. 11, 158-162) en LIS-P1/LIS-P4 (Innogenetics, Zwijnaarde) gaven hetzelfde resultaat.

Het standaard PCR-programma omvatte:

- een initiële denaturatie bij 95°C van 1 minuut
- 30 cycli bestaande uit: 15 s denaturatie bij 95°C, 15 s annealing bij 50°C, en 30 s elongatie bij 72°C
- een finale elongatie van 8 minuten bij 72°C
- De verlenging van de annealingtijd en de denaturatietijd hadden geen effect op de gevoeligheid van de PCR.
- De verhoging van het aantal cycli leidde tot contaminatie problemen.
- Er werd op zuivere cultuur geen verbetering vastgesteld bij het gebruik van Ampli Taq Gold i.p.v. Ampli Taq.

B/ Vleesproducten

- Het standaard PCR-protocol ontwikkeld voor zuivelproducten werd toegepast op verrijkingen met salami. Zowel na 16u BPW als op FR na 4u werden de primers LM1/LM2 meerdere bandjes na elektroforese van het PCR-product bekomen. Verlaging van de concentratie van $MgCl_2$ van 5 μl (2,5 mM) tot 3 μl (1,5 mM) werden nog diverse bandjes (maar minder) waargenomen.

- Verhoging van de annealingstemperatuur van 50 tot 55°C verminderde het aantal bandjes na PCR op het DNA-extract vanuit BPW na filtratie zonder de gevoelig van de methode te verlagen. Verdere verhoging van de temperatuur tot 60°C voorkwam bandjes, maar verlaagde de gevoeligheid van de test met een factor 10 (van 10^4 tot $10^5/ml$ verrijking).

- Met de primers LL5/LL6 werd bij een annealingstemperatuur van 56°C minder bandjes gevonden dan met de primers LM1/LM2. Verlaging van het gehalte aan $MgCl_2$ tot 2 μl (1mM) veroorzaakte geen bandjes meer, maar leidde tevens tot een negatief resultaat met LL5/LL6 voor de positieve controle PCR.

Bij een temperatuur van 57°C werden geen bandjes met LL5/LL6 meer waargenomen.

De gevoeligheid met de primers LL5/LL6 was beduidend lager dan met de primers LM1/LM2.

Conclusies Deel 2

Voor zuivelproducten kon een bruikbaar standaardprotocol voor de PCR voor het opsporen van *L. monocytogenes* uit een BPW-aanrijking met voedingsmiddel opgesteld worden, gebruikmakend van de primers LM1/LM2.

Voor vleesproducten zijn deze primers niet bruikbaar wegens de vorming van meerdere bandjes (door aspecifieke reacties tijdens de PCR). Door de lage gevoeligheid van de andere geteste primers LL5/LL6 zijn deze niet geschikt om verder in het onderzoek te gebruiken.

Deel 3: Staalvoorbereiding voor de PCR

Hiertoe werd een *Listeria*-negatief voedingsmiddel (Goudse kaas of rauwmelkse kaas) 16 uur aangerijkt in BPW. In dit aanrijkingsmedium werd een verdunning van een reïncultuur van *Listeria monocytogenes* aangelegd. Op deze manier kon de theoretische gevoeligheid van de staalvoorbereiding uitgetest worden. Naast de theoretische gevoeligheid werd ook de gevoeligheid op positieve stalen vergeleken.

Verskillende protocols gebaseerd op filtratie en immunomagnetische separatie (IMS) werden vergeleken.

Staalvoorbereiding gebaseerd op IMS

- Op 1 ml aanrijkingsmedium werd IMS toegepast waarna het gewassen pellet opgelost werd in 50 μl H_2O . Deze celsuspensie werd 10 minuten gekookt en 5 μl van dit lysaat werd gebruikt in de PCR. Alle verdunningen waren negatief.
- Op 1 ml aanrijkingsmedium werd IMS toegepast waarna het gewassen pellet opgelost werd in 10 μl H_2O . Deze celsuspensie werd 10 minuten gekookt en het volledige lysaat werd gebruikt in de PCR. Alle verdunningen waren negatief.
- Op 1 ml aanrijkingsmedium werd IMS toegepast waarna het gewassen pellet opgelost werd in 10 μl H_2O . Deze celsuspensie werd aangengend met 90 μl NaOH/SDS tot een eindconcentratie van 0,05 M NaOH en 0,125% SDS. Deze celsuspensie werd 17 minuten bij 90°C geplaatst en 1 μl van het lysaat werd gebruikt in de PCR. De hoogste verdunningen waarvoor een positief resultaat bekomen werd waren 10^{-2} en 10^{-3} voor Brie en Gouda respectievelijk.
- Op 1 ml aanrijkingsmedium werd IMS toegepast waarna het gewassen pellet opgelost werd in 10 μl 0,05 M NaOH, 0,125% SDS. Deze celsuspensie werd 17 minuten bij 90°C geplaatst en 1 μl of 5 μl van het lysaat werd gebruikt in de PCR. De hoogste verdunning waarvoor een positief resultaat bekomen werd was 10^{-3} voor Gouda, zowel voor 1 μl als voor 5 μl in de PCR. Met de geoptimaliseerde PCR-reactie werd deze gevoeligheid verhoogd tot 10^{-4} á 10^{-5} .

Staalvoorbereiding gebaseerd op filtratie

- Het aanrijkingsmedium werd gefiltreerd door een Whatman nr 4 filter waarna 2 ml van filtraat gecentrifugeerd werd. Het gewassen pellet werd opgelost in 100 μl 0,05 M NaOH, 0,125% SDS. Deze celsuspensie werd 17 minuten bij 90°C geplaatst en 1 μl van het lysaat werd gebruikt in de PCR. De hoogste verdunning waarvoor een positief resultaat bekomen werd was 10^{-3} á 10^{-4} voor Gouda. Met de geoptimaliseerde PCR-reactie werd deze gevoeligheid verhoogd tot 10^{-5} .

Staalvoorbereiding gebaseerd op IMS en filtratie

- Het aanrijkingsmedium werd gefiltreerd door een Whatman nr 4 filter waarna op 1 ml van filtraat IMS toegepast werd. Het gewassen pellet werd opgelost in 10 μl 0,05 M NaOH, 0,125% SDS. Deze celsuspensie werd 17 minuten bij 90°C geplaatst en 5 μl van het lysaat werd gebruikt in de PCR. Deze combinatie van IMS en filtratie gaf soms een beter resultaat dan IMS alleen of filtratie alleen maar soms was het resultaat ook slechter.

Vergelijking IMS en filtratie als staalvoorbereiding

- IMS en filtratie werden vergeleken op positieve stalen die gedurende lange tijd bewaard werden bij -20°C. Er werden meer positieve resultaten bekomen via IMS dan na filtratie.

CONCLUSIE DEEL 3:

Voor zuivelproducten is de staalvoorbereiding gebaseerd op filtratie het goedkoopst en het snelst en biedt een theoretische gevoeligheid evenwaardig aan de andere methodes. De theoretische gevoeligheid bedraagt ongeveer 10^4 - 10^5 kve/ml in een aanrijking van Goudse kaas. Dit protocol lijkt daardoor het meest aangewezen voor gebruik voor de detectie van *Listeria* in voedingsmiddelen. Bij een vergelijking van beide methodes op positieve stalen die lange tijd werden bewaard bij -20°C werden echter betere resultaten bekomen met IMS dan met filtratie. Daarom werden beide methodes weerhouden voor verdere evaluatie.