

**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 aanrijkingsmedia.</i>	10
<i>Groei van gestresseerde Salmonella in verschillende niet-selectieve aanrijkingsmedia 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 eiproduct	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 aanrijkingsmedia.....	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 aanrijkingsmedia in aanwezigheid van voedingsmiddelen.....	23
A/ In het eerste aanrijkingsmedium.....	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 detectieprotocollen 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
Consumptie-ijs zonder Ferrioxamine E	41
Consumptie-ijs met Ferrioxamine E	41
Goudse kaas zonder Ferrioxamine E	41
Goudse kaas met Ferrioxamine E	42
Rauwmelkse kaas	42
Besluit	42
4. BESLUITEN EN AANBEVELINGEN	43
BESLUITEN MET BETREKKING TOT HET GEVOERDE ONDERZOEK	43
Detectie van <i>Salmonella</i> in zuivelproducten, vlees en vleesproducten	43
Detectie van <i>Listeria monocytogenes</i> in zuivelproducten, vlees en vleesproducten	44
Gezamenlijke methode voor detectie van <i>Listeria monocytogenes</i> en <i>Salmonella</i>	44
AANBEVELINGEN	44
5. SYNTHESE VAN HET ONDERZOEK	46
SITUERING EN DOELSTELLING	46
RESULTATEN EN CONCLUSIE	47
Detectie van <i>Salmonella</i>	47
Detectie van <i>Listeria monocytogenes</i>	48
6. BIJLAGEN	50
REFERENTIELIJST	50
LIJST VAN PUBLICATIES VOORTVLOEIEND UIT HET ONDERZOEK	50
GEDETAILEERDE RESULTATEN	51
Artikel, aanvaard voor publicatie in 'International Journal of Food Microbiology'	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 gesuspenseerd in 100 µl H₂O. Na centrifugatie (5 minuten - 12000 × g) werd het bacterieel pellet gesuspenseerd 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 gesuspenseerd in 100 µl H₂O. Na centrifugatie (5 minuten - 12000 × g) werd het bacterieel pellet gesuspenseerd 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 kweekmethodes, 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 voorverrijkingsmedia 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

Meth. B XLD1 XLD2

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 aanrijkmiddelen

A/ niet selectieve aanrijkingen

- Hiertoe werd aan de vooraanrijkmiddelen 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 aanrijdingsmedium) 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 aanrijkingsmedium 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 electroforese 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 aanrijksmedium 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.

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

Staalvoorbereiding gebaseerd op IMS

- Op 1 ml aanrijksmedium 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 aanrijksmedium 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 aanrijksmedium werd IMS toegepast waarna het gewassen pellet opgelost werd in 10 μl H_2O . Deze celsuspensie werd aangelengd 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 aanrijksmedium 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 aanrijksmedium 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 aanrijksmedium 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.

Deel 4: Evaluatie van een aantal detectieprotocollen voor *L. monocytogenes* in kaas

Op basis van bovenvermelde resultaten werden de volgende detectieprotocollen voor *L. monocytogenes* in kaas opgesteld:

- A 16 u BPW, 20-24 u _ FR, IMS, PCR
- AI 16 u BPW, IMS, 20-24 u _ FR, PCR
- B 5 u BPW, 20-24 u _ FR, 20-24 u FR, IMS, PCR
- BI 5 u BPW, 20-24 u _ FR, IMS, 20-24 u FR, PCR
- C 16 u _ FR, 20-24 u FR, IMS, PCR
- CI 16 u _ FR, IMS, 20-24 u FR, PCR
- A* 16 u BPW, 20-24 u _ FR, PCR
- B* 5 u BPW, 20-24 u _ FR, 20-24 u FR, PCR
- C* 16 u _ FR, 20-24 u FR, PCR
- D 2 u BPW, 20-24 u _ FR, 20-24 u FR, IMS, PCR

Deze protocollen werden geëvalueerd voor detectie in rauwmelkse kazen en in kazen op basis van gepasteuriseerde melk.

DETECTIE VAN L. MONOCYTOGENES IN NATUURLIJK GECONTAMINEERDE KAZEN UIT DE HANDEL

Er werden 23 halfharde en en zachte kazen uit de handel ingezet met methodes AI, CI, A*, en C*. De kazen omvatten zowel kazen op basis van gepasteuriseerde melk als kazen op basis van rauwe melk. De resultaten bekomen via de PCR op het aanrijkingsmedium werden vergeleken met deze bekomen via PCR-bevestiging van de kolonies, gegroeid op Oxford platen na 48u incubatie.

Methode	Aantal	Oxford-PCR		Aanrijking-PCR	
		Positief	Negatief	Positief	Negatief
AI	23	6	17	3	20
A*	23	6	17	8	15
CI	23	7	16	1	22
C*	23	8	15	2	21

Om de aanrijkingprotocollen met elkaar te vergelijken werden 41 halfharde en zacht kazen ingezet met methodes AI, BI, CI, A*, B* en C*. De resultaten werden vergeleken op basis van de groei op Oxford platen na 48u incubatie en de bevestiging van de kolonies via PCR (soort bevestiging via LiPA (Innogenetics)).

Methode	Aantal	Oxford-PCR-LiPA	
		Positief-soort	Negatief
AI	41	1: <i>L. monocytogenes</i>	39
A*	41	1: <i>L. innocua</i>	40
BI	41	1: <i>L. monocytogenes</i>	37
B*	41	3: <i>L. innocua</i>	39
CI	41	2: <i>L. innocua</i>	39
C*	41	2: <i>L. innocua</i>	39

- De resultaten uit deze testen toonden geen duidelijk verschil aan in efficiëntie tussen de verschillende methodes.
- Voor de detectie via PCR op de aanrijkingscultuur was er een iets hogere gevoeligheid bij de methodes waar een niet selectieve vooraanrijking was inbegrepen.

DETECTIE VAN *L. MONOCYTOGENES* IN KAZEN KUNSTMATIG GECONTAMINEERD MET *L. MONOCYTOGENES* CELLEN

Kunstmatische contaminatie van kazen op basis van gepasteuriseerde melk met 5 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen

Kazen van gepasteuriseerde melk werden gecontamineerd met capsules die ongeveer 5 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen bevatten. De resultaten van de vergelijkende analyse van de detectiemethodes worden in onderstaande tabel samengevat.

Methode	Aantal	Oxford-PCR		Aanrijking-PCR	
		Positief	Negatief	Positief	Negatief
A	21	12	9	10	11
AI	21	9	12	6	15
B	6	5	1	5	1
BI	6	2	4	2	4
C	21	1	20	1	20
CI	21	1	20	0	21

Het is duidelijk dat de gestresseerde cellen veel beter groeiden bij een niet selectieve vooraanrijking. Dit is niet verwonderlijk bij kazen op basis van gepasteuriseerde melk omdat hier de achtergrondflora beperkt is. Het gebruik van IMS tussen de vooraanrijking en de aanrijking leverde duidelijk minder goede resultaten dan het gebruik van IMS als staalvoorbereiding voor de PCR. Uit de goede resultaten van methode B blijkt dat een korte vooraanrijking volstaat voor de recuperatie van de gestresseerde cellen.

Kunstmatige contaminatie van kazen op basis van rauwe melk met 5 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen

Rauwmelkse kazen werden gecontamineerd met capsules die ongeveer 5 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen bevatten. De resultaten van de vergelijkende analyse van de detectiemethodes worden in onderstaande tabel samengevat.

Methode	Aantal	Oxford-PCR		Aanrijking-PCR	
		Positief	Negatief	Positief	Negatief
A	24	1	23	2	22
AI	28	1	27	1	27
B	14	0	14	1	13
BI	14	0	14	0	14
C	24	1	23	1	23
CI	24	0	24	0	24
A*	14	0	14	2	12
B*	14	0	14	1	14
C*	14	0	14	0	14
D	15	1	14	1	14

- De aanrijking van 5 gestresseerde *L. monocytogenes* cellen was bijna onmogelijk in rauwmelkse kazen.
- De verschillen tussen de verschillende methodes waren niet uitgesproken. Iets betere resultaten werden bekomen met een vooraanrijking in niet selectief medium en een detectie via PCR op het aanrijkmingsmedium. Het toepassen van IMS tussen de 2 aanrijkingstappen was iets minder positief.

Kunstmatige contaminatie van kazen op basis van rauwe melk met 5000 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen

Rauwmelkse kazen werden gecontamineerd met capsules die ongeveer 5000 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen bevatten. De resultaten van de vergelijkende analyse van de detectiemethodes worden in onderstaande tabel samengevat.

Methode	Aantal	Oxford-PCR		Aanrijking-PCR	
		Positief	Negatief	Positief	Negatief
A	4	3	1	3	1
AI	4	3	1	3	1
B	4	3	1	3	1
BI	4	3	1	3	1
C	4	4	0	3	1(±)
CI	4	3	1	3	1

Kazen gebaseerd op gepasteuriseerde melk werden eveneens geënt met 5000 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen. In dit geval waren alle kazen voor alle methodes positief.

- Het is mogelijk om 5000 kve gestresseerde *L. monocytogenes* te detecteren in rauwmelkse kazen.

- Er werd geen duidelijk verschil in efficiëntie vastgesteld tussen de verschillende methodes.
- De detectie via PCR op het aanrijksmedium is even gevoelig als de detectie op Oxford platen na 48 u incubatie.

Kunstmatige contaminatie van kazen op basis van rauwe melk met 5-10 niet gestresseerde *L. monocytogenes* cellen

Omdat 5 kve gestresseerde *L. monocytogenes* cellen met een zeer lage efficiëntie uit rauwmelkse zachte kazen kunnen geïsoleerd worden, werd ook getest in hoever een klein aantal niet gestresseerde *L. monocytogenes* cellen in deze kazen kunnen worden opgespoord. Hiervoor werd 100 µl van een 10⁻⁷ verdunning van een verse *L. monocytogenes* cultuur toegevoegd aan de gehomogeniseerde kaas vóór incubatie. Het aantal toegevoegde cellen varieerde van 5 tot 10 kve.

Methode	Aantal	Oxford-PCR	
		Positief-soort	Negatief
A	12	10	2
AI	12	6	6
B	12	12	0
BI	12	12	0
C	12	11	1
CI	12	11	1

De beste resultaten werden bekomen met de methodes B en BI. Dit is ook het langste aanrijksprotocol en omvat naast een korte niet selectieve vooraanrijing (5 u), een twee steps selectieve aanrijking van telkens 1 dag.

Conclusie deel 4

- De detectie in rauwmelkse kaas van gestresseerde *L. monocytogenes* cellen in lage aantallen (5 kve) is nagenoeg onmogelijk met de uitgeteste protocols. Hogere aantallen gestresseerde cellen (5000 kve) kunnen wel worden gedetecteerd. Dit gebeurt met ongeveer dezelfde efficiëntie via de verschillende protocols die werden getest. Voor de detectie van niet gestresseerde cellen in rauwmelkse kaas zijn eveneens de verschillende methodes vergelijkbaar in efficiëntie. Er is een lichte voorkeur voor het langste aanrijksprotocol.
- De detectie van 5 gestresseerde *L. monocytogenes* kve in kaas op basis van gepasteuriseerde melk gaat duidelijk efficiënter als een niet selectieve vooraanrijing wordt toegepast.
- Voor de detectie van *L. monocytogenes* in natuurlijk besmette kazen (op basis van gepasteuriseerde melk en op basis van rauwe melk) zijn de verschillende methodes vergelijkbaar met een geringe voorkeur voor de protocols met een niet selectieve vooraanrijing.
- De detectie via PCR op de aanrijkscultuur geeft een bevredigende gevoeligheid, vergelijkbaar met de gevoeligheid verkregen na uitplating op selectieve bodem.

- Het gebruik van IMS om *L. monocytogenes* cellen geconcentreerd te enten in het volgend aanrijksmedium levert dezelfde of zelfs een geringere gevoeligheid t.o.v. het gebruik van IMS als staalvoorbereiding voor de PCR.

Deel 5: Snelle detectie van *L. monocytogenes* uit natuurlijk besmette vleesproducten met PCR

1/ In samenwerking met de Universiteit van Luik werd een commerciële PCR kit (Probelia van Sanofi) uitgetest voor de detectie van *L. monocytogenes* uit voedingsmiddelen. In het laboratorium LHT werden het onderzoek op gehakt vlees uitgevoerd.

De resultaten van dit onderzoek werden voorgesteld op het 2^o Congrès de Microbiologie te Luik op 11 en 12 september 1997.

Samenvatting van de methoden en resultaten op gehakt vlees beschreven in de poster:

L. monocytogenes werd opgespoord met de Afnor methode. Verdachte kolonies op OX werden biochemisch bevestigd. Een aantal OX platen werden ook bevestigd met PCR (primers LM1/LM2). Geïncubeerde 1/2FR en FR culturen werden onderzocht met Probelia. Tevens werd een FR ingezet voor de Vidas detectiemethode.

Met Probelia PCR werden beduidend meer positieve monsters bekomen na FR dan na 1/2 FR. Slechts bij enkele van deze PCR positieve monsters kon ook *L. monocytogenes* stammen geïsoleerd worden (wel aanwezigheid van andere *Listeria*). Gebruikmakend van de PCR bleek, dat er op de OX platen van de meeste van de geteste monsters *L. monocytogenes* aanwezig waren. Uit deze resultaten kon volgende geconcludeerd worden:

1/ Met de gebruikte PCR-kit worden meer positieve monsters gevonden

2/ De meeste van deze positieve monsters konden niet bevestigd worden met de cultuurmethode. Op basis van deze resultaten werden met de PCR-kit veel vals-positieve resultaten bekomen.

3/ Op veel OX platen zijn met de PCR-bevestigingstechniek *L. monocytogenes* aanwezig. Dit wees op een overgroeien van *L. monocytogenes* door andere *Listeria* op OX platen. Anderzijds werden de meeste positieve monsters met de PCR-kit bevestigd.

2/ Snelle detectie van *L. monocytogenes* uit vlees en vleesproducten, gebruikmakend van de primers LIS-P6/LIS-P7 en LIPA detectie (Innogenetics)

Diverse soorten vleesmonsters werd onderzocht met de Afnor methode. PCR werd uitgevoerd op 2 ml 1/2 FR en FR na filtratie met hogervermelde primers volgens de instructies van de fabrikant. Tevens werden de beide aanrijkingsmedia uitgestreken op ALOA platen (*L. monocytogenes* vormen typische kolonies op dit milieu). Typische kolonies op ALOA werden onderworpen aan een Camp-test.

	aantal onderzochte monsters	1/2 FR OX	ALOA	PCR	FR OX	ALOA	PCR
vleesemulsie voor kookworst	20	4	11	3	4	19	13
gehakt	23	2	6	5	6	8	7
salami en droge worst	35	6	10	8	8	12	12

Conclusie Deel 5:

Met PCR (commerciële kit en PCR-methode van Innogenetics) is het mogelijk om versneld *L. monocytogenes* uit vlees en vleesproducten op te sporen. De PCR-methode van Innogenetics leverde na 24 u aanrijking bijna evenveel positieve monsters als de Afnormmethode. Een verdere aanrijking in FR gedurende 24u leverde een aanzienlijk aantal extra positieve monsters op. Alle positieve PCR-resultaten werden bevestigd met het nieuwe selectief medium. Met dit medium werd monsters positief bevonden, die negatief waren met PCR.

Algemeen besluit

Het is mogelijk om de conventionele detectieprocedure voor *L. monocytogenes* te verkorten tot 2 dagen met behoud van dezelfde gevoeligheid. Hiervoor wordt *L. monocytogenes* gedetecteerd via PCR.

Het dient echter opgemerkt dat geen enkele van de uitgeteste aanrijgingsprotocols die ook in de conventionele procedures worden gebruikt in staat is om kleine aantallen gestresseerde *L. monocytogenes* cellen op te sporen in rauwmelkse kaas.

Resultaten i.v.m. de gezamenlijke aanrijking van *Salmonella* en *L. monocytogenes* in zuivelproducten

Hiertoe werd aan het vooraanrijkmiddel (BPW) een capsule met gestresseerde *S. panama*, een capsule met gestresseerde *L. monocytogenes* én 25 g voedingsmiddel toegevoegd. Daarna werd na 16 uur en na 20 uur vooraanrijking, 0,1 ml geënt op het semi-soliede selectieve medium Diassalm en op selectieve Oxford platen. Presumptieve *Salmonella* en *Listeria* kolonies werden bevestigd d.m.v. PCR. Tevens werd PCR uitgevoerd op het vooraanrijkmiddel gebruik makend van de staalvoorbereiding en PCR-condities beschreven hierboven.

Deze experimenten werden uitgevoerd in aan- en afwezigheid van Ferrioxamine E (50 ng/ml BPW) in het vooraanrijkmiddel. Ferrioxamine E bevordert de groei van bepaalde *Enterobacteriaceae* zoals bijvoorbeeld *Salmonella* en *Yersinia*.

Consumptie-ijs zonder Ferrioxamine E

Na 16 en 20 uur incubatie werden, noch door uitplating, noch door PCR *Listeria* teruggevonden. *Salmonella* werd daarentegen teruggevonden in 60% en 80% van de stalen na respectievelijk 16 en 20 uur incubatie zowel door uitplating als door PCR.

Wanneer enkel gestresseerde *Listeria* werden aangerijkt in aanwezigheid van ijsroom werd ook geen *Listeria* teruggevonden na 16 of 20 uur incubatie. De afwezigheid van *Listeria* kan dus niet verklaard worden door het inhiberend effect van de groei van *Salmonella*.

Consumptie-ijs met Ferrioxamine E

Listeria werd door uitplating slechts teruggevonden in 30% van de stalen in aantallen <100/ml. Als gevolg van deze lage aantallen werd gebruik makend van PCR geen *Listeria* teruggevonden. *Salmonella* werd na 16 uur in 100% van de gevallen teruggevonden zowel door uitplating als met PCR. Na 20 uur incubatie werden door uitplating en PCR, respectievelijk 100% en 60% van de stalen positief bevonden. Deze betere resultaten door PCR-detectie, kunnen verklaard worden door het overgroeïende effect van de nevenflora op de selectieve platen bij lange incubatie.

Goudse kaas zonder Ferrioxamine E

1^o experiment

Listeria werd slechts in 40% van de gevallen teruggevonden in aantallen <10³. Deze aantallen laten geen PCR-detectie toe.

Salmonella werd teruggevonden in 80-100% van de gevallen. Slechts in 60% van de gevallen waren de aantallen ≥10⁴ en gebruik makend van de PCR vonden we dan ook in 60% van de gevallen *Salmonella*.

2^o experiment

Listeria werd slechts teruggevonden in 30% van de stalen na 16 en 20 uur aanrijking, zowel door uitplating als door PCR. Als vergelijking werden aan dezelfde kaas ook enkel gestresseerde *Listeria* toegevoegd. In dit geval werden door uitplating 60% en 90% van de stalen positief bevonden na 16 en 20 uur incubatie respectievelijk. Gebruik makend van PCR werden geen *Listeria* teruggevonden. Dit is te verklaren door de lage aantallen (<100/ml) *Listeria* aanwezig na incubatie.

Salmonella werd in 30% van de stalen teruggevonden, zowel door uitplating als door PCR. Het aantal *Salmonella* in de positieve stalen was $\geq 10^4$ /ml.

Goudse kaas met Ferrioxamine E

Listeria werd in 0% en 100% van de gevallen teruggevonden door uitplating na respectievelijk 16 en 20 uur incubatie. Gebruik makend van PCR werden geen *Listeria* teruggevonden. Dit is te verklaren door de lage aantallen (<100/ml) aanwezig na 20 uur aanrijking. Wanneer enkel *Listeria* wordt aangerijkt worden dezelfde resultaten bekomen. De zeer trage groei van *Listeria* is dus niet te verklaren door het inhiberend effect van de groei van *Salmonella*.

Salmonella werd na 16 en 20 uur incubatie in 100% van de gevallen teruggevonden en dit zowel door uitplating als door PCR. *Salmonella* was aanwezig in aantallen $\geq 10^4$ /ml.

Rauwmelkse kaas

In dit geval werden geen gestresseerde *Listeria* toegevoegd omdat de kans vrij groot was dat de gebruikte kaas natuurlijk gecontamineerd was.

De gebruikte rauwmelkse kaas bleek niet natuurlijk gecontamineerd te zijn. Na 16 uur en 20 uur incubatie werden geen *Listeria* of *Salmonella* gedetecteerd.

Besluit

Omdat gestresseerde *Listeria monocytogenes* zeer traag groeien in aanwezigheid van voedingsmiddel (voedingscomponenten én nevenflora) volstaan de aantallen die bereikt worden na 16 of 20 uur vooraanrijking niet om PCR-detectie toe te laten. Het is bijgevolg niet mogelijk om simultaan op een efficiënte wijze *Salmonella* en *L. monocytogenes* op te sporen.

4. Besluiten en aanbevelingen

Besluiten mbt het gevoerde onderzoek

Detectie van *Salmonella* in zuivelproducten, vlees en vleesproducten

1. Gestresseerde *Salmonella* cellen vertonen een snelle groei in niet-selectieve aanrijkingen. In aanwezigheid van voedingsproducten treedt een daling in de groei op die soms zeer aanzienlijk is. Dit geeft aanleiding tot negatieve isolatieresultaten, vooral bij gebruik van vers vlees (filet american).
2. De beweeglijkheid van gestresseerde *Salmonella* op het semisolid selectief medium Diassalm wordt duidelijk negatief beïnvloed door de aanwezigheid van vers vlees in de niet-selectieve aanrijking.
3. Een 20 tot 24 uur methode werd ontwikkeld voor de detectie van *Salmonella* in voedingsproducten. De bekomen resultaten waren vergelijkbaar met deze bekomen met de klassieke cultuurmethode.

Het gebruikte protocol voor zuivelmonsters:

Voor gepasteuriseerd eigeel, eigeelpoeder, ijs, en kaas op basis van gepasteuriseerde melk wordt 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 wordt de 16 u aanrijking in BPW gevolgd door IMS en een selectieve aanrijking in Rappaport-Vassiliadis medium voor 4 u. In dit geval wordt PCR toegepast op de selectieve aanrijkingcultuur na centrifugatie en alkalische lyse. Voor volledig ei en eiwit wordt aan het BPW 20 µg ijzer ammonium citraat of ijzer chloride /ml toegediend.

Het gebruikte protocol voor vlees en vleesproducten:

Aanrijking in BPW gedurende 16 u, filtratie en centrifugatie van de 1,5 ml cultuur, alkalische lyse van de neerslag en PCR (35 cycli) op 1 µl van het lysaat.

4. De validatie van de snelle methode werd uitgevoerd met behulp van kunstmatige besmetting met gestresseerde *Salmonella* cellen (referentiecapsules, RIVM, Nederland). Voor vleesproducten werd de methode ook gevalideerd op natuurlijk besmette monsters.
5. Omdat PCR gevoelig is voor inhiberende componenten is het belangrijk vals negatieve reacties uit te sluiten. Het voorkomen van vals negatieve reacties kan gecontroleerd worden door het mee vermenigvuldigen van een positief controle DNA. Dit controle DNA kan samen met het doelwit in 1 reactie worden vermenigvuldigd of als afzonderlijke reactie worden ingezet. Uit onze resultaten is gebleken dat het gemeenschappelijk vermenigvuldigen van controle DNA en doelwit perfect kan werken op zuiver DNA maar dat het systeem uit balans kan geraken als het wordt toegepast op sommige voedingsmonsters. Een belangrijke oplossing voor de PCR-inhibitie is een ruime aandacht aan een goede staalvoorbereiding die de inhiberende componenten verwijdert.
6. De resultaten i.v.m. zuivel 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.

7. Onderzoek op gepoolde monsters voor het opsporen van gestresseerde *Salmonella* in vlees en vleesproducten is mogelijk met de cultuurmethode, echter niet met de ontwikkelde PCR-methode.

Pooling voor de detectie van *Salmonella* in zuivelproducten 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

Detectie van *Listeria monocytogenes* in zuivelproducten, vlees en vleesproducten

1. Gestresseerde *L. monocytogenes* vertonen een tragere groei in niet-selectieve media dan gestresseerde *Salmonella* cellen. In aanwezigheid van gekookte vleesproducten is een incubatietijd van 16 u in een niet-selectief medium noodzakelijk om goede resultaten te bekomen. In aanwezigheid van gefermenteerde vleesproducten dient ook het gewicht aan product in de aanrijking met een factor 10 te worden verminderd.
2. Er werden verschillende combinaties van niet-selectieve en selectieve aanrijkingmethoden uitgetest voor diverse voedingsproducten. Geen enkele van de uitgeteste protocols waren in staat om kleine aantallen gestresseerde *L. monocytogenes* cellen te detecteren in rauwmelkse kazen en verse vleesmonsters. Deze weinig gevoelige detectie werd geconstateerd zowel bij de conventionele methodes als bij de snelle PCR-gebaseerde methodes. Onderzoek van natuurlijk besmette vleesmonsters toonde aan dat een niet-selectieve vooraanrijking het aantal positieve monsters verminderde. Dit was vooral het geval voor monsters vers vlees.
3. Het is mogelijk om de conventionele detectieprocedure voor *L. monocytogenes* tot 2 dagen te verkorten met behoud van dezelfde gevoeligheid. Hiervoor wordt *L. monocytogenes* gedetecteerd via PCR.
4. Omwille van de trage groei van *L. monocytogenes* was het niet nuttig om onderzoek uit te voeren naar de pooling van monsters.

Gezamenlijke methode voor detectie van *Listeria monocytogenes* en *Salmonella*

Omdat gestresseerde *Listeria monocytogenes* zeer traag groeien in aanwezigheid van voedingsmiddel (voedingscomponenten én nevenflora) volstaan de aantallen die bereikt worden na 16 of 20 uur vooraanrijking niet om PCR-detectie toe te laten. Het is bijgevolg niet mogelijk om simultaan op een efficiënte wijze *Salmonella* en *L. monocytogenes* op te sporen.

Aanbevelingen

1. Het is noodzakelijk om snelle detectiemethodes voor pathogenen te valideren op een brede waaier aan voedingsproducten met verschillende achtergrondflora (bv. verschil tussen rauwmelkse kaas en kaas op basis van gepasteuriseerde melk).
2. Gestresseerde *Salmonella* cellen zijn een bruikbaar instrument om snelle methodes te valideren voor voedingsmiddelen met een lage natuurlijke besmettingsgraad. Voor bepaalde voedingsmiddelen met een complexe achtergrondflora (vers vlees, rauwmelkse kaas) is een validatie op natuurlijk besmette monsters aan te raden.

3. Het gebruik van gestresseerde *L. monocytogenes* cellen heeft de beperkingen aangetoond van alle gangbare methodes, inclusief de conventionele.
4. Men dient voorzichtig om te springen met PCR-methodes waar meer dan 35 temperatuurcycli worden toegepast. De hoge gevoeligheid die hierdoor wordt bereikt kan zeer vlug leiden tot vals positieve reacties t.g.v. contaminatie.
5. Het voorkomen van vals negatieve reacties kan gecontroleerd worden door het mee vermenigvuldigen van een positief controle DNA. Dit controle DNA kan samen met het doelwit in 1 reactie worden vermenigvuldigd of als afzonderlijke reactie worden ingezet. Bij co-amplificatie met het doelwit DNA dient rekening gehouden te worden met de mogelijkheid van competitie, die frequent optreedt bij de analyse van voedingsmonsters. Een belangrijke oplossing voor de PCR-inhibitie is een ruime aandacht aan een goede staalvoorbereiding die de inhiberende componenten verwijdert.

5. Synthese van het onderzoek

Situering en doelstelling

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. 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. 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 diepgevroren gehakt vlees (K.B. van 1/12/1969, B.S. van 23/1/1970). 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 Italië, Zweden en Finland. Voor het onderzoek op *Listeria monocytogenes* bestaat op internationaal vlak geen aanvaarde ISO-methode. 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 voor *Salmonella* en *L. monocytogenes*.

Het consortium omvatte 2 laboratoria, het CLO-DVK (Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Departement voor de Kwaliteit van de Dierlijke Producten) en de RUG (Vakgroep Diergeneeskundig Toezicht op Eetwaren, labo: Hygiëne en Technologie) en 2 adviserende privé-bedrijven, Micro-Smedt en NV Innogenetics S.A.. Daarnaast werd een begeleidingscomité samengesteld met vertegenwoordigers uit de verschillende betrokken sectoren.

De doelstelling van het project was het ontwikkelen van snelle detectiemethodes voor *Salmonella* spp. en *L. monocytogenes* in zuivel - en vleesproducten, gebruikt voor menselijke consumptie. Er werd gestreefd naar een routine methode waarbij de gevoeligheid en specificiteit van de conventionele methodes werd behouden. Hiertoe werd gebruik gemaakt van de recente technologieën in de microbiologie, zoals de immunomagnetische scheiding en de PCR-techniek. Met deze methoden was het mogelijk een aantal stappen in de conventionele detectiemethoden te verkorten of weg te laten. Tevens werd aandacht besteed aan de mogelijkheid om beide

pathogenen in éénzelfde medium aan te rijken. Het effect van 'pooling' (samen aanreiken) van monsters op de efficiëntie van de methoden werd onderzocht.

Resultaten en conclusie

Detectie van *Salmonella*

De klassieke detectieprocedure voor *Salmonella* omvat een niet-selectieve vooraanrijking, een selectieve aanrijking in 2 verschillende media, een isolatie op 2 verschillende vaste selectieve bodems en een identificatie op basis van biochemische en serologische eigenschappen. Snelle methodes verkorten enerzijds de identificatie en anderzijds de gehele detectieprocedure door het verkorten van de aanrijking.

Gestresseerde *Salmonella* cellen vertonen een snelle groei in niet-selectieve aanrijkingen. In aanwezigheid van voedingsproducten treedt een daling in de groei op die soms zeer aanzienlijk is. Dit geeft aanleiding tot negatieve isolatieresultaten, vooral bij gebruik van vers vlees (filet american). Ook de beweeglijkheid van gestresseerde *Salmonella* op het semisolid selectief medium Diassalm wordt duidelijk negatief beïnvloed door de aanwezigheid van vers vlees in de niet-selectieve aanrijking.

Een snelle detectiemethode voor *Salmonella* in voedingsproducten werd ontwikkeld. Omwille van het feit dat zuivelstalen, natuurlijk besmet met *Salmonella* niet voldoende voor handen waren, werd het onderzoek uitsluitend 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 vleesproducten werd de methode ook gevalideerd op natuurlijk besmette monsters.

Voor gepasteuriseerd eigeel, eigeelpoeder, ijs, en kaas op basis van gepasteuriseerde melk wordt 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 wordt de 16 u aanrijking in BPW gevolgd door IMS en een selectieve aanrijking in Rappaport-Vassiliadis medium voor 4 u. In dit geval wordt PCR toegepast op de selectieve aanrijkingcultuur na centrifugatie en alkalische lyse. Voor volledig ei en eiwit wordt aan het BPW 20 µg ijzer ammonium citraat of ijzer chloride /ml toegediend.

Het ontwikkelde protocol voor vlees en vleesproducten omvat een aanrijking in BPW gedurende 16 u, filtratie en centrifugatie van de 1,5 ml cultuur, alkalische lyse van de neerslag en PCR (35 cycli) op 1 µl van het lysaat.

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 geamplificeerd. 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. Dit controle DNA kan samen met het doelwit in 1 reactie worden vermenigvuldigd of als afzonderlijke reactie worden ingezet. Uit onze resultaten is gebleken dat het gemeenschappelijk vermenigvuldigen van controle DNA en doelwit perfect kan werken op zuiver DNA maar dat het systeem uit balans kan geraken als het wordt toegepast op sommige voedingsmonsters.

Het poolen van monsters voor het opsporen van gestresseerde *Salmonella* in vlees en vleesproducten is mogelijk met de cultuurmethode, echter niet met de ontwikkelde PCR-methode. Pooling voor de detectie van *Salmonella* in zuivelproducten is mogelijk voor melkpoeder, Goudse

kaas en eiprodukt, 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

De resultaten i.v.m. de snelle detectiemethode voor *Salmonella* in zuivelproducten werden verwerkt in een publicatie met als titel 'Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in egg and 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.

Detectie van *Listeria monocytogenes*

Er bestaat geen eensgezindheid over een standaardmethode voor de detectie van *L. monocytogenes* levensmiddelen. Door de 'International Dairy Federation' werd een voorlopige standaardmethode uitgeschreven voor de detectie in zuivelproducten (IDF, 143, 1990). Deze detectiemethode is gebaseerd op een selectieve aanrijking in vloeibaar medium (48u) gevolgd door een selectieve groei op een agarmedium (48u). De verdachte kolonies worden conventioneel bevestigd. Door ISO werd een horizontale methode voorgesteld die essentieel een variëte is van de FSIS-USDA methode. In plaats van de één-staps aanrijking van 48u stelt ISO een twee-staps aanrijking voor met een voor-aanrijking (24u) gevolgd door een selectieve aanrijking (24-48u). Beide methodes gebruiken ook een verschillend aanrijkingsmedium. Bij de detectie van *L. monocytogenes* in voedingsproducten is het van belang dat gestresseerde cellen kunnen recupereren. Dit verloopt gunstiger in niet-selectieve media. Anderzijds wordt de groei van *L. monocytogenes* sterk onderdrukt door de groei van achtergrondflora. Deze groei wordt in min of meerdere mate onderdrukt door selectieve agentia.

Gestresseerde *L. monocytogenes* vertonen een tragere groei in niet-selectieve media dan gestresseerde *Salmonella* cellen. In aanwezigheid van gekookte vleesproducten is een incubatietijd van 16 u in een niet-selectief medium noodzakelijk om goede resultaten te bekomen. In aanwezigheid van gefermenteerde vleesproducten dient ook het gewicht aan product in de aanrijking met een factor 10 te worden verminderd.

Voor de detectie van *L. monocytogenes* in voedingsproducten werden 2 groepen van protocols uitgetest: de groep met een niet-selectieve vooraanrijkingsstap en de groep waar rechtstreeks in selectieve media werd aangerijkt. De *L. monocytogenes* cellen werden gedetecteerd in de aanrijkingscultuur met PCR. IMS werd toegepast tussen de verschillende aanrijkingsstappen of voor de PCR.

De methodes werden uitgetest op natuurlijk gecontamineerde kazen en vleesmonsters uit de handel en op kazen en vleesmonsters geënt met een gemiddelde van 5 en 5000 gestresseerde *L. monocytogenes* cellen (RIVM, Nederland). Er werd een lage besmettingsgraad vastgesteld bij kazen uit de handel (14% bij risico-kazen).

De detectie in rauwmelkse kaas van gestresseerde *L. monocytogenes* cellen in lage aantallen (5 kve) is nagenoeg onmogelijk met de uitgeteste protocols. Hogere aantallen gestresseerde cellen (5000 kve) kunnen wel worden gedetecteerd. Dit gebeurt met ongeveer dezelfde efficiëntie via de verschillende protocols die werden getest. Voor de detectie van niet gestresseerde cellen in rauwmelkse kaas zijn eveneens de verschillende methodes vergelijkbaar in efficiëntie. Er is een lichte voorkeur voor het langste aanrijkingsprotocol.

De detectie van 5 gestresseerde *L. monocytogenes* kve in kaas op basis van gepasteuriseerde melk gaat duidelijk efficiënter als een niet selectieve vooraanrijking wordt toegepast.

Voor de detectie van *L. monocytogenes* in natuurlijk besmette kazen (op basis van gepasteuriseerde melk en op basis van rauwe melk) zijn de verschillende methodes vergelijkbaar met een geringe voorkeur voor de protocols met een niet selectieve vooraanrijking. Deze weinig gevoelige detectie werd geconstateerd zowel bij de conventionele methodes als bij de snelle PCR-gebaseerde methodes.

Lage aantallen gestresseerde *L. monocytogenes* cellen (5 kve) kunnen goed geïsoleerd worden uit vleesproducten mits een niet selectieve aanrijking. Bij salami moet de hoeveelheid monster met een factor 10 worden gereduceerd. Evenwel heeft het onderzoek van natuurlijk besmette vleesmonsters aangetoond aan dat een niet-selectieve vooraanrijking het aantal positieve monsters verminderde. Dit was vooral het geval voor monsters vers vlees.

De detectie via PCR op de aanrijkingcultuur geeft een bevredigende gevoeligheid, vergelijkbaar met de gevoeligheid verkregen na uitplating op selectieve bodem.

Het gebruik van IMS om *L. monocytogenes* cellen geconcentreerd te enten in het volgend aanrijkingmedium levert dezelfde of zelfs een geringere gevoeligheid t.o.v. het gebruik van IMS als staalvoorbereiding voor de PCR.

Uit het onderzoek op natuurlijk besmette monsters kan besloten worden dat het mogelijk is om de conventionele detectieprocedure voor *L. monocytogenes* te verkorten tot 2 dagen met behoud van minstens dezelfde gevoeligheid. Hiervoor wordt *L. monocytogenes* gedetecteerd via PCR.

Het dient echter opgemerkt dat geen enkele van de uitgeteste aanrijkingprotocols die ook in de conventionele procedures worden gebruikt in staat is om kleine aantallen gestresseerde *L. monocytogenes* cellen op te sporen in rauwmelkse kaas en vers vlees.

Omwille van de trage groei van *L. monocytogenes* was het niet nuttig om onderzoek uit te voeren naar de pooling van monsters.

Omdat gestresseerde *Listeria monocytogenes* zeer traag groeien in aanwezigheid van voedingsmiddel (voedingscomponenten én nevenflora) volstaan de aantallen die bereikt worden na 16 of 20 uur vooraanrijking niet om PCR-detectie toe te laten. Het is bijgevolg niet mogelijk om simultaan op een efficiënte wijze *Salmonella* en *L. monocytogenes* op te sporen.

6. Bijlagen

Referentielijst

- Aabo, S., Andersen, J. K., and Olsen, J. E. (1995) Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method. Lett. Appl. Microbiol. 21, 180-182.
- Border, P. M., Howard J. J., Plastow G. S., and Planer C. (1990) Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 11, 158-162
- in 't Veld, P. H., Notermans S. H. W. and van de Berg M. (1995) Potential use of microbiological reference materials for the evaluation of detection methods for a collaborative study. Food Microbiol. 12, 125-134

Lijst van publicaties voortvloeiend uit het onderzoek

- Rijpens N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, De Smedt J, De Zutter L. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy products using immunomagnetic separation and PCR. Int. J. Food Microbiol., in press
- De Zutter L. Herman L., Daube G. Evaluation of the Probelia kit and the Vidas LMO for the detection of *L. monocytogenes* in food products' Poster op het Congrès de Microbiologie, 11-12 September 1997, Liège
- De Zutter L., Rijpens N., De Smedt J., Rossau R., Herman L. 'Growth of stressed *Salmonella* in different pre-enrichment brothes in the presence of different types of foods' Poster op het symposium '*Salmonella* and salmonellosis', 20-22 Mei 1997, Ploufragan, Frankrijk
- Herman L., Rijpens N., De Ridder H., Waes G. 'De ontwikkeling van snelle, specifieke en gevoelige identificatie- en detectiemethodes voor *Listeria monocytogenes*', Poster op de Tweede Meningsuitwisselingsdag over Dierlijke Producties: De Zuivelketen 22 januari 1997, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux
- Herman L. 'Snelle methoden voor het opsporen van pathogenen en ongewenste sporenvormers', op 22 oktober te Melle op de studiedag van het Rijkszuivelstation, Kwaliteit en veiligheid van zuivelproducten

Gedetailleerde resultaten

Artikel, aanvaard voor publicatie in 'International Journal of Food Microbiology'

Rapid detection of stressed Salmonella spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR

Nancy Rijpens ^{a*}, Lieve Herman ^a, Freia Vereecken ^a, Geert Jannes ^b, Jef De Smedt ^c, and Lieven De Zutter ^d

a Agricultural Research Centre, DVK, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle, Belgium, b Innogenetics N.V., Industriepark Zwijnaarde 7, B-9052 Gent, Belgium, c Micro-Smedt, Atealaan 17, B-2200 Herentals, Belgium, d Department of Veterinary Food Inspection and Public Health, University of Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

Abstract

The rapid detection of an average of 5.9 stressed Salmonella cells in 25 g of food product using immunomagnetic separation (IMS) and PCR is described. For pasteurised egg yolk, egg yolk powder, ice-cream, whole egg, egg white, and cheeses made from pasteurised milk PCR was applied after 16 h of preenrichment in BPW using IMS and alkaline lysis as sample preparation method. For whole egg and egg white the BPW was supplemented with iron. For milkpowder, and raw milk cheeses, the 16 h preenrichment in BPW was followed by IMS and a 4 h enrichment in Rappaport-Vassiliadis broth. In the latter case PCR was applied on the enrichment medium after centrifugation, and alkaline lysis. For PCR the primers ST11 and ST15 (Aabo et al., 1993) producing a fragment of 429 bp were used. An internal PCR control was designed to be co-amplified with the target DNA using the same primers but producing a smaller fragment of 240 bp.

Key words: Salmonella, PCR, IMS, dairy products

1. Introduction

Salmonella continues to be one of the major causes of food poisoning in the Western world.

Conventional bacteriological methods for the detection of Salmonella in food, such as the ISO 6579 standard method, are time-consuming and labour intensive. They are mostly based on a preenrichment in a non-selective medium, enrichment in different selective media, selective plating, and subsequent biochemical and serological confirmation. These methods take an average of 4 and 6 days to be completed for negative and positive samples, respectively.

Techniques as the polymerase chain reaction (PCR) and immunomagnetic separation (IMS) have been suggested to shorten conventional methods. Different PCR assays for Salmonella have been described to be used as an identification method on pure cultures or selective agar plates (Aabo et al., 1993), or directly on the (pre)enrichment medium (Fluit et al. 1993, Bej et al., 1994, Soumet et al., 1994, Mahon et al., 1994, Aabo et al. 1995, Cohen et al., 1996, Kwang et al., 1996, Chen et al., 1997, Soumet et al., 1997) or the food sample itself (Cano et al., 1993, Lin et al., 1996). Also three PCR-based commercial systems are available; "Probelia™ Salmonella sp." of Sanofi Pasteur, the "Taqman™ Salmonella PCR Amplification Detection Kit" of Perkin Elmer, and "BAX™ for Screening/Salmonella" of Qualicon. For all three kits it is suggested that PCR is performed on the preenrichment medium after 16 to 20 hours of incubation.

IMS has been used successfully by some authors to replace enrichment in selective media (Mansfield and Forsythe, 1993 and 1996, Coleman et al., 1995a, Dziadkowiec et al., 1995). Other authors found a decrease in the number of positive samples when enrichment was replaced by IMS (Coleman et al., 1995b, Ripabelli et al., 1997). On the other hand Coleman et al. (1995b), and Cudjoe et al. (1997) did find an increase in the number of positive samples when IMS was applied in between preenrichment, and selective enrichment.

Some of the PCR-based short methods described for the detection of Salmonella in food, were evaluated on artificially contaminated food, using dilutions of pure Salmonella cultures (Soumet et al., 1994, Kwang et al., 1996). Because salmonellae present in food are not in the same vital condition as they are in pure laboratory cultures the sensitivities of these methods are often overestimated. Since the incidence of Salmonella in certain food products as dairy products is low, it is almost impossible to evaluate detection methods for Salmonella in these food products on naturally contaminated samples. Chen et al. (1997) evaluated a method based on an overnight preenrichment in BPW, PCR, and hybridisation on 65 raw milk samples, and found only one Salmonella-positive raw milk sample.

In this paper we present a 20-24 hour method based on PCR, and IMS for the detection of Salmonella in different dairy products. The method was evaluated using commercially available reference material containing an average of 5.9 stressed S. panama or S. typhimurium per capsule (in 't Veld et al., 1996). The reference material is prepared at the RIVM (The Netherlands) by spray drying of a mixture of Salmonella suspension and pasteurised full fat milk, and subsequent mixing of the highly contaminated milk powder with sterile milk powder. As a consequence of this spray drying process the Salmonella can be considered as stressed. To our knowledge this is the first study in which a PCR-based detection method for Salmonella is evaluated on different dairy products using stressed Salmonella cells.

For PCR the primers described by Aabo et al. (1993), deduced from a cryptic, 2.3 kilobase DNA-fragment were used, producing an amplicon of 429 bp. The sequence of this amplicon was

determined and an internal PCR control was designed to be co-amplified with the target DNA using the same primers but producing a smaller fragment of 240 bp.

2. Materials and methods

2.1. Strains

The used strains Salmonella typhimurium ALM 40 and Salmonella panama ALM 41 were obtained as reference material from the RIVM, Bilthoven, The Netherlands. The S. typhimurium and S. panama capsules are commercially available as certified reference material and reference material, respectively. Salmonella enteritidis LMG 10395 used for the construction of an internal control for PCR was obtained from the LMG Culture Collection of the Laboratory of Microbiology, Gent, Belgium.

2.2. Comparison of different preenrichment media

One reference capsule containing an average of 5.9 S. panama cells was added to 250 ml of either buffered peptone water (BPW) (Oxoid Ltd., London, England), tryptic soy broth (TSB) (Oxoid), or universal preenrichment medium (UPM) (Difco Laboratories, Detroit, MA, USA) and incubated at 37°C.

After 4, 6, 8, 16, 20, and 24 hours of incubation ten-fold dilutions of the preenrichment media were plated on tryptic soy agar (TSA) (Oxoid) and xylose lysine desoxycholate agar (XLD) (Oxoid). Growth was followed by counting the colonies on TSA and XLD.

For comparison of the different preenrichment media in the presence of food, 25 g of ice-cream, cheese, or milkpowder was added before incubation. After 16 and 20 hours of incubation 0.1 ml of preenrichment broth was transferred to 9.9 ml of Rappaport-Vassiliadis broth (RV) (Oxoid) and to diagnostic semi-solid Salmonella agar (Diassalm) (LaB M, Bury, England). After 20 hours of incubation these media were streaked onto XLD. Presumptive Salmonella colonies were confirmed using PCR as described in section 2.4.

2.3. Conventional Salmonella detection

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 2 min in 200 ml of BPW, added to the dissolved reference capsule, and subsequently incubated for 16 hours at 37°C. After preenrichment 0.1 ml of BPW was brought in 9.9 ml of RV and incubated at 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 PCR as described in section 2.4.

2.4. PCR confirmation of presumptive Salmonella colonies on XLD or TSB agar

The bacterial cells were dissolved in 100 µl of H₂O and centrifuged for 2 min at 13000 g. The pellet was resuspended in 100 µl of 0.05 M NaOH, 0.125% SDS and heated for 17 min at 90°C. For PCR the Salmonella specific primers ST11 (5' AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA 3') and ST15 (5' GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG 3') described by Aabo et al., 1993 were used.

PCR was performed in a final volume of 50 μ l containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween-20, 0.01% gelatine, 200 μ M of each dNTP, 1.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), 50 pmol of each primer and 1 μ l of crude cell lysate. The mixture was subjected to 30 cycles of amplification in a thermal cycler (Cetus 9600; Perkin Elmer). The first cycle was preceded by denaturation for 1 min at 95°C. Each cycle consisted of denaturation for 15 s at 95°C, annealing for 15 s at 57°C, and elongation for 30 s at 72°C. The last cycle was followed by a final elongation for 8 min at 72°C.

The PCR products were analysed on a 1.5% (w/v) Seakem ME agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA).

2.5. Rapid *Salmonella* detection in dairy samples

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

PCR was performed in a final volume of 50 μ l containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween-20, 0.01% gelatine, 200 μ M of each dNTP, 2.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer), 100 pmol of primer ST11 and ST15 and 5 μ l of crude cell lysate. The mixture was subjected to 30 cycles of amplification in a thermal cycler (Cetus 9600; Perkin Elmer) as described in section 2.4.

2.6. Construction of an internal control for PCR

An internal control for PCR was constructed as described by Jin et al., 1994. The basis of this method is PCR amplification of part of the target gene sequence with the same 3' primer but a recombinant 5' primer to produce a shortened template that can be amplified by the original primer pair and is then used as an internal control for PCR. For this purpose the ST11-ST15 amplicon was sequenced.

Genomic DNA of *S. enteritidis* LMG 10395 was prepared as described by Flamm et al., 1984. The DNA was amplified as described in section 2.4. using 25 ng of DNA instead of 1 μ l of

cell lysate. The PCR product was gel-purified from a 1.5% (w/v) GTG agarose gel (FMC Bioproducts) using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). The gel-purified PCR fragment was cloned in a pMOSBlue T-vector (Amersham, Buckinghamshire, UK) as described by the manufacturer. After overnight ligation at 15°C, the recombinant plasmid was transformed in competent *E. coli* DH5 α (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) and the cell suspension was plated on Luria Broth (LB) agar (Life Technologies) containing carbenicilline (50 μ g/ml LB), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal), and isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) by a standard protocol (Sambrook et al., 1989). White colonies were subjected to clone analysis as described by Birnboim and Doly, 1979. Plasmid DNA was prepared by the Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen). The inserts of the recombinant plasmids were sequenced using the Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and vector-directed primers U19 and T7. The results were analysed on a 373A automated DNA sequencer (Applied Biosystems).

3. Results

3.1. Development of a detection protocol.

Different preenrichment media; buffered peptone water (BPW), tryptic soy broth (TSB), and universal preenrichment medium (UPM) (Bailey et al., 1992), were compared for the growth of stressed *S. panama* after 4, 6, 8, 16, 20, and 25 hours of incubation. No significant difference between the 3 media was observed. After 4-6, 8, 16, 20, and 25 hours of incubation we obtained <10, 10-10², 10⁵-10⁷, 10⁷-10⁸, and 10⁷-10⁸ *Salmonella* /ml respectively. We concluded that a minimum incubation time of 16 hours is required in order to obtain a 30 cycle-PCR-detectable amount of *Salmonella*/ml (approximately 10⁴ cells/ml). When growth was followed in the presence of different food products as ice-cream, cheese, or milkpowder an enrichment of 16 hours in BPW was found most optimal. It was visually observed that an enrichment of 20 hours led to a less favourable ratio *Salmonella* (black colonies) to background flora (yellow colonies). Stirring of the enrichment media did not significantly increase growth of *Salmonella*.

PCR was applied after 16 hours of preenrichment in BPW for different dairy products. Filtration, and immunomagnetic separation (IMS), in both cases followed by an alkaline lysis procedure were compared as sample preparation methods. Both techniques gave equal results for ice-cream and pasteurised egg, but IMS gave much better results than filtration for cheese and milkpowder. Therefore IMS was found to give the overall best results when considering the results for different food products.

We experienced that the doubling of the primer concentration from a standard 1 μ M to 2 μ M increased the sensitivity of PCR when applied on (pre)enrichment media. Also, the use of 2.5 U of AmpliTaq DNA polymerase per 50 μ l reaction in stead of only 1.5 U also had a positive effect.

Therefore PCR (using adjusted amounts of primers and enzyme) was applied after 16 hours of preenrichment in BPW, using IMS, and an alkaline lysis as sample preparation (method A). For ice-cream, pasteurised egg yolk, egg yolk powder, milk powder, and cheeses made from pasteurised milk, all samples were found positive using method A for *S. panama* (Table 1) and *S. typhimurium* (Table 2). On the other hand, for raw milk cheeses, only 70% of the samples was found positive using method A (Table 1). Therefore following 16 hours of preenrichment and

IMS, an additional enrichment of 4 hours in 1 ml of Rappaport-Vassiliadis broth was applied before PCR (method B). Method B allowed the detection of Salmonella in all raw milk cheese samples (Table 1 and 2). Also the PCR amplicons obtained for milkpowder using method B were more intense than when using method A.

For whole egg and egg white it was not possible to detect all Salmonella using the conventional method. Recently Baron et al. 1997 found that ovotransferrin, an egg white protein, is responsible for the inhibition of growth of Salmonella in egg white. Ovotransferrin efficiently sequesters iron leading to a decreased growth of Salmonella and the supplementation of iron reversed this inhibitory effect. Therefore we supplemented the buffered peptone water with either 20 µg of ferric ammonium citrate/ml BPW, 20 µg of ferric chloride/ml BPW or 50 ng of Ferrioxamine E (Oxoid)/ml BPW. Also the egg white was stirred on a magnetic stirrer for an hour. Using this iron-supplemented BPW we were able to detect Salmonella in all egg white and whole egg samples using the conventional method. However the results obtained with method A and B were not reproducible. The capturing of the anti-Salmonella beads on the magnet was inefficient due to the high viscosity of the egg white. Therefore the egg white and whole eggs were mixed with a kitchen mixer before they were added to the iron-supplemented BPW. In this way we were able to detect all Salmonella in iron-supplemented BPW using method A or method B (Table 1).

3.2. Development of an internal control for PCR.

The obtained sequence of the ST11-ST15 amplicon is shown in figure 1. A recombinant primer IS-ST11 (5' GCCTGCAAGTAGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCATGCACCAGACTCCCCTTTG 3') was chosen existing partly of the sequence of ST11 (underlined), and partly of a 19 bp internal sequence of the ST11-ST15 amplicon (bold). An internal control fragment was constructed by amplification of 25 ng of S. enteritidis DNA with primers IS-ST11 and ST15, and subsequent agarose gel-purification. This internal control fragment which is 240 bp long, is bordered by the ST11 primer sequence on the 5' side, and by the ST15 primer sequence on the 3' side. Therefore this 240 bp fragment can be co-amplified with the normal 429 bp Salmonella fragment using primers ST11 and ST15.

We have tried to balance this PCR in a way that the 240 bp-amplicon is always present in Salmonella-negative samples and present or absent in Salmonella-positive samples. For pure cultures both the 240 bp and the 429 bp fragment were present when 125 fg of internal control DNA was added to a PCR applied on 10^4 to 10^2 Salmonella per reaction. When higher or lower amounts of Salmonella were present, the internal control fragment was absent or present, respectively (Fig. 2). For confirmation of presumptive Salmonella colonies on agarplates the addition of 25 fg of internal control DNA was found optimal. For the detection of Salmonella in enrichment media the optimal amount of control DNA varied from sample to sample in the range of 2.5 to 250 fg.

4. Discussion and conclusions

4.1. Development of a detection protocol

Rapid methods based on PCR and IMS for the detection of Salmonella in dairy products were optimised. A 20 hour-method was developed for pasteurised egg yolk, egg yolk powder, ice-cream, whole egg, egg white, and cheeses made from pasteurised milk in which PCR was applied after 16 h of enrichment in BPW using IMS as sample preparation. A 24 hour-method was developed for milkpowder, and raw milk cheeses, in which the 16 h preenrichment in BPW was followed by IMS and a 4 h enrichment in Rappaport-Vassiliadis. In this case IMS was used to concentrate the Salmonella present in one ml of preenrichment broth, these Salmonella cells were subsequently enriched in 1 ml of selective enrichment broth of which half the volume was used in PCR. Compared to the standard transfer of 0.1 ml of preenrichment broth to 10 ml of selective broth this means a considerable concentration leading to a higher sensitivity. For whole egg and egg white the enrichment medium had to be supplemented with iron in order to allow detection of Salmonella using the elaborated methods. As described recently by Baron et al. (1997) the supplemented iron reverses the growth inhibitory effect of ovotransferrin, an egg white protein. Also the egg white and whole egg had to be thoroughly mixed in order to allow efficient and reproducible capturing of the anti-Salmonella beads to the magnet.

We experienced that for the detection of Salmonella in enrichment media the use of a 33-cycle PCR gave a tenfold increase in sensitivity compared to a 30-cycle PCR. However we advise not to use a 35 to 40-cycle PCR since the sensitivity of such a PCR approaches or equals the sensitivity of nested-PCR. Such sensitivity would lead to contamination problems, especially when used in routine laboratories.

Using the methods described we were always able to detect Salmonella using a 30-cycle PCR. However, for other food products not included in this study it may be useful to obtain an even higher sensitivity using a 33-cycle PCR.

For the commercially available systems "Probelia™ Salmonella sp." , and "Taqman™ Salmonella PCR Amplification Detection Kit" a preenrichment of 16 hours is suggested. For the "BAX™ for Screening/Salmonella" a preenrichment of 20 hours is advised. Following our experience such a preenrichment is not sufficient for all food products. These commercial systems however apply a 40 cycle-PCR which can provide an additional sensitivity to the method. For reasons discussed above we choose to use an extra enrichment for certain food products in combination with a 30 cycle-PCR. This approach of a somewhat longer enrichment and a less sensitive PCR can also be used in combination with the commercially available PCR systems.

We found that the affinity of antibody-coated magnetic beads for bacteria is only partially accounted for by the presence of the antibody. The sensitivity of Dynabeads anti-Listeria or non-coated magnetic beads for Salmonella is only a ten-fold lower than the sensitivity of Dynabeads anti-Salmonella when tested on pure Salmonella cultures. We therefore conclude that the magnetic bead itself has a very high affinity for bacteria in general. Consequently, even when using 100% species- or genus- specific antibodies, these magnetic beads will never be specific for one species or genus.

Nevertheless, as seen in the described methods IMS is a useful tool to be used in rapid PCR-based detection methods.

4.2. Development of an internal control for PCR.

We tried to construct an internal control for the Salmonella-specific PCR described by Aabo et al. 1993 using the method of Jin et al. 1994. The constructed internal control fragment of 240 bp long can be co-amplified with the normal 429 bp Salmonella fragment.

We were able to develop an internal control system for PCR confirmation of presumptive Salmonella colonies on agar plates. However, it was not possible to develop a general internal control system for PCR detection of Salmonella in (pre)enrichment media. The optimal concentration of internal control DNA varied from sample to sample. It is highly probable that this amount is strongly dependent not only on the number of Salmonella in the sample but also on the number of background bacteria and the nature of the sample. There is always some competition between target DNA and internal control DNA for reaction components. For low-contaminated samples it is possible that due to this competition false-negative results are obtained.

In our experience inhibition of PCR is rarely encountered when the technique is used to confirm presumptive colonies on agarplates. On the other hand PCR performed on enrichment media is more often inhibited, therefore the development of an internal control system is essential for this application. This is especially the case when the technique is to be applied in routine laboratories. Therefore, further investigation is necessary to find a suitable internal control system for PCR detection of bacteria in enrichment media. An alternative approach would be to use a different set of primers to amplify the internal control fragment. In such a duplex PCR system there would be no competition for primers, only for the other reaction components.

Acknowledgements

This work was financed by the Belgian Normalisation Program initiated by the Belgian State Prime Ministers Service Science Policy Office.

We would like to thank Isabelle Bottelier, Benny Carlier, Els Vandermasse, and An Balcaen for the technical work presented.

References

Aabo, S., Rasmussen, O. F., Rossen, L., Sorensen, P. D., and Olsen, J. E. (1993) Salmonella identification by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 7, 171-178.

Aabo, S., Andersen, J. K., and Olsen, J. E. (1995) Detection of Salmonella in minced meat by the polymerase chain reaction method. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 180-182.

Bailey, J.S., and Nelson, A.C. (1992) Universal preenrichment broth for the simultaneous detection of Salmonella and Listeria in foods. *J. Food Protection* 55, 256-259.

Baron, F., Gautier, M., and Brule, G. (1997) Factors involved in the inhibition of growth of Salmonella enteritidis in liquid egg white. *J. Food Protection* 60, 1318-1323.

Bej, A. K., Mahubani, M. H., Boyce, M. J., and Atlas, R. M. (1994) Detection of Salmonella spp. in oysters by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 368-373.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.

Cano, R. J., Rasmussen, S. R., Sanchez Fraga, G., and Palomares, J. C. (1993) Fluorescent detection-polymerase chain reaction (FD-PCR) assay on microwell plates as a screening test for salmonellas in foods. *J. Appl. Bact.* 75, 247-253.

Chen, S., Yee, A., Griffiths, M., Wu K. Y., Wang, C.-N., Rahn, K., and De Grandis, S. A. (1997) A rapid, sensitive and automated method for detection of Salmonella species in foods using AG-9600 Amplisensor Analyzer. *J. Appl. Microbiol.* 83, 314-321.

Cohen, H. J., Mechanda, S. M., and Lin, W. (1996) PCR amplification of the *fimA* gene sequence of Salmonella typhimurium, a specific method for detection of Salmonella spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4303-4308.

Coleman, D.J., Chick, K.E, Nye, K.J.,(1995a) An evaluation of immunomagnetic separation for the detection of salmonellas in raw chicken carcasses. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 152-154.

Coleman, D.J., Nye, K.J., Chick, K.E., and Gagg, C.M. (1995b) A comparison of immunomagnetic separation plus enrichment with conventional Salmonella culture in the examination of raw sausages. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 249-251.

Cudjoe, K.S., and Krona, R. (1997) Detection of Salmonella from raw food samples using Dynabeads anti-Salmonella and a conventional reference method. *Int. J. Food Microbiology* 37, 55-62.

Dziadkowiec, D., Mansfield, L.P., and Forsyth, S.J. (1995) The detection of Salmonella in skimmed milk powder enrichments using conventional methods and immunomagnetic separation. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 361-364.

Flamm, R. K., Hinrichs, D. J., and Thomashaw, M. F. (1984) Introduction of pAM β 1 into Listeria monocytogenes by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect. Immun.* 44, 157-161.

Fluit, A. D., Widjojoatmodjo, M. N., Box, A. T. A., Torensma, R., and Verhoef, J. (1993) Rapid detection of Salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1342-1346.

in 't Veld, P. H., van Strijp-Lockfeer, N. G. W. M. , Havelaar, A. H., and Maier, E. A. (1996) The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of Salmonella. *J. Appl. Bact.* 80, 496-504.

Jin, C.-F., Mata, M., and Fink, D. J. (1994) Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Meth. Appl.* 3, 252-255.

Kwang, J., Littledike, E. T., Kee, J. E. (1996) Use of the polymerase chain reaction for Salmonella detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 46-51.

Lin, C.-K., and Tsen, H.-Y. (1996) Use of two 16S targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of Salmonella in foods. *J. Appl. Bact.* 80, 659-666.

Mahon, J., Murphy, C. K., Jones, P. W., and Barrow, P. A. (1994) Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting Salmonella on chicken skin. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 169-172.

Mansfield, L. P., and Forsythe, S. J. (1993) Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for Salmonella detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 122-125.

Mansfield, L. P., and Forsythe, S. J. (1996) Collaborative ring-trial of Dynabeads anti-Salmonella for immunomagnetic separation of stressed Salmonella cells from herbs and spices. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 41-47.

Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Ruberto, A., Ianitto, G., and Grasso, G.M. (1997) Immunomagnetic separation and conventional culture procedure for detection of naturally occurring Salmonella in raw pork sausages and chicken meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 493-497.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Soumet, C., Ermel, G., Fach, P., and Colin, P. (1994) Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of Salmonella from chicken products by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 294-298.

Soumet, C., Ermel, G., Salvat, G., and Colin, P. (1997) Detection of Salmonella spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 113-116.

Table 1
Comparison of conventional and short method for the detection of stressed *S. panama* in different dairy products

Sample	N samples	Method A		Method B	Method C
		Filtration	IMS		
ice-cream	10	9	9	n.d.	8
pasteurised egg yolk	15	11	12	n.d.	12
egg yolk powder	5	n.d.	5	5	5
cheese	10	4	10	n.d.	10
milkpowder	4	0	4	4	4
raw milk cheese	20	13	14	20	20
whole egg	6	n.d.	5	5	5
whole egg *	6	n.d.	6	6	6
egg white	6	n.d.	0	0	0
egg white *	6	n.d.	6	6	6

Method A: 16 hours BPW, IMS, PCR

Method B: 16 hours BPW, IMS, 4 hours RV, PCR

Method C: conventional method

*: BPW supplemented with iron (20 µg ferric ammonium citrate/ml)

n.d.: not done

Table 2.
Comparison of conventional and short method for the detection of stressed *S. typhimurium* in different dairy products

Sample	N samples	Method A	Method B	Method C
ice-cream	5	5	n.d.	5
pasteurised egg yolk	5	3	n.d.	3
egg yolk powder	5	5	n.d.	5
cheese	5	5	n.d.	5
milkpowder	4	n.d.	4	4
raw milk cheese	5	n.d.	5	5

Method A: 16 hours BPW, IMS, PCR

Method B: 16 hours BPW, IMS, 4 hours RV, PCR

Method C: conventional method

n.d.: not done

Figure 1

Nucleotide sequence of the ST11-ST15 amplicon of *S. enteritidis* LMG 10395. The sequence of ST11 and ST15 is underlined, and the internal primer used for internal standard construction is in bold.

Figure 2

Co-amplification of Salmonella DNA and internal control DNA with primers ST11 and ST15. A tenfold dilution series of Salmonella cells was made and to each reaction 125 fg of control DNA was added. Lanes 1, Boehringer molecular marker VIII; 2, 10^5 CFU/reaction; 3, 10^4 CFU/reaction; 4, 10^3 CFU/reaction; 5, 10^2 CFU/reaction; 6, 10 CFU/reaction; 7, 1 CFU/reaction

Overzicht normen waarnaar verwezen wordt

- International Dairy Federation (1985) Milk and milkproducts - detection of *Salmonella*. IDF standard 93 A. International Dairy Federation, Brussels
- International Dairy Federation (1990) Milk and milkproducts - detection of *Listeria monocytogenes*. Provisional recommended method 143. International Dairy Federation, Brussels
- International Standard Organisation (1993) Microbiology General guidance on methods for the detection of *Salmonella*. International Standard ISO6579
- International Standard Organisation (1995) Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. International Standard ISO-11290-1 ; (method for detection in milk and milkproducts ISO-10560)

De wetenschappelijke verantwoordelijkheid over de inhoud van dit eindverslag berust volledig bij de auteurs.
Voor verdere inlichtingen betreffende het Wetenschappelijk ondersteuningsprogramma voor de Normalisatie,
gelieve contact op te nemen met de DWTC-verantwoordelijke van dit programma:

Anna CALDERONE
Tel.: (02) 238 34 40
Fax: (02) 230 59 12
E-mail: cald@belspo.be

DWTC homepage: <http://www.belspo.be>