



Symposium

Nieuwe normen in het lab

Wageningen, 25 januari 2018

FiMM, Postbus 381, 6700 AJ WAGENINGEN
Tel. 06-44834988, info@fimm.nl, www.fimm.nl



Programma

Programma	Donderdag 25 januari 2018, WICC te Wageningen
09.00 - 10.00	Ontvangst, koffie en thee, expositie apparatuur
10.00 - 10.10	Welkom en inleiding: herziene gevalideerde normen met prestatiekenmerken <i>Rijkelt Beumer (Wageningen Universiteit / FiMM)</i>
10.10 - 10.30	Standaardisatie binnen de levensmiddelenmicrobiologie en de rol van de NEN-normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen' <i>Gillian Herpers, Consultant AgroFood & Consument bij het Nederlands Normalisatie-instituut (NEN)</i>
10.30 - 10.50	Het bemonsteren van oppervlakken, hoe moet dat (NEN-EN-ISO 18593) <i>Rijkelt Beumer (Wageningen Universiteit / FiMM)</i>
10.50 - 11.30	Koffie, thee en expositie apparatuur
11.30 - 12.00	Voorbehandeling van monsters voor microbiologisch onderzoek (NEN-EN-ISO 6887-1 t/m 6) <i>Adrienne Klijn, Group Leader Microbial and Molecular Analytics bij Nestlé Research Center Switzerland</i>
12.00 - 12.30	Op zoek naar <i>Campylobacter</i> (NEN-EN-ISO 10272) <i>Wilma Jacobs-Reitsma, Levensmiddelenmicrobioloog bij het RIVM-Z&O</i>
12.30 - 13.45	Lunch en expositie apparatuur
13.45 - 14.15	Detectie en serotypering van <i>Salmonella</i> , de stand van zaken (NEN-EN-ISO 6579-1 en -3) <i>Kirsten Mooijman, Coördinator EURL-Salmonella & Netherlands NRL-Salmonella</i>
14.15 - 14.45	<i>Enterobacteriaceae</i> , coliformen en <i>Escherichia coli</i> ; wanneer welk onderzoek en hoe (NEN-EN-ISO 21528, NEN-ISO 4831, NEN-ISO 4832 en NEN-(EN-)ISO 16649) <i>Els Biesta-Peters, Wetenschappelijk medewerker/senior inspecteur bij de NVWA</i>
14.45 - 15.15	Koffie, thee en expositie apparatuur
15.15 - 15.45	Validatie en verificatie van microbiologische methoden (NEN-EN-ISO 16140 serie) <i>Paul in 't Veld, Wetenschappelijk medewerker bij de NVWA</i>
15.45 - 16.15	De (on)mogelijkheden van Petrifilm <i>Frank de Bok, Projectleider Microbiologie bij Eurofins Food Safety Solutions</i>
16.15	Afsluiting door Rijkelt Beumer gevolgd door borrel



Veilig voedsel door kennis

FiMM geeft diverse cursussen levensmiddelenmicrobiologie en organiseert symposia en workshops om de kennis van u of uw collega's over de microbiologie van voedingsmiddelen te vergroten.

Cursus Levensmiddelenmicrobiologie en –hygiëne

De hygiëne tijdens het productieproces bepaalt grotendeels de veiligheid en microbiologische kwaliteit van levensmiddelen. Daarvoor is een gedegen kennis nodig van micro-organismen: wat is hun gedrag in levensmiddelen en in de (productie)omgeving. Dat is wat u leert bij deze cursus. Deze vijfdaagse cursus levensmiddelenmicrobiologie en -hygiëne op hbo-niveau is bestemd voor mensen die bijvoorbeeld werkzaam zijn in de levensmiddelenindustrie, bij controlerende instanties of adviserende bedrijven.

Hygiënetraining voor productiemedewerkers

Volgens EG-verordening 852/2004 zijn alle voedselabrikanten verplicht hun personeel te trainen op het gebied van hygiënisch werken met als doel het in de handel brengen van veilig voedsel.

Speciaal voor productiemedewerkers ontwikkelden wij een 2 uur durende *in company* training waarin de basisprincipes van hygiënisch werken aan bod komen. Uw medewerkers luisteren niet alleen naar een praatje maar gaan ook zelf aan de slag.

Een week voor aanvang van de training komen wij langs en zetten uw medewerkers met onze hulp een aantal proefjes in die verband houden met hygiënische werkwijzen. Tijdens de training linken we de resultaten van de proefjes aan de theorie zodat de opgedane kennis goed beklijft.

Eén of meerdaagse bedrijfstraining 'op maat'

Steeds vaker krijgen wij de vraag om een training microbiologie 'op maat' te ontwikkelen en te geven. Natuurlijk doen wij dat graag. De training kan theoretisch van aard zijn maar ook gericht op het aanleren van microbiologische technieken in het laboratorium. In overleg met u maken we afspraken over de te behandelen onderwerpen. Indien gewenst komen we van te voren langs.

Seminar *Listeria monocytogenes* in kant-en-klare levensmiddelen

Listeria monocytogenes is de veroorzaker van listeriose, een infectie met soms een dodelijke afloop. *L. monocytogenes* komt algemeen voor en wordt, in wisselende aantallen, aangetroffen in vrijwel alle rauwe grondstoffen: groente, fruit, vis, vlees en melk. Omdat *Listeria* zich gemakkelijk vestigt in de productieomgeving van levensmiddelen, wordt deze ziekteverwekker vaak aangetroffen op moeilijk te reinigen oppervlakken.

Via die besmette oppervlakken (bijvoorbeeld snijmachines) is besmetting van producten mogelijk. Daarom eist de wetgever een gedegen risicoanalyse voor deze producten om de kans op ziekte zo klein mogelijk te maken. Hoe? Dat leert u onder meer tijdens dit seminar.

Advies & ondersteuning

Heeft u microbiologische vraagstukken of wilt u advies? Ook daarvoor kunt u bij ons terecht. Bel ons op 06-44 83 49 88 of kijk op de website voor meer informatie.



Normcommissie Microbiologie

Normen zijn afspraken die belanghebbende partijen maken over een product, dienst of – in het geval van de normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen' – vooral analysemethoden. Door goede afspraken over analysemethoden te maken, worden representatieve, reproduceerbare en vergelijkbare resultaten verkregen. De normcommissie Microbiologie wordt begeleid door NEN, het Nederlands Normalisatie-instituut. NEN heeft een faciliterende rol en de normen worden ontwikkeld door de betrokken experts.

De normcommissie Microbiologie telt meer dan dertig leden, afkomstig van organisaties uit de gehele voedselketen. De commissie vormt een breed platform waarin vertegenwoordigers van de overheid, het bedrijfsleven en de wetenschap elkaar ontmoeten en besluiten nemen over bestaande en nieuwe normen. Gezamenlijk representeren deze experts Nederland in internationale (ISO) en Europese (CEN) werkgroepen. Op deze manier kunnen organisaties invloed uitoefenen op de inhoud van normen en hiervan profiteren. Ook u kunt lid worden van de normcommissie Microbiologie.

Het werkpakket van de normcommissie bevat ruim tachtig normen. De meeste normen beschrijven bemonsterings- en analysemethoden voor microbiologisch onderzoek, zoals het detecteren van *Salmonella*, *Campylobacter* en *Listeria monocytogenes*. Met één gestandaardiseerde analysemethode kan zo de aanwezigheid van, of de hoeveelheid aan micro-organismen worden vastgesteld. Een groot aantal normen is geschikt voor het aantonen van microben in verschillende productgroepen waaronder diervoeder, zuivel, vis en vlees.

Uw voordelen

Het lidmaatschap van de normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen' levert u het volgende op:

- Snel op de hoogte van toekomstige normontwikkelingen en herzieningen.
- Toegang tot een nationaal, Europees en internationaal netwerk van experts.
- Invloed op de ontwikkeling van normen en gezamenlijk het nationale standpunt bepalen.
- Deelname aan een krachtig platform voor het signaleren en kenbaar maken van praktijkknelpunten.
- Continue informele benchmark (waar staat uw organisatie ten opzichte van andere partijen?).

Normalisatie: de wereld op één lijn.



Nationale, Europese en internationale invloed

NEN beheert en publiceert een omvangrijke collectie van Nederlandse (NEN), Europese (EN) en internationale (ISO) normen. Door het lidmaatschap op Europees en mondiaal niveau heeft NEN een centrale positie in het web van normalisatie. Het standaardiseren van methoden, die gebruikt worden binnen het microbiologisch onderzoek, vindt steeds vaker plaats op Europees of internationaal niveau. Internationale normalisatie leidt immers tot schaalvoordelen door een grotere markt, betere exportmogelijkheden en het sluit aan bij de toename van Europees beleid en regelgeving.

Nederlandse experts zijn actief vertegenwoordigd in zowel de Europese als internationale normcommissies en werkgroepen. Zij bekleden daar verschillende sleutelposities als projectleider en brengen de nodige inhoudelijke kennis in. Enkele actuele onderwerpen:

- Ontwikkelen van deel 3 tot en met 6 voor ISO 16140 'Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden' over onder andere verificatie.
- Verbeteren van de norm met algemene eisen voor microbiologische onderzoeken (ISO 7218)
- Herzien van ISO 15213 'Horizontale methode voor de bepaling en telling van *Clostridium* spp.'

Voor sommige onderwerpen geeft de normcommissie Microbiologie de voorkeur aan de ontwikkeling van nationale normen of richtlijnen, bijvoorbeeld in de werkgroep Zuivelmicrobiologie. Deze werkgroep stelt NEN-normen op en herzielt bestaande normen, die van belang zijn voor de zuivelsector. In een andere nationale werkgroep bundelen experts hun krachten om bij te dragen aan de herziening van een ISO-norm voor de bepaling van meetonzekerheid.

De nationale normalisatie-instituten moeten als leden van CEN een EN-norm in principe zonder afwijkingen als NEN-norm overnemen. Wel is vertaling in de betrokken landstaal toegestaan. Na een vastgestelde datum dienen afwijkende nationale NEN-normen te zijn ingetrokken. In het geval van de normcommissie Microbiologie worden (bijna) alle ISO-normen overgenomen. Deze normen kunt u herkennen aan de afkorting NEN-EN-ISO, bijvoorbeeld deel 1 en deel 2 van NEN-EN-ISO 4833:2013 'Microbiologie van de voedselketen - Horizontale methode voor de telling van micro-organismen', respectievelijk de gietplaat- en strijkplaattechniek.

Normalisatie en NEN: professionaliteit

NEN is een onafhankelijke stichting zonder winstoogmerk. In Nederland is NEN de enige toegangspoort tot Europese (CEN) en internationale (ISO) normalisatie. Door lid te worden van nationale normcommissies kunt ook u als expert op Europees en internationaal vlak deelnemen aan werkgroepen en commissies. Wie meedoet aan normalisatie, deelt zijn kennis om er samen met anderen voordeel uit te halen. Op een slimme manier worden verschillende belangen met elkaar verenigd. De commissieleden financieren, naar draagkracht, gezamenlijk de inzet van NEN voor de normcommissie.

Meer weten of geïnteresseerd in het lidmaatschap?

Wilt u meer informatie over normalisatie of wilt u lid worden van de normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen', neem dan contact op met Laura Mout, secretaris van deze normcommissie en Consultant AgroFood & Consument, telefoon (015) 2 690 436, e-mail laura.mout@nen.nl.

versie: 20171222

Normalisatie: de wereld op één lijn.



NEN

Standaardisatie binnen levensmiddelen-microbiologie en de rol van de NEN-normcommissie

Gillian Herpers en Laura Mout
Wageningen, 25 januari 2018

1



Lekker
NORMAAL

0:04 / 2:17

NEN

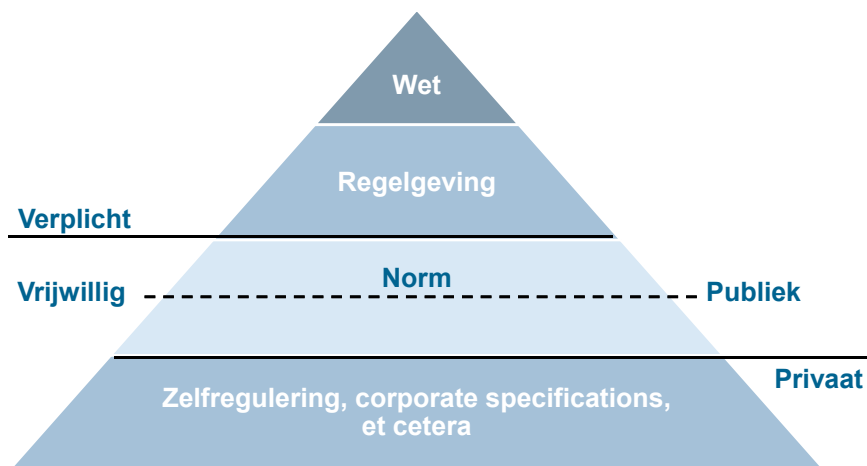
Wat is een norm? En normalisatie?

- Een document
 - Afspraak tussen belanghebbende partijen over een product, dienst of systeem
 - Reflecteert [consensus](#)
 - Normatief: analysemethoden, specificaties en termen & definities
 - Informatief: aanbevelingen en toelichtingen
- Normalisatie: proces om tot een norm te komen
- Wie kan een idee voor een norm aandragen?
 - Iedereen (bedrijfsleven, consumenten, overheid of belangenorganisaties) met hulp van NEN
- Wie schrijven een norm?
 - Inhoudelijke experts in normcommissies onder begeleiding van NEN

Wat is consensus?

- Algemene overeenstemming, gekenmerkt door de **afwezigheid van blijvend verzet** tegen wezenlijke punten van de kant van een belangrijk deel van de betrokken belanghebbenden
- Dus **niet** noodzakelijkerwijs **eenstemmigheid**

Normen, wetgeving en richtlijnen



NEN

- De enige toegangspoort tot formele normalisatie
 - Internationaal: lid van ISO
 - Europees: lid van CEN
- Contactpunt voor normcommissies in Nederland
- Een onafhankelijke stichting zonder winstoogmerk

- Coördineert de Nederlandse bijdrage
- Informeert de stakeholders over nieuwe normontwikkelingstrajecten
- Geeft partijen de mogelijkheid om internationaal invloed uit te oefenen
- Promoot actieve Nederlandse deelname

Activiteiten NEN

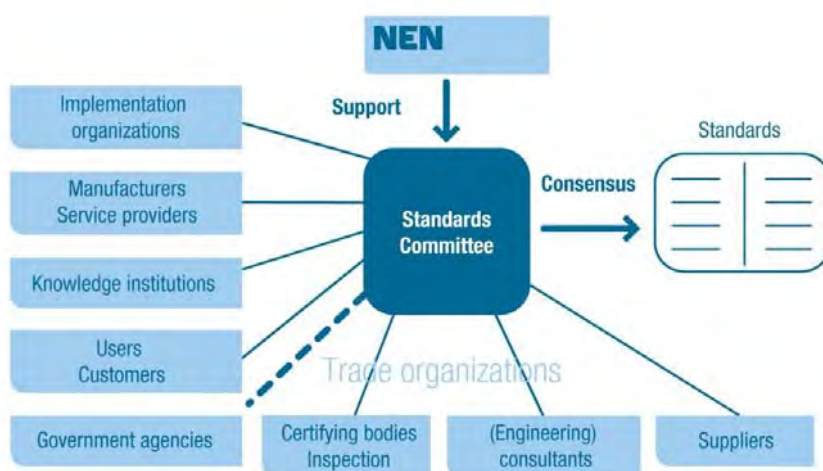
Nationaal

- Begeleiden van documentenstroom
- Stemmen op en overname van normen (inclusief systematic reviews)
- Coördinatie richting ISO/CEN
- Organiseren van vergaderingen (twee per jaar)
- Communicatie en administratie
- Ondersteunen van nationale trajecten

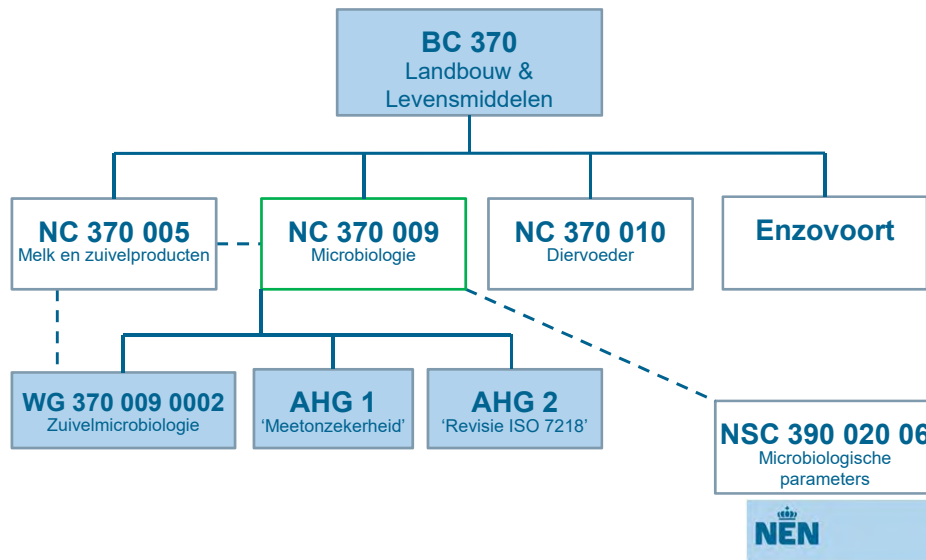
Internationaal

- Uitvoeren van basisactiviteiten
- Werkprogramma coördineren
- Organiseren van vergaderingen

Gezamenlijke verantwoordelijkheid



NEN-commissies voor voeding



9

Normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen'



Methodevalidatie en -verificatie

NEN-normcommissieleden zijn op wereldwijd niveau projectleider van de standaard voor validatie (ISO 16140-serie), waarvan nog vier delen in ontwikkeling zijn, o.a.: de validatie van de bevestigingstap van een methode, de validatie van methoden in een laboratorium en methodeverificatie

- Directe aansluiting bij ontwikkeling van (horizontale) referentiemethoden
- Deskundige groep van specialisten en generalisten (circa 40 organisaties)
- Diverse stakeholders: bedrijfsleven, overheid, wetenschap en adviseurs
- Nationaal en internationaal netwerk
- NEN is onafhankelijk secretariaat



NEN

Normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen'

- Volgt internationaal en Europees normalisatiewerk
 - ISO/TC 34/SC 9 'Food products - Microbiology' (*P-member*)
 - CEN/TC 275/WG 6 'Microbiology of the food chain'
- Neemt actief deel op Europees en internationaal niveau
 - Projectleiderschap
 - Inhoudelijke kennis
- Herziet en stelt enkele nationale normen op
 - Vooral zuivelmicrobiologie
- Bestaat uit commissieleden (inclusief voorzitter) en secretariaat:
 - Meer dan 40 individuen afkomstig van meer dan 30 verschillende organisaties
 - 1 onafhankelijke NEN-secretaris en 1 onafhankelijke voorzitter

Nationale commissieleden...

- ...hebben bepaalde expertise met betrekking tot het onderwerp
- ...nemen deel namens een organisatie
- ...beïnvloeden de inhoud van de normen door input te leveren
- ...nemen deel aan nationale commissievergaderingen
- ...lezen ISO/CEN documenten
- ...stemmen en geven commentaar op (internationale/Europese) voorstellen
- ...bereiden samen de nationale positie voor
- ...dragen samen de kosten voor de diensten van NEN

Zij kunnen ook:

- o Deelnemen aan internationale of Europese vergaderingen
- o Afgevaardigd worden als expert in internationale/Europese werkgroepen
- o De rol van convenor of project leader van een internationale/Europese werkgroep vervullen

Relatie NEN-CEN-ISO

Mondiaal niveau (ISO)

- 163 leden
- NEN-(EN-)ISO-normen
- Vrijwillig overnemen in Nederland



Europees niveau (CEN)

- 34 leden
- NEN-EN-normen
- Verplicht overnemen in Nederland



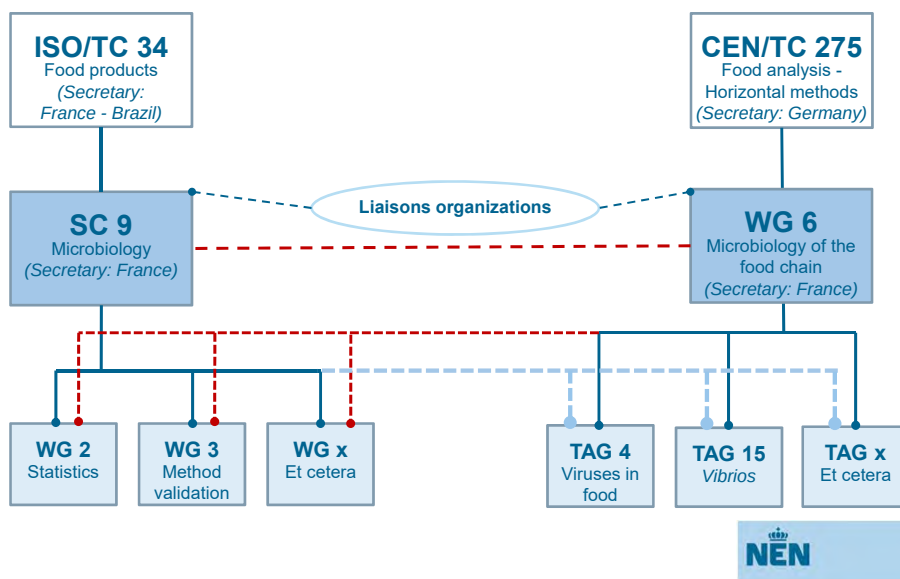
Nationaal niveau (NEN)

- NEN-normen
- Toegangspoort naar CEN en ISO



13

ISO/TC 34/SC 9 & CEN/TC 275/WG 6



14

Samengevat: Toegevoegde waarde van de normcommissie

Draagvlak creëren

- All parties concerned: informeren en communiceren
- Marktanalyse: stakeholders betrekken met diverse belangen

Invloed (strategisch belang)

- Internationaal lobbywerk → leadership van ISO-werkgroepen
- Toepasbaar maken in meerdere deelgebieden van de agrofoodsector

Netwerk

- Ondersteunen experts bij gebruik ISO-netwerk (*proactieve benadering*)
- Profilering: NEN & leden treden op als ambassadeur van normcommissie

Kennis vergroten

- Vroegtijdig en overzichtelijk informeren op verschillend (detail)niveau
- Kennisuitwisseling stimuleren: binnen en buiten commissie en tussen experts



Het bemonsteren van oppervlakken, hoe moet dat

(NEN-EN-ISO 18593)

Rijkelt Beumer

Wageningen Universiteit / FiMM

Inleiding

Het voedselveiligheidsbeleid van de Europese Unie (EU) is gebaseerd op een allesomvattende geïntegreerde aanpak, die betrekking heeft op de hele voedselketen. Het omvat alle sectoren van de voedselketen waaronder de diervoederproductie, de primaire productie, de be- en verwerking van voedsel, de opslag, het transport en de detailhandel.

In deel 5 van het boek 'Microbiologie van Voedingsmiddelen' (vijfde druk), uitgegeven door MY businessmedia b.v. te Rotterdam, wordt het onderzoek in de primaire sector en dat in de productieomgeving van levensmiddelen behandeld.

In dit deel wordt een onderscheid gemaakt tussen de onderzoeken die plaatsvinden in de primaire sector, en het onderzoek dat plaatsvindt in de productieomgeving. Voor deze samenvatting is voor een belangrijk deel gebruik gemaakt van de tekst uit deel 5 van dit methodenboek.

Productieomgeving

De invoering van een voedselveiligheidssysteem gebaseerd op Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) heeft ertoe geleid dat de noodzaak van lijn- en omgevingsonderzoek in de productie is toegenomen. Ook al worden de 'Critical Control Points' (CCP's) beheerst, dan nog komt het voor dat bij de productie van levensmiddelen en het bereiden van maaltijden besmetting optreedt via niet goed gereinigde contactoppervlakken (apparatuur, gereedschappen, personen) en/of via de omgeving (lucht).

Als uit omgevingsonderzoek blijkt dat na reiniging en desinfectie te hoge aantallen (indicator)micro-organismen aanwezig zijn op (contact)oppervlakken, of wanneer er een pathogeen micro-organisme wordt gedetecteerd (bijvoorbeeld *Listeria* of *Salmonella*) dan moet zo snel mogelijk actie worden ondernomen om te voldoen aan de (interne) normen. Indien nodig moeten producten worden geblokkeerd of uit de handel worden genomen.

Onderzoek van oppervlakken

Het onderzoek van al dan niet gereinigde oppervlakken naar de aanwezigheid van micro-organismen kan met verschillende technieken worden uitgevoerd. Destructieve technieken (bijvoorbeeld het afkrabben van een oppervlak) hebben een hogere opbrengst, maar zijn in de praktijk niet echt toepasbaar. Voor het onderzoek van oppervlakken wordt daarom meestal gebruik gemaakt van afdrukplaatjes (contactagarplaatjes of dipslides), swabs, veegdoeken of sponzen.



Dit onderzoek levert semi-kwantitatieve resultaten op. De resultaten kunnen worden verwerkt tot zogenaamde hygiënescores waarmee een indicatie wordt verkregen over de microbiële besmetting van een oppervlak.

Een andere methode is om gebruikt te maken van een drieklassenplan. Bij deze methode wordt een waarde vastgesteld voor het aantal gevonden micro-organismen op een oppervlak (m), en een waarde voor het maximale aantal micro-organismen dat op dat oppervlak aanwezig mag zijn (M). Wanneer een oppervlak bijvoorbeeld vijf maal bemonsterd wordt ($n=5$), dan moeten de tellingen bij voorkeur lager zijn dan m . Echter in een aantal gevallen (c) mag het aantal micro-organismen hoger zijn, maar nooit hoger dan M . In formule komt dat neer op: $m=10$, $M=100$, $n=5$ en $c=2$; of in logwaarden: $m=1$, $M=2$, $n=5$ en $c=2$. Afhankelijk van het soort bemonsterde oppervlak en de micro-organismen die worden bepaald worden richtwaarden vastgesteld.

Om vervuiling van oppervlakken te meten hoeft men niet per se microbiologische methoden te gebruiken. Met de adenosinetrifosfaat (ATP)-methode of het aantonen van restanten eiwit wordt snel informatie gekregen over de mate van reinheid van een oppervlak. Beide snelle methoden maken gebruik van swabs om een oppervlak te bemonsteren.

Geraadpleegde literatuur

Hygiene in food processing: principles and practice, 2nd edition (2014). Editors H.L.M. Lelieveld, J. Holah en D. Napper. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

ISO DIS 18593:20117, Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.

Microbiologie van Voedingsmiddelen, 5^e druk (2015). R. Dijk, D. van den Berg, R. Beumer, E. de Boer, A. Dijkstra, L. Mout, H. Stegeman, M. Uyttendaele en S. in 't Veld. MYbusinessmedia, Rotterdam, NL.

Oppervlakkig gezien ...

Een bijdrage aan het FiMM symposium:

Nieuwe normen in het laboratorium

25 januari 2018

Rijkelt Beumer

1

Oppervlakkig ...

Oppervlakkig: bijwoord, bijvoeglijk naamwoord

niet ernstig, niet grondig

hoe is het, alles goed!, gaat prima, hoi!

2

gezien ...

gezien: bijwoord, bijvoeglijk naamwoord, volt. dw.

tijd niet gezien, voor jou gezien (op tv), zelden
zoiets gezien, goed gezien, moet je gezien
hebben, ik houd het voor gezien

3

Nu serieus ...

Op welke oppervlakken zitten bacteriën?

Gewenst

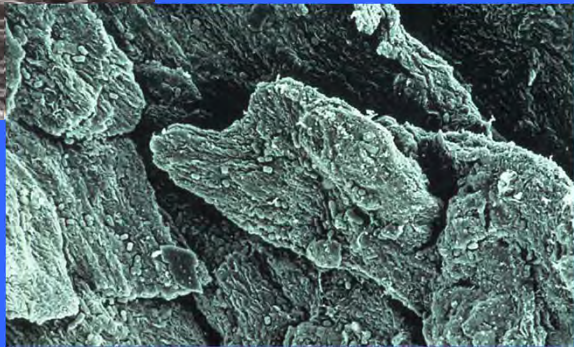
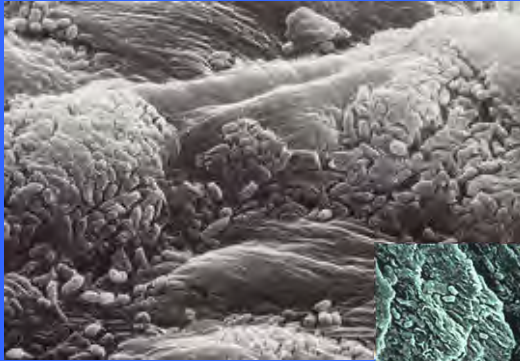
- omdat ze daar nuttig werk doen:
bv op biofilters, waar verontreinigingen in
afvalwater worden omgezet

Ongewenst

- omdat ze voor besmetting kunnen zorgen:
bv in de levensmiddelenproductie

4

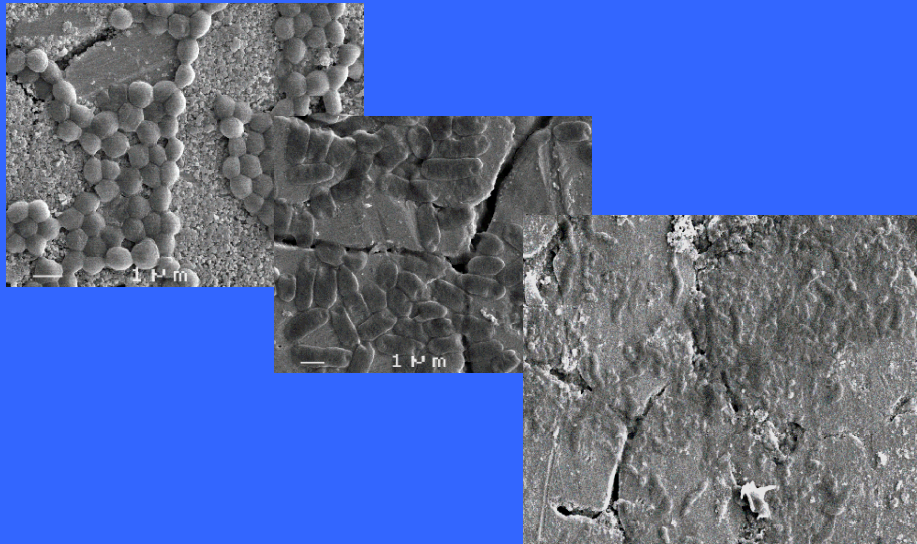
een voorbeeld van gewenst ...



Als je die niet regelmatig wegwast ...



Ongewenst: overdracht van micro-organismen via bemette oppervlakken



Op naar de norm ISO FDIS 18593

in 2017 9 maanden vertraagd
de norm zelf komt in 2018 (maart?)
laatste bijeenkomst WG17 op 27-11-2017 in Parijs

op de vraag gesteld tijdens de ISO-bijeenkomst:
Do you agree with resolution 783?

SC9 members agreed to delete 'dipslides' and
agreed to launch the DIS-vote on FDIS 18593

ja: 21; nee: 0 en onthouding: 12

ISO FDIS 18593:2017

Microbiology of the food chain -
Horizontal methods for surface sampling

belangrijkste veranderingen met de eerste
editie ISO 18593:2004

aanbevelingen voor:

- monsternamen inclusief locatie en tijdstip
- voorbeelden van 'neutralizers' (inactiveringsvloeistoffen)

ISO FDIS 18593

in de 'Introduction' de mededeling dat het belangrijk kan zijn om het aantal micro-organismen te bepalen, maar dat het geen exacte telling is, maar een schatting van het niveau van besmetting.

dit document is niet bedoeld voor de primaire sector (ISO 13307), karkassen (ISO 17604), of voor het onderzoek op virussen (ISO 15216-1)

er wordt geen advies gegeven over hoe vaak bemonsterd moet worden, en het is geen validatie van reiniging en desinfectie

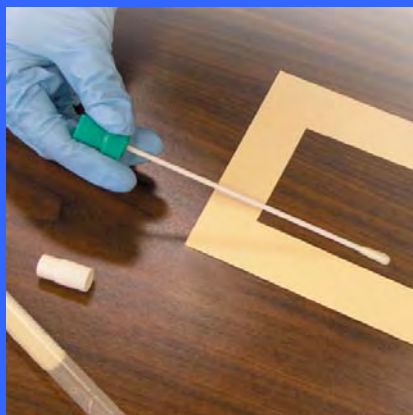
ISO FDIS 18593

wat heb je nodig:

- contactplaat, plastic plaatje met variable oppervlak (inclusies dipslides, films)
- sterile swabs, doeken of sponsjes
- verdunningsvloeistof, transportmedium
- kweekmedia, gegoten of nog te gieten
- indien nodig: geschikte inactiveringsvloeistof om residuen van desinfectiemiddelen te neutraliseren (EN 1276, 1650, 13697 en 13704)
- koelbox, vortex, stomacher, template

ISO FDIS 18593

template: hergebruiken, beter: éénmalig gebruik



ISO FDIS 18593

bemonsteren:

welke oppervlakken, wanneer en hoe vaak?

- risk-based
- gebruik steeds dezelfde methode
- vergroot de kans door groter oppervlak te nemen
- na reinigen en desinfectie
- voor/na productie
- tijdens productie

ISO FDIS 18593

bemonsteren:

- vooral moeilijk bereikbare plaatsen, ontmantelen
- schema opstellen voor plaatsen, frequentie

voedselcontactoppervlakken

o.a. transportbanden, snijmachines, snijplanken, mixers, containers, vaten, leidingen, personeel, handschoenen ...

geen voedselcontactoppervlak

o.a. muren, vloeren, plafond, condens, afvoer, slangen, transportmateriaal, schoonmaakmateriaal ...

kapot of beschadigd: z.s.m. repareren of vervangen

ISO FDIS 18593

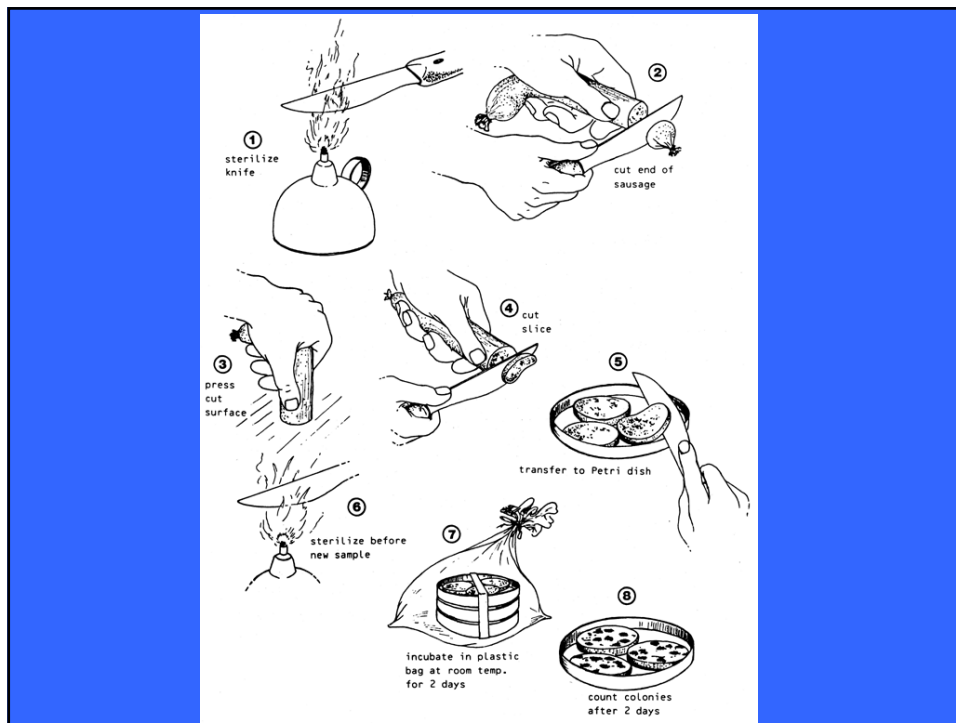
bemonsteringsoppervlak

- niet altijd uit te drukken in cm^2 , dan goed beschrijven
- bemonster een oppervlak van 1.000 - 3.000 cm^2
- voor het ophopen van monsters mag het oppervlak kleiner zijn: $\leq 100 \text{ cm}^2$ *Hmmm*

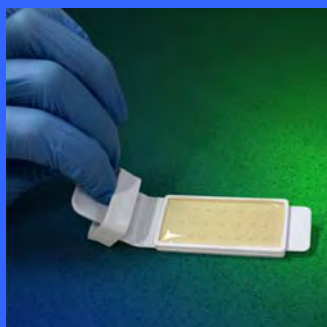
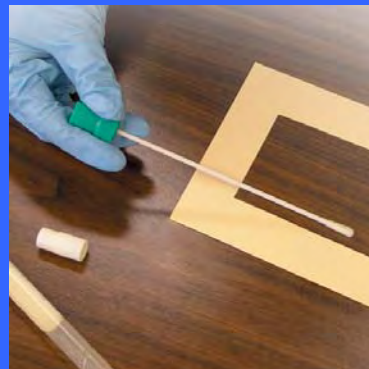
in 7.4 (veel) nadruk op door desinfectie beschadigde cellen en VBNC cellen; bemonsteren 2 uur na begin productie, of aan het eind van een productierun

Ongewenste aanwezigheid van mo aantonen

- met kweekmethoden ... deze presentatie
- met aantonen van eiwit
- met aantonen van ATP
- biofilm aantonen



Nu vervangen door...



3M Food Safety
Sample Collection
Sponges & Swabs

Designed specifically for
environmental surface sampling



Een van de aanwezigen vandaag ...

	Worst	Swab	Tape
glas	++	+	-
kunststof	++	+	-
rvs	++	+	-

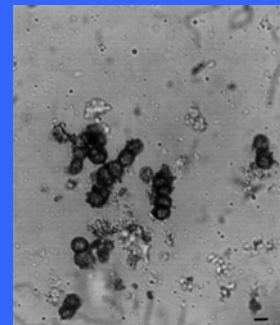
maakte zijn afstudeerverslag in 1972; zijn oudste referentie is van 1917: swab voor onderzoek van bestek

|

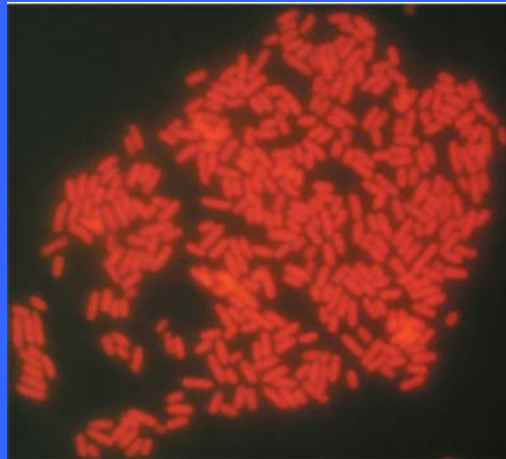
Vervolg ...

- agarworst: vervangen door Rodac, dipslides, (petri)film
- swab: bestaat nog steeds, aangevuld met spons/doek voor grote oppervlakken

ook nog wel onderzoek gedaan naar sellotape
nu vooral bij schimmelonderzoek



het aantonen van *Salmonella* op tomaat



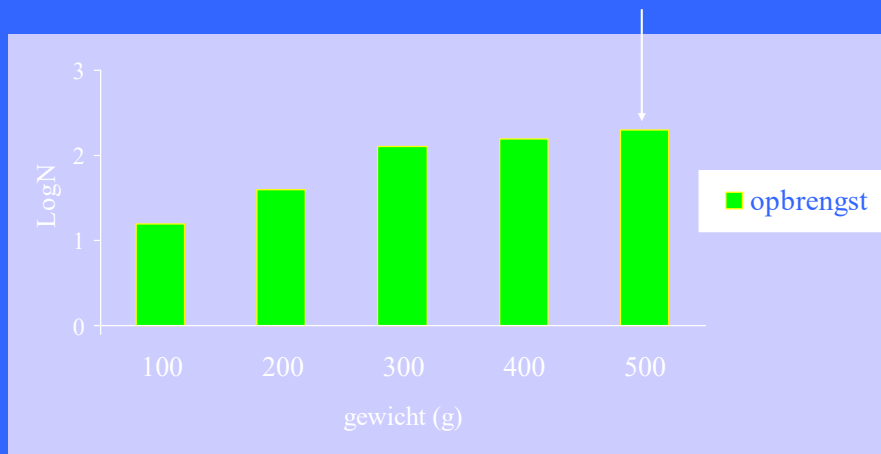
wel kunstmatig besmet met hoge aantallen

Overdracht afhankelijk van ...

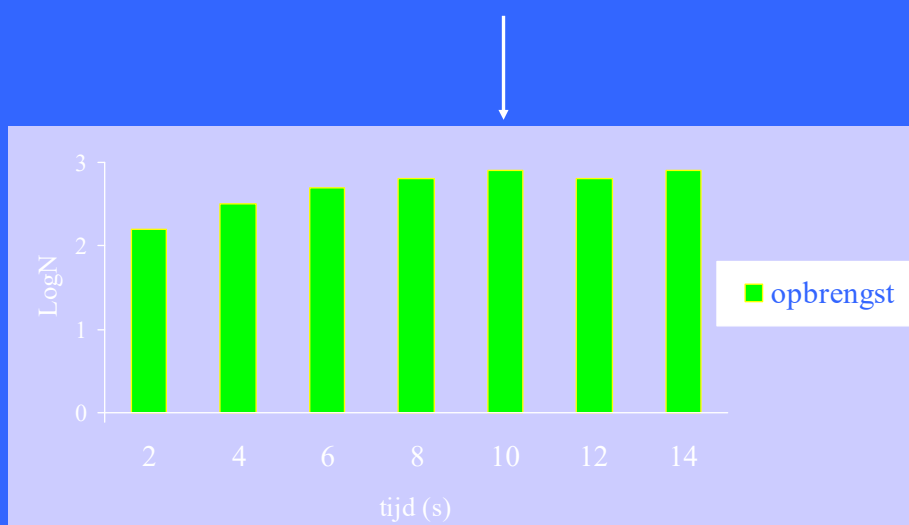
- * contacttijd
- * druk
- * oppervlak (glad/niet)
- * hoeveelheid micro-organismen



Invloed gewicht



Invloed tijd

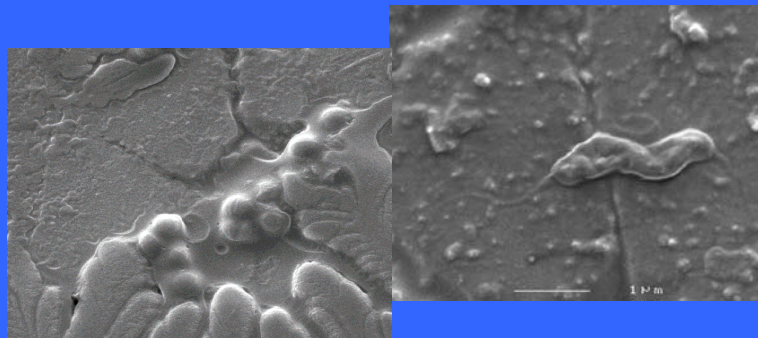


Opbrengst Rodacplaatjes

	N	Recovery (%)	
		Eén	Vijf
<i>B. cereus</i>	50	18 ± 6	33 ± 11
<i>S. aureus</i>	10	46 ± 14	88 ± 26
<i>S. Ent.</i>	14	23 ± 6	42 ± 12
<i>C. jejuni</i>	10	7 ± 3	14 ± 7

Overdracht met Rodac-platen

waarom grote verschillen ?



Swabmethode (doek, spons)

- voor een 'natte' omgeving een droge swab gebruiken tenzij inactiveringsvloeistof moet worden gebruikt
- voor een droge omgeving de swab bevochtigen als dat niet mogelijk is de swab droog gebruiken dat geeft wel minder opbrengst

Bewaren en transport

Contactplaten

- tijd tussen bemonsteren en testen zo kort mogelijk
- direct na bemonsteren in koelbox (1-8°C) vervoeren.
- binnen 48 uur na bemonsteren bebroeden
- mag ook in koelbox zonder koeling, in combinatie met een eventuele kortere bebroeding

Swabs, doeken, sponzen

- tijd tussen bemonsteren en transport zo kort mogelijk
- direct na bemonsteren in koelbox (1-8°C) vervoeren
- verder onderzoek binnen 24 uur na bemonsteren
- vertraging bij testen: monsters max 48 uur na bemonsteren bij $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Microbiologisch onderzoek

Contactplaatjes

- bebroed deze volgens voorschrift en tel de kolonies

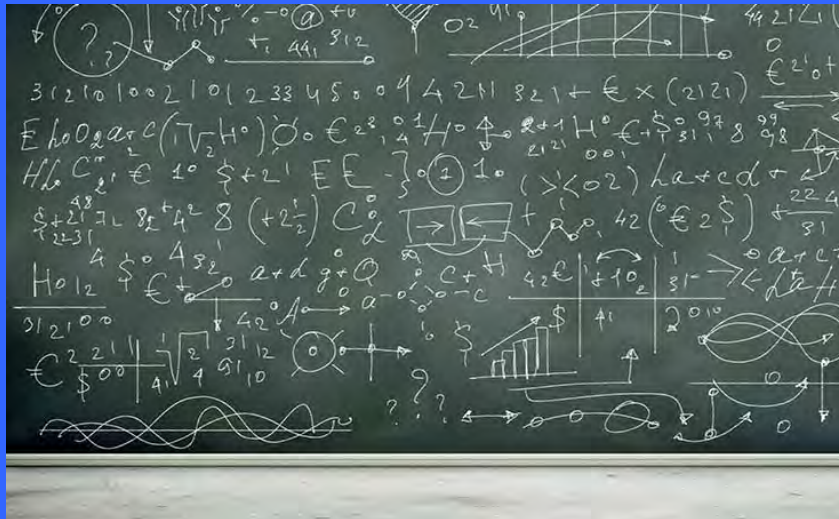
Swabs, doeken, sponzen

- voeg verdunnings- of ophopingsvloeistof toe
- bebroed de ophopingsvloeistof en strijk af op een geschikt isolatiemedium, bebroed en beoordeel + of -
- maak voor tellingen eventueel verdere verdunningen, breng deze in lege petrischalen of op al gegoten platen
- bebroed de platen en tel de kolonies

Berekenen

- ga bij het aflezen van de platen na of de specifieke kolonies zijn geteld; bevestig kolonies zonodig
- geef de resultaten duidelijk op: per voorwerp, per onderzocht oppervlak, eventueel per cm^2
- let bij de swabmethode goed op bij het berekenen van het aantal kiemen per oppervlak
- wees niet zo 'dom' om kiemtellingen voor een oppervlak aan te geven als aantal kve/g

Goed berekend?



Voldoet het aan de microbiologische criteria

maak bij voorkeur gebruik van een drieklassenplan

n = het aantal monsters ($n = 5$)

m = de waarde waar de telling onder ligt (100)

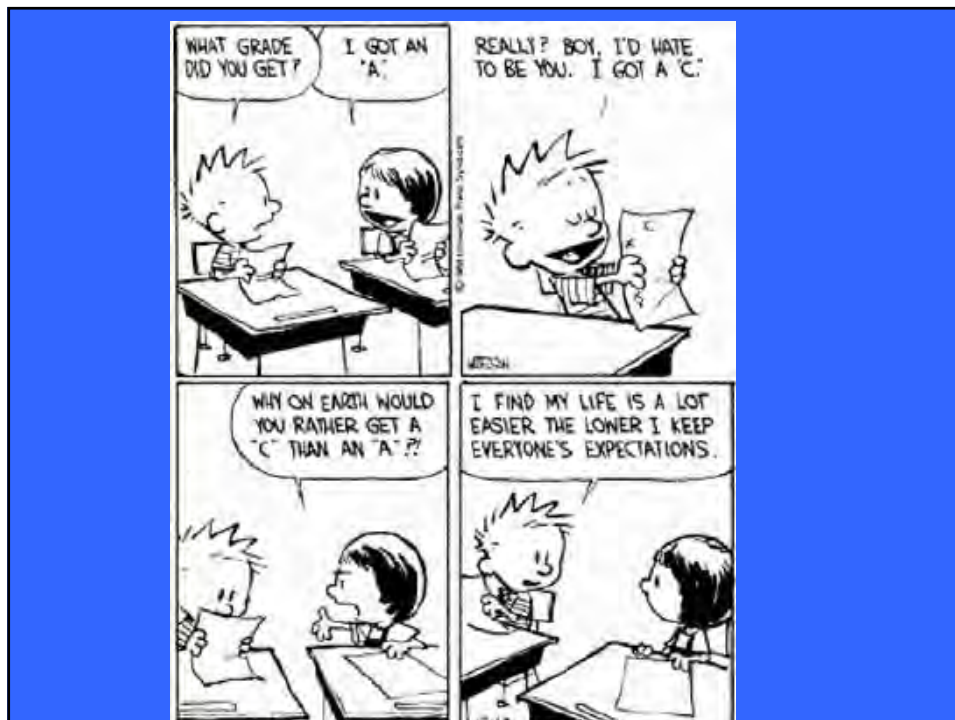
M = de waarde waarboven de telling niet mag komen (1000)

c = het aantal monsters met tellingen tussen m en M (2)

Let goed op welke (groepen van) micro-organismen je bij het onderzoek betreft en voorkom overbodig werk

Verricht de nodige aanpassingen

- achterstallig onderhoud ... snel gaan doen
- vervangen van apparatuur, transportbonden ...
- natte plekken en condens voorkomen
- zonering: mensen, transport, product
- vraag zonodig advies





Voorbehandeling van monsters voor microbiologisch onderzoek

(NEN-EN-ISO 6887- 1 t/m 6)

Adrianne Klijn

Nestlé Research Center Switzerland

1. Introductie

Het voorbehandelen van monsters is een kritieke stap in microbiologisch onderzoek. Het proces om van het laboratoriummonster naar de eerste verdunning (primaire verdunning) te gaan bestaat uit meerdere stappen zoals het transporteren, het uitwegen van een test portie, het verdunnen met een verdunningsvloeistof of vloeibaar ophopingsmedium en het homogeniseren van de monsters. Binnen deze stappen zijn er factoren die de juistheid van het eindresultaat kritisch kunnen beïnvloeden.

1.1 Transport

Al voor het transporteren van de monsters kan het fout gaan. Hoe lang kunnen monsters bewaard worden? Zo snel mogelijk analyseren na bemonsteren is natuurlijk het beste, maar niet altijd haalbaar. Vooral niet als monsters per koeriersdienst of per post verstuurd moeten worden. Voor droge stabiele producten is een langere bewaartijd geen probleem, maar voor verse producten zoals onpasteuriseerde melk of verse mosselen is dit een heel ander verhaal.

Voor sommige type monsters zijn er specifieke instructies, bijvoorbeeld voor *bivalve mollusk*, *echinoderms* en *tunicates* van primaire productiefase. Dit type monsters moet binnen 24 uur getest worden en de temperatuur wordt op verschillende tijdstippen vastgelegd.

Ook staat in deze ISO-standaard (NEN-EN-ISO 6887-3:2017) beschreven wat te doen als dit niet mogelijk is. In NEN-EN-ISO 18593:2004, die het bemonsteren van oppervlakken beschrijft, staat dat swabs binnen 24 uur getest moeten worden. Voor andere producten is de maximale lengte van de bewaartijd niet duidelijk vastgelegd.

Dan is er ook nog het transport zelf; hoe lang zijn de monsters onderweg en wat gebeurt er tijdens het transport? Hoe zorg je ervoor dat de monsters zowel in de zomer als in de winter in de juiste temperatuurrange blijven?

1.2 Test portie

Als de monsters in het laboratorium aankomen wordt er een test portie afgewogen. Dit is niet altijd even makkelijk als men bevoorbeeld denkt aan grote blokken product (bijvoorbeeld vlees of vis) die ook nog eens bevroren kunnen zijn. Kleinere monsters (doorgaans onder twee kilo) mogen ontdooid worden om zo gemakkelijk een test portie te nemen.

Maar om een test portie van grote stukken of blokken te nemen komt er soms groot materieel aan te pas zoals boormachines, hamers, bijtels en branders.

Om een representatief monster te krijgen voor producten die uit meerdere componenten bestaan bijvoorbeeld pizza (kaas, groenten, vlees, saus en deeg) zijn er twee mogelijkheden: of men pakt van elke component een gedeelte om samen een test portie te vormen, of men neemt een groter stuk van het laboratoriummonster dat alle componenten bevat, dat wordt gehomogeniseerd en vervolgens pakt men een hoeveelheid van het homogenisaat.

Kwalitatieve en kwantitatieve methoden

Het gewicht van de test portie verschilt voor kwalitatieve en kwantitatieve methoden. Voor kwantitatieve methoden wordt normaal gesproken een minimum van 10 gram monster ingewogen. Hoewel er in de nieuwe NEN-EN-ISO 6887 deel één wel een opmerking staat dat een grotere test portie (b.v 50 gram) een beter beeld kan geven. Bij sommige producten die niet homogeen zijn, bijvoorbeeld graanproducten zoals cornflakes, wordt er altijd 50 gram in plaats van 10 gram monster ingewogen.

Voor kwalitatieve methoden kan de test portie van 10 gram oplopen tot wel 375 gram. Hoewel er binnen ISO geen maximum gewicht is vast gesteld zijn er natuurlijk wel fysieke beperkingen. Bij een test portie van 375 gram is het eindvolume van de eerste verdunning minimaal 3,4 liter.

Deze hoeveelheid:

- moet gehomogeniseerd worden;
- moet binnen een bepaalde tijd de gewenste incubatie temperatuur kunnen bereiken; en
- mag niet tot ergonomische problemen leiden.

Waar ook op gelet moet worden is dat bij de ISO-standaarden die na 2016 gepubliceerd zijn standaardgewichten zijn vastgesteld. Zoals 25 gram voor de detectie van *Salmonella* spp (NEN-EN-ISO 6579:2017) en *Listeria* spp (NEN-EN-ISO 11290:2017), 10 gram voor de detectie van *Cronobacter* spp (NEN-EN-ISO 22964:2017) en *Enterobacteriaceae* (NEN-EN-ISO 21528:2017).

Dit houdt in dat test porties tot aan dit gewicht gevalideerd zijn. Maar mochten er grotere test porties van hetzelfde laboratoriummonster genomen worden, bijvoorbeeld 100 gram, dan moet er gevalideerd/geverifieerd worden om aan te kunnen tonen dat een grotere test portie geen nadelige invloed heeft op de juistheid van het eindresultaat.

1.3 Verdunnen

Voor het verdunnen van de monsters wordt over het algemeen Buffered Peptone Water (BPW) gebruikt als verdunningsvloeistof/ophopingsmedium. Om verschillende redenen zijn er uitzonderingen, bijvoorbeeld:

- Om de groei van de target micro-organisms te bevorderen, bijvoorbeeld het gebruik van 1/2 Fraser voor de detectie van *Listeria* spp.
- Om groeiremming tegen te gaan, bijvoorbeeld het gebruik van melk voor de detectie van *Salmonella* spp in cacao products).
- Ter bescherming van de target micro-organismen tegen stress, bijvoorbeeld het gebruik van 25%-35% glucose-oplossing voor de telling van osmotische gisten en schimmels.
- Om de groei van de achtergrond flora te verminderen, bijvoorbeeld het toevoegen van antibiotica.

Als er meerdere testen van de zelfde eerste verdunning gedaan worden kan dit alleen in bepaalde gevallen. Zo kunnen er geen kwantitatieve bepalingen gedaan worden als laboratorium monsters gepoold wordt.

1.4 Homogeniseren

Het homogeniseren van de monsters met de verdunningsvloeistof kan op verschillende manieren gedaan worden. Zoals bijvoorbeeld met de hand (vloeibare stoffen), met een stomacher (zachte vaste stoffen), of met een pulsifier of voedselblenders (harde vaste stoffen). Deze laatste twee kunnen alleen voor korte perioden gebuikt worden omdat de verhitting van de monsters een negatieve invloed kan hebben op het eindresultaat.

2. Instructies voor de voorbehandeling van monsters

Hoe monsters voor microbiologische analyses worden voorbereid staat beschreven in een serie ISO standaarden: NEN-EN-ISO 6887 – Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Voorbereiding van monsters en bereiding van verdunningen voor microbiologisch onderzoek.

Deze serie bestaat uit zes delen:

- Deel 1: Algemene regels voor de bereiding van de primaire verdunning en verdere decimale verdunningen
- Deel 2: Specifieke werkwijze voor de bereiding van vlees en vleesproducten
- Deel 3: Specifieke werkwijze voor de bereiding van vis en visproducten
- Deel 4: Specifieke werkwijze voor de bereiding van diverse producten
- Deel 5: Specifieke werkwijze voor het bereiden van melk en melkproducten
- Deel 6: Specifieke werkwijze voor de bereiding van monsters die zijn genomen in de primaire productiefase

De nieuwe versie van deel 1, 2, 3 en 4 zijn in 2017 gepubliceerd. Deel 5 wordt herzien en de 2013 versie van deel 6 is de huidige versie. Deel 1 omschrijft de algemene regels voor het maken van de eerste verdunning en reeks verdunningen.

In 2017 is deel 1 flink uitgebreid en geeft nu gedetailleerde instructies voor een groot aantal producten zoals:

- Bevroren producten
- Harde en droge producten
- Gedroogde producten en producten met een lage wateractiviteit
- Vloeibare en niet-viskeuze producten
- Zure producten
- Vetrijke producten
- Samengestelde producten
- Verpakte producten
- Oppervlakte monsters (swabs)

Een grote verandering binnen deel 1 is de instructie met betrekking tot de pH van de eerste verdunning, deze moet vallen binnen de range van 7,0 +/- 0,5. Voor monsters met een lagere pH maar boven een pH van 4,5 moet BPW gebruikt worden. Voor monsters met een pH tussen 3,5 en 4,5 moet double strenght BPW gebruikt worden.

Voor monsters met een pH beneden 3,5 wordt de pH niet veranderd als deze getest worden voor zuurtolerante en acidofiele bederforganismen zoals *Alicyclobacillus*. Voor gedroogde producten en producten met een lage wateractiviteit moet eerst het medium afgewogen worden en dan wordt de verdunningsvloeistof toegevoegd; dit wordt gedaan om een osmotische schok tegen te gaan.

In overleg met de klant kan het laboratorium besluiten om de monsters te poolen of als composite te testen. Bij compositing worden meerdere monsters gemixt en slechts een gedeelte van deze mix wordt getest. Bij poolen worden meerdere monsters gemixt en wordt het geheel getest. Het poolen van monsters kan zowel gedaan worden als monsters worden uitgewogen (test portie pooling of wel “dry pooling”) of als de niet-selectieve ophoping wordt overgezet naar de selectieve ophoping (enriched test portie pooling ofwel “wet pooling”).

Als het laboratorium monsters wil poolen moeten er bepaalde punten in acht genomen worden:

- Alleen monsters voor kwalitatieve analyse mogen gepoold worden.
- Alleen compositing of test portion pooling of enriched test portion pooling mag worden toegepast, geen combinaties.
- Alleen monsters van een zelfde produkttype en herkomst mogen gepoold worden.
- Het voorophopings medium moet voorverwarmd worden.
- De temperatuur moet gevolgd worden tijdens incubatie.
- De maximum incubatietijd moet aangehouden worden.

De maximale hoeveelheid van pooling is binnen ISO niet gedefinieerd. Ook hier moet het laboratorium verificatiedata hebben om aan te kunnen tonen dat pooling geen nadelige invloed heeft op de juistheid van het eindresultaat.

In de nieuwe versie van de standaard 6887 deel 2 (vis en visproducten) en deel 3 (vlees en vlees producten) is er minder veranderd. De instructies zijn meer gedetailleerd en afgestemd op de instructies beschreven in deel 1. In deel 4 is er wel weer veel veranderd. Ook hier zijn er uitgebreide instructies voor specifieke producten, zoals:

- Gedroogde producten en producten met een lage wateractiviteit
- Bloem, granen en daarvan afgeleide producten, droge diervoeders
- Gelatine
- Margarine en andere vetrijke smeersels
- Eieren en eiproducten
- Bakkerijproducten
- Verse groenten en fruit
- Gefermenteerde producten en producten met levende micro-organismen
- Dranken
- Eiwitrijke vegetarische producten



Veel veranderingen hebben betrekking op de eerste paragraaf voor gedroogde producten en producten met een lage wateractiviteit.

Bijvoorbeeld voor monsters die opzwellen in water moet men enzymen aan de eerste verdunning toevoegen om dit tegen te gaan; cellulase voor monsters met carboxymethylcellulose, johannisbroodpitmeel, carob, guar en cassia gom; alpha-amylase voor graanproducten en papain voor gelatine.

Voor cacao en cacao bevattende producten moet magere UHT-melk of gereconstitueerd mager melkpoeder in water gebruikt worden. Tween 80 wordt toegevoegd als emulgator tenzij het product zelf een emulgator bevat. Brilljantgroenoplossing mag worden toegevoegd voor cacaoproducten met een hoge achtergrond van Grampositieve bacteriën. De verdunningsvloeistof moet voorverwarmd en grote brokken chocola moeten gesmolten worden. Dit alles om zeker te zijn dat de test portie zich goed vermengt met de verdunningsvloeistof.

Producten met een hoog zoutpercentage, zoals bijvoorbeeld bouillonblokjes, moeten hoger verdund worden zodat de uiteindelijke concentratie van zout lager dan 1 % wordt. Ook zijn er specifieke instructies voor producten die de groei van bacteriën kunnen remmen zoals bijvoorbeeld koffie, thee, kruiden en specerijen. Hier worden of neutraliserende middelen toegevoegd (bijvoorbeeld K_2SO_3 voor knoflook maar ook kaneel), maar vaak moet een hogere verdunning toegepast worden die kan oplopen tot wel 1:1.000.

3. To validate or to verify that is the question

Binnen NEN-EN-ISO 16140-1:2016 zijn begrippen zoals validatie en verificatie duidelijk gedefinieerd. De definitie van valideren is: *“establishment of the performance characteristics of a method and provision of objective evidence that the performance requirements for a specified intended use are fulfilled”*. De definitie van verifiëren is: *“demonstration that a validated method functions in the user’s hands according to the method’s specifications determined in the validation study and is fit for its purpose”*.

Toch worden deze termen anders gebruikt in de verschillende ISO standaarden. In de presentatie zijn drie voorbeelden waar verwezen wordt naar valideren/verifiëren maar waar de verwachtingen van het protocol dat gebruikt moet worden wezenlijk verschilt van dat wat is vast gelegd in NEN-EN-ISO 16140-1:2016.

Moet er geverifieerd worden per food type, per product type of alleen maar per food category? Tussen verificatie per food type en item zit een enorm verschil.

Tabel 1. Voorbeelden van food category, type en item.

Food category	Food type	Food item
Heat processed milk and dairy products	Pasteurized milk-based products	Pasteurized milk Butter Soft cheese (bijv. Brie)
	Sterilized or UHT dairy products	UHT milk Canned milk or cream
	Dry	Milk powder Powder for milk based desserts
Fresh produce and fruits	Cut ready-to-eat vegetables	Salads Shredded carrots Leafy vegetables
	Sprouts	Fenugreek Alfalfa
Chocolate, bakery products and confectionary	Low moisture	Crackers Cookies
	Dry and sugared low moisture (aw <0.85)	Cake Marzipan
	Dry and sugared low moisture (aw <0.65)	Chocolate Candy syrups

Hoe moeten de monsters besmet worden, hoe hoog is deze besmetting en moeten de culturen gestressed worden. Hoeveel monsters moeten er meegenomen worden en welke criteria worden er toegepast? Al deze vragen kunnen verwarring opleveren tussen laboratoria en accreditatieservices en het zou goed zijn als dit beter gedefinieerd is.



Op zoek naar *Campylobacter*!

(NEN-EN-ISO 10272)

Wilma Jacobs-Reitsma
RIVM-Z&O

Inleiding

De meest recente zoonoserapportage van de EU geeft aan dat ook in 2016 *Campylobacter* weer de meest gerapporteerde bacteriële pathogeen als veroorzakers van gastroenteritis bij de mens was. Met 246.307 gerapporteerde bevestigde gevallen in 2016 binnen de EU komt *Campylobacter* opnieuw ruim uit boven de in dat jaar 94.530 gerapporteerde gevallen van *Salmonella*.

Vanaf 1 januari 2018 is nu ook Europese regelgeving van kracht geworden met betrekking tot *Campylobacter*. In Verordening (EU) 2017/1495 van de Commissie, tot wijziging van Verordening (EG) nr. 2073/2005 wat betreft *Campylobacter* in vleeskuikenkarkassen, is een Proceshygiëncriterium (PHC) vastgelegd. Dit beschrijft een bemonsteringsschema ($n = 50$, $c = 20$) voor pluimveekarkassen na de koeling, middels monsters nekvel, met een grenswaarde van 1000 kve/g ($m=M$). De voorgeschreven testmethode is NEN-EN-ISO 10272-2.

Normontwikkeling *Campylobacter* van 1995 tot heden

De eerste internationale standaard (ISO) voor *Campylobacter* werd gepubliceerd in 1995, en betrof alleen nog de detectie van *Campylobacter* (in food and animal feed). Het voorschrift bestond uit 2 opties voor een ophoping: microaerobe ophoping van 18 uur bij 42 °C in Preston bouillon of microaerobe ophoping in Park en Sanders bouillon, waarbij eerst 4 uur bij 32 °C werd bebroed, gevolgd door toevoeging van het selectieve supplement en 2 uur bebroeden bij 37 °C, waarna nog 40-42 uur werd bebroed bij 42 °C.

Beide ophopingen werden gevolgd door uitplaten op Karmali selectief medium en een tweede selectief medium naar keuze; beide met microaerobe bebroeding gedurende 24 – 72 uur bij 42 °C. De Park en Sanders methode was in de praktijk niet erg werkbaar. En mede door het tamelijk selectieve karakter van de Preston bouillon en de relatief korte incubatie tijd van 18 uur voldeed ook deze procedure niet altijd. Met name voor monstermateriaal met lage aantallen en sub-lethaal beschadigde campylobacters.

Aangepaste norm gepubliceerd in 2006

Na de noodzakelijke revisie van ISO 10272:1995 werd daarom in 2006 ISO 10272-1 gepubliceerd, met daarin de wat minder selectieve Bolton bouillon als ophopingsmedium en met 4-6 uur bij 37 °C gevolgd door 44 ± 4 uur bij 41,5 °C nog steeds toegespitst op lage aantallen en sublethale cellen. Uitplaten diende plaats te vinden op het selectieve mCCDA medium en een tweede selectief medium naar keuze. De bebroedingstemperatuur ging om praktische reden van 42 °C naar 41,5 °C (gebruik van dezelfde stoof voor zowel *Campylobacter* als *Salmonella* onderzoek).

Tegelijkertijd werd ook een methode voor telling van *Campylobacter* gepubliceerd, als een Technical Specification (kortere procedure en voorloper van een volledige ISO) (ISO/TS 10272-2:2006). Deze telmethode betrof het in duplo uitplaten van een verdunningsreeks van het monstermateriaal op de *Campylobacter*-selectieve mCCDA agar platen (microearoob bebroeden gedurende 44 ± 4 uur bij $41,5^\circ\text{C}$).

Campylobacter in blindedarmmest van pluimvee

Hoewel blindedarmmest van pluimvee (vleeskuikens) formeel niet tot de scope van deze ISO/TS behoorde (Food and Animal Feed), was dit een zeer bruikbare methode om *Campylobacter* in deze matrix te tellen, waarbij aantallen tot 10^8 kve/g geen uitzondering zijn. Het rechtstreeks uitplaten van dit type monstermateriaal (bijvoorbeeld via agarswabs) werd al langer met succes toegepast, en staat onder meer ook beschreven in NEN methode 6252 (voorheen de PVE methode). In 2006 werd gestart met een ISO werkgroep om een apart deel van ISO 10272 te maken voor dit type monsters (scope: samples from the primary production stage).

CEN mandaat M/381

In 2006 werd ook de eerste aanzet gegeven voor het zogenoemde “CEN mandaat M/381”. Met dit mandaat vroeg de Europese Commissie aan de European Committee for Standardization (CEN), Europese tegenhanger van ISO, om gestandaardiseerde én gevalideerde methoden op te leveren, met betrekking tot de wetgeving in voedselveiligheid (EN 2073/2005).

Voor een 15-tal (microbiologische) analysemethoden zouden de prestatiekenmerken bepaald moeten worden middels uitvoeren van interlaboratorium studies. Uiteindelijk is dit hele CEN mandaat project in 2011 echt van start gegaan, met als einddoel de publicatie van al deze 15 voorschriften als EN-ISO methode, inclusief de prestatiekenmerken, uiterlijk in juni 2017. Ook de beide delen van ISO 10272 werden in dit project meegenomen, met (N)VWA als projectleider voor deel 1 en RIKILT (later RIVM) als projectleider voor deel 2.

Problemen door ESBL producerende bacteriën

Voorafgaand aan het uitvoeren van de interlabstudies werd opnieuw een revisie van de bestaande ISO voorschriften uit 2006 doorgevoerd. Met name de ophopingsmethode bleek steeds meer problemen op te leveren door de opkomst van de ESBL producerende bacteriën, onder ander in te onderzoeken pluimveevleesmonsters. Deze bacteriën zijn bestand tegen derde generatie beta-lactams zoals het selectieve cefoperazone in Bolton bouillon en kunnen *Campylobacter* daarbij compleet overgroeien, wat tot onderrapportage kan leiden.

Dit kwam onder andere naar voren in de EU baseline study uit 2008, waarbij monsters pluimveeproducten opvallend vaak positief waren bij direct uitplaten op mCCDA, maar negatief werden bevonden na ophoping in Bolton bouillon.

Met name voor dit type monsters werd opnieuw de ophoping in Preston bouillon als optie in de ISO opgenomen, maar nu wel met een incubatieduur van 20-26 uur in plaats van 18 uur. Ook het direct uitplaten op selectieve agar (mCCDA) werd opgenomen als een optie voor detectie; ook, of zelfs vooral, voor blindedarmmestmonsters van pluimvee.

Omdat binnen ISO inmiddels de algemene Scope voor microbiologische methoden was overgegaan van “Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders” naar “Microbiologie van de voedselketen” was een apart deel van NEN-EN-ISO 10272 voor “samples from the primary production stage” niet meer nodig.

Aangepaste normen gepubliceerd in 2017

In juni 2017 werden de nieuwe versies van NEN-EN-ISO 10272 deel 1 en deel 2 officieel gepubliceerd. In het voorwoord van een ISO methode wordt tegenwoordig ook opgenomen wat de (technische) wijzigingen zijn ten opzichte van de vorige versie. De introductie vermeldt vervolgens of deze wijzigingen als “minor” of “major” worden beschouwd.

Bij minor changes zouden bijvoorbeeld de prestatiekenmerken (validatie/verificatie) niet op nieuw hoeven te worden bepaald, terwijl dit bij major changes wel het geval is.

Ook al worden de wijzigingen voor beide delen van NEN-EN-ISO 10272 omschreven als “minor”, toch is het van belang om in het eigen toepassingsgebied op het laboratorium na te gaan welke wijzigingen dit precies zijn en hoe deze dan moeten worden toegepast in de praktijk.

Een overzicht van de belangrijkste wijzigingen in de huidige versies van NEN-EN-ISO 10272 ten opzichte van hun voorgaande versies staat weergegeven in de posterpresentatie die na deze tekst volgt (CHRO 2017, Nantes).

Achtergrond informatie

Anonymous. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. The Commission of the European Communities, Brussels.

Anonymous. 2017c. Commission Regulation (EU) 2017/1495 of 23 August 2017 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 as regards *Campylobacter* in broiler carcasses.

Biesta-Peters, E.G., I. Jongenburger, E. de Boer; W.F. Jacobs-Reitsma. Validation of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. Submitted for Special Issue of International Journal of Food Microbiology, 2018.

Corry, J.E.L., Atabay, H.I., 2012. Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacters. In: Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. (Eds.), Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. Royal Society of Medicine, Cambridge, pp. 403–450.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008; Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. EFSA Journal 8(8): 1522.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 2017 15(12):5077 (228 pp).

DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5077

Jacobs-Reitsma, W. F., U. Lyhs, and J. Wagenaar. 2008. Chapter 35: *Campylobacter* in the Food Supply. p. 627-644. In: *Campylobacter*, 3rd Edition. I. Nachamkin, C.M. Szymanski, and M.J. Blaser (eds.), ASM, Washinton DC.

Jacobs-Reitsma, W.F., I. Jongenburger, E. de Boer, E.G. Biesta-Peters. Validation of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 2: Colony-count technique. Submitted for Special Issue of International Journal of Food Microbiology, 2018.

NEN 6252:2010 nl – Detectie van thermotolerante *Campylobacter* met Preston en mCCDA in mest en vlees, afkomstig van pluimvee.

NEN 6269:1996 nl – Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele *Campylobacter*-bacteriën.

NPR 6270:1996 nl – Bacteriologisch onderzoek van water – Toelichting bij het onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele *Campylobacter*-bacteriën.

NEN ISO 10272:1995. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. International Organization for Standardization, Geneva.

NEN ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. International Organization for Standardization, Geneva.

NPR ISO/TS 10272-2:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 2: Colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneva.

NPR ISO/TS 10272-3:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 3: Semi-quantitative method. International Organization for Standardization, Geneva.

NEN EN ISO 10272-1:2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. International Organization for Standardization, Geneva.

NEN EN ISO 10272-2:2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 2: Colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 17995:2005. Water quality -- Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species. International Organization for Standardization, Geneva.



Publication of revised International Standard ISO 10272 for detection and enumeration of *Campylobacter* in the food chain

Wilma Jacobs-Reitsma, on behalf of CEN TAG 19

ISO 10272-1:2017 specifies a horizontal method for the **detection by enrichment or direct plating** of *Campylobacter* spp.

It cancels and replaces the first edition (ISO 10272-1:2006)

ISO 10272-2:2017 specifies a horizontal method for the **enumeration** of *Campylobacter* spp.

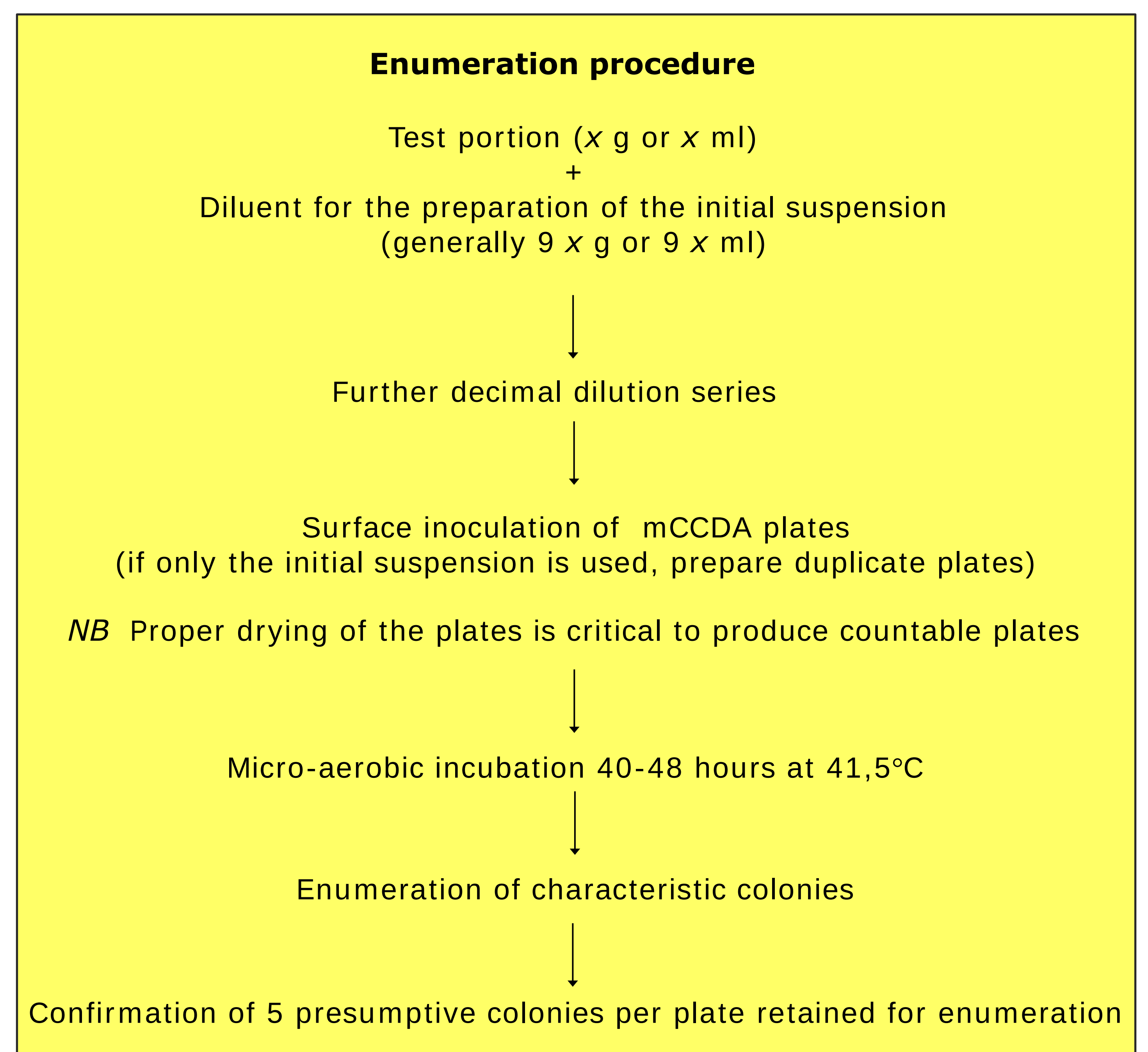
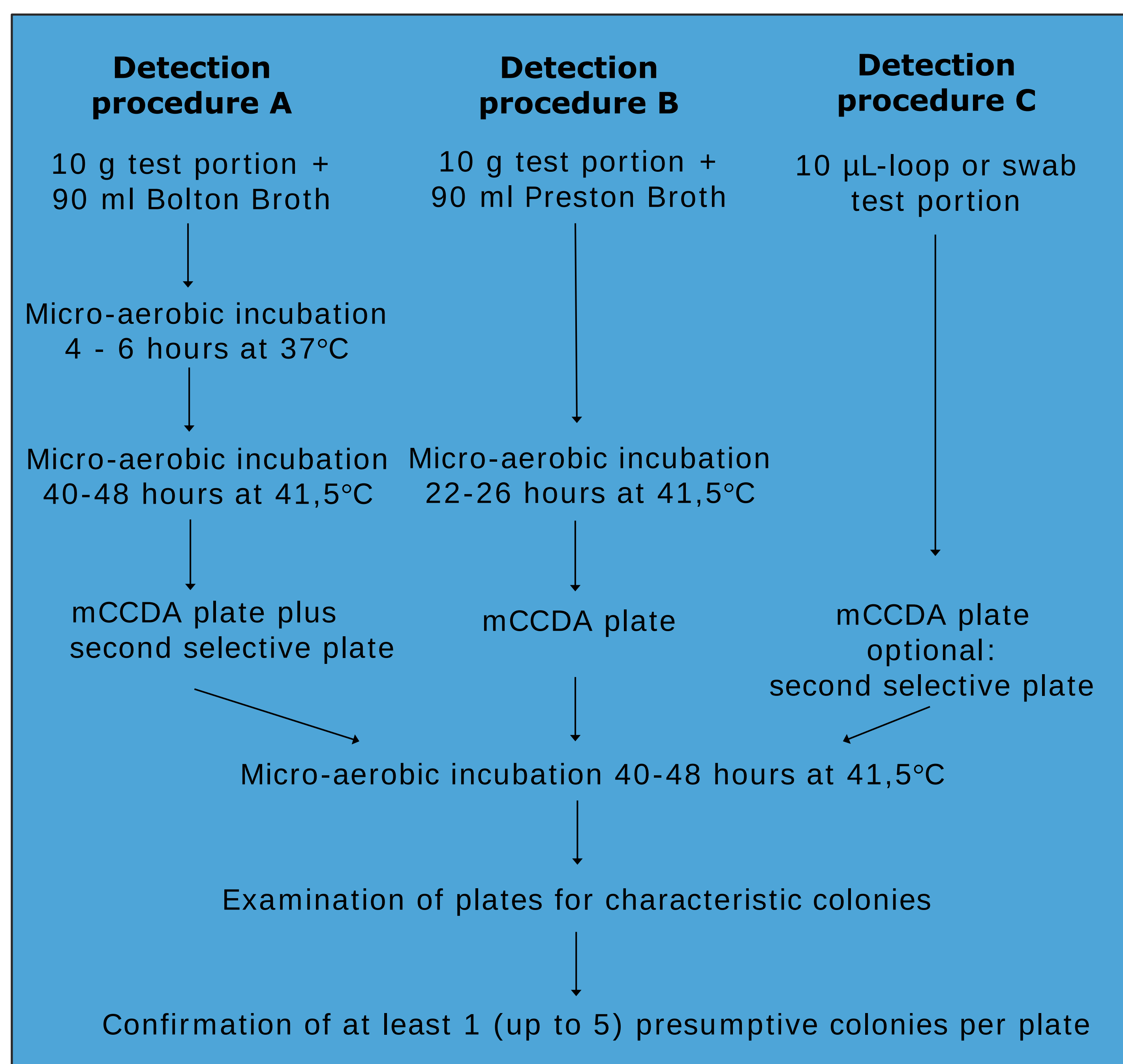
It cancels and replaces ISO/TS 10272-2:2006

- * samples from the primary production stage have been added to the scope.
- * performance testing for the quality assurance of the culture media has been added to the normative Annex on the preparation of the culture media.
- * the confirmation tests on study of microaerobic growth at 25°C and aerobic growth at 41,5°C were replaced by the study of aerobic growth at 25°C.

- * the detection method was extended to include the option of a second enrichment broth (Preston broth), primarily to overcome problems with background flora resistant to third generation β -lactams (like cefoperazone in Bolton broth).
- * the detection method was extended to include the option of direct plating on mCCDA.
- * the note on use of closed containers with reduced headspace as an alternative to incubation in a microaerobic atmosphere was deleted.
- * performance characteristics (specificity, sensitivity and LOD₅₀ (level of detection at 50%)) as obtained from the interlaboratory validation study have been added to an informative Annex.

- * serial dilutions are plated in single instead of in duplicate, to be in line with ISO-7218.

- * performance characteristics (repeatability standard deviation, repeatability limit, reproducibility standard deviation, reproducibility limit) as obtained from the interlaboratory validation study have been added to an informative Annex.



Purification on non-selective blood agar plates

Confirmation

- Microscopy for morphology and motility
- Oxidase test
- Absence of growth after **aerobic** incubation 40-48 hours at 25 °C

Identification (optional)

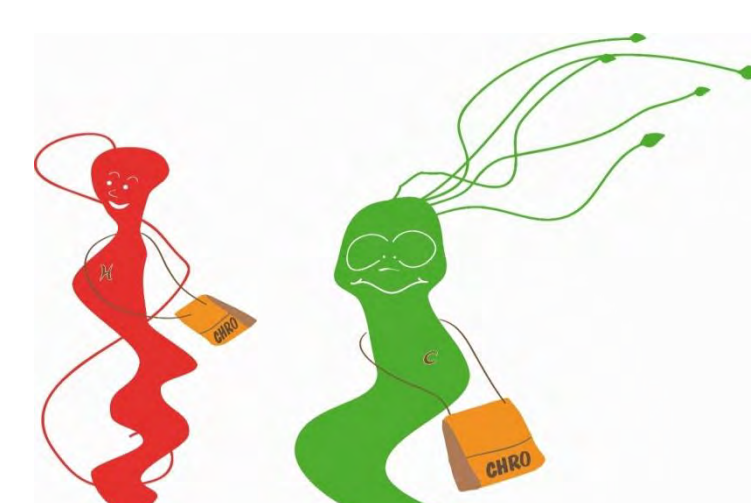
- Detection of catalase activity
- Detection of hippurate hydrolysis
- Detection of indoxyl acetate hydrolysis

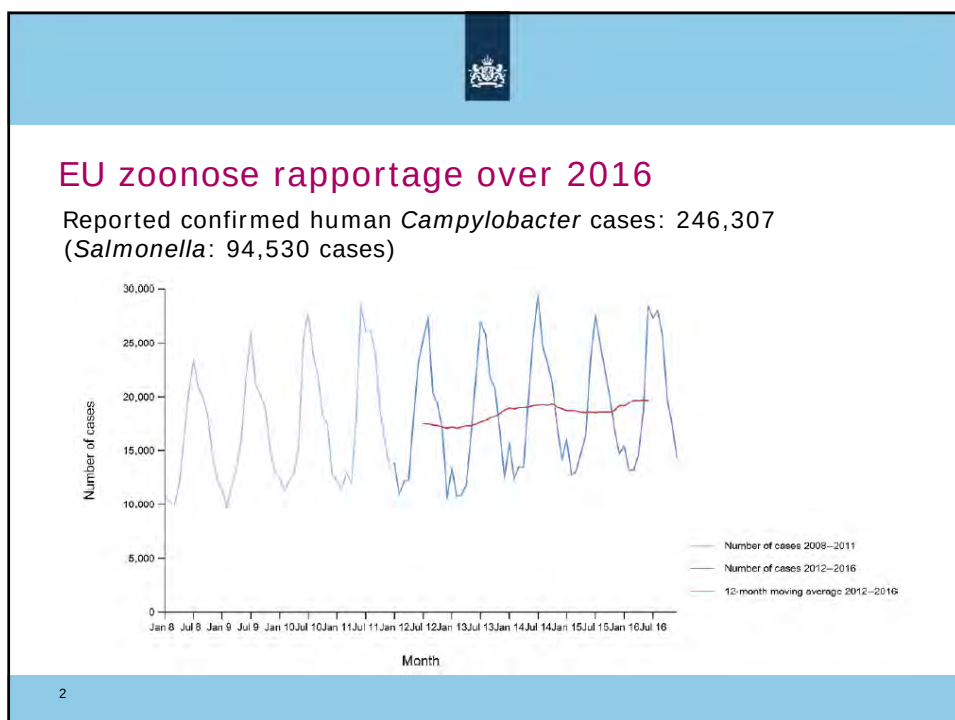
Report result

Campylobacter detected/not detected in sample

Calculate (see ISO 7218) and report result

as the number of *Campylobacter* in cfu per g or ml of sample







Achtergrondinformatie verschillende methoden

- Handbook of Culture Media for Food and Water
 - Corry and Atabay, 2012. Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacters.
- ISO (International Organization for Standardization)
 - Microbiology of the food chain: 10272
 - Water: 17795
- NEN (Koninklijk Nederlands Normalisatie-instituut)
 - mest en vlees, afkomstig van pluimvee: 6252
 - Water: 6269/6270

3



Campylobacter in EU wetgeving

- VERORDENING (EU) 2017/1495 VAN DE COMMISSIE tot wijziging van Verordening (EG) nr. 2073/2005 wat betreft *Campylobacter* in vleeskuikenkarkassen
- Proceshygiëncriterium (PHC)
- Karkassen van vleeskuikens -> nekvelen
- Met ingang van 1-1-2018

Levensmiddelen-categorie	Micro-organismen	Bemonsterings-schema		Grenswaarden		Referentieanalyse-methode	Stadium waarvoor het criterium geldt	Maatregelen bij ontoereikende resultaten
		n	c	m	M			
2.1.9 Karkassen van vleeskuikens	<i>Campylobacter</i> spp.	50 (%)	c = 20 M.i.v. 1.1.2020: c = 15 M.i.v. 1.1.2025: c = 10	1 000 cfu/g		EN ISO 10272-2	Karkassen na het koelen	Verbetering van de hygiëne bij het slachten, herziening van de procesbeheersing, de oorsprong van de dieren en de bioveiligheidsmaatregelen op de bedrijven van oorsprong

4



Historie ISO 10272

- NEN ISO 10272:1995. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*.
 - microaerobe ophoping in Preston bouillon, 18 uur bij 42°C.
 - microaerobe ophoping in Park en Sanders bouillon, 4 uur bij 32°C, toevoegen selectieve supplement & 2 uur bij 37 °C, 40-42 uur bij 42°C.
 - uitplaten op Karmali agar en een tweede selectief medium naar keuze; microaeroob 24 – 72 uur bij 42°C.



Historie ISO 10272, vervolg

- NEN ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method
 - microaerobe ophoping in Bolton bouillon, 4-6 uur bij 37°C, vervolgens 44 ± 4 uur bij 41,5°C.
 - uitplaten op mCCDA en een tweede selectief medium naar keuze, microaeroob 44 ± 4 uur bij 41,5°C.
- NPR ISO/TS 10272-2:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 2: Colony-count technique
 - Verdunningsreeks in duplo op mCCDA, microaeroob 44 ± 4 uur bij 41,5°C.



Ontwikkelingen ISO 10272 in loop der tijd

- 1995: NEN ISO 10272:1995 (*Campylobacter* Detectie)
- 2006: NEN ISO 10272-1:2006 (*Campylobacter* Detectie)
- 2006: NPR ISO/TS 10272-2:2006 (*Campylobacter* Telling)
- 2006: Eerste aankondigingen m.b.t. CEN Mandate/381
- 2006: Start deel 4 m.b.t. Primary Production Stage monsters
- 2009: Resolutie om te starten met revisie deel 1 en deel 2
- 2009: 1st TAG 19 meeting (5-10-2009, Uppsala)
- 2010: Publicatie NPR ISO/TS 10272-3 (semi-kwantitatief)

7



Ontwikkelingen ISO 10272 in loop der tijden

- 2013: NWIP stemming (28-11-2012 - 28-02-2013)
- 2013: Intrekken NPR ISO/TS 10272-3 (te weinig in gebruik)
- 2013: Opstellen voorlopige versies deel 1/deel 2 ter gebruik in de ILS (inter lab studie), CEN mandate
- 2013: ILS telling (12-6)
- 2013: ILS detectie (4-11 opties B&C; 18-11 optie A)
- 2015: DIS stemming (12-2-2015 - 12-5-2015)
- 2016: pre-FDIS ronde (12-10-2016 - 2-12-2016)
- 2017: FDIS stemming (1-2-2017 - 29-3-2017)

8



ISO 10272:2017 !



-> www.iso.org



-> www.nen.nl

9



Huidige versies t.o.v. vorige versies

- Overzicht van belangrijkste veranderingen opgenomen in het Voorwoord
- Introductie geeft aan dat de veranderingen voor beide delen gezien worden als “minor”.
- In principe geen her-validatie/her-verificatie nodig
- Wel nalopen op de wijzigingen (uitbreidingen !)

This second edition cancels and replaces the first edition (ISO 10272-1:2006), which has been technically revised with the following main changes:

- samples from the primary production stage have been added to the scope;
- the detection method was extended to include the option of direct plating on mCGDA;
- the use on the use of closed containers with reduced headspace as an alternative to incubation in a microaerobic atmosphere has been deleted;
- the confirmation tests on study of microaerobic growth at 25 °C and aerobic growth at 41.5 °C were replaced by the study of aerobic growth at 25 °C;
- performance testing for the quality assurance of the culture media has been added to Annex B;
- performance characteristics have been added to Annex C.

This first edition cancels and replaces ISO/TS 10272-2:2006, which has been technically revised with the following main changes:

- samples from the primary production stage have been added to the scope;
- serial dilutions are plated in single instead of in duplicate, to be in line with ISO 7218;
- the confirmatory tests on study of microaerobic growth at 25 °C and aerobic growth at 41.5 °C were replaced by the study of aerobic growth at 25 °C;
- performance testing for the quality assurance of the culture media has been added to Annex B;
- performance characteristics have been added to Annex C.

10



NEN-EN-ISO 10272-2:2017

**INTERNATIONAL
STANDARD**

**ISO
10272-2**

First edition
2017-06

**Microbiology of the food chain —
Horizontal method for detection and
enumeration of *Campylobacter* spp. —**

Part 2:
Colony-count technique

Microbiologie van de voedselketen:

ISO 10272-1:2017 specifies a horizontal method for the detection by enrichment or direct plating of *Campylobacter* spp. It is applicable to

- products intended for human consumption,
- products intended for animal feeding,
- environmental samples in the area of food and feed production, handling, and
- samples from the primary production stage such as animal faeces, dust, and swabs.

3.1
Campylobacter
microorganism forming characteristic colonies on solid selective media when incubated in a microaerobic atmosphere at 41,5 °C, and which possesses the characteristic morphology and motility and biochemical and growth properties described when the tests are conducted in accordance with this document

Note 1 to entry: This document targets the thermotolerant *Campylobacter* species relevant to human health. The most frequently encountered and relevant to human health are *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. However, other species have been described (*Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* and others).

3.2
enumeration of *Campylobacter*
determination of the number of colony-forming units (cfu) of *Campylobacter* (3.1) found per gram, per millilitre, per square centimetre or per sampling device when the test is conducted in accordance with this document

11



ISO 10272 – part 1: Detection (1)

- **Procedure A:** Bolton bouillon, microaeroob bij 37°C gedurende 4 - 6 h, vervolgens bij 41,5°C gedurende 44 h ± 4 h. Uitplaten op mCCDA en op een ander *Campylobacter*-selectief medium (met andere selectieve principes dan mCCDA).
- **Procedure B:** Preston bouillon, microaeroob bij 41,5°C gedurende 24 h ± 2 h. Uitplaten op mCCDA.
- **Procedure C:** Direct uitplaten op mCCDA, microaeroob bij 41,5°C gedurende 44 h ± 2 h.

● **Resultaat:** *Campylobacter* aangetoond/niet aangetoond in het monster

12



ISO 10272 – part 1: Detection (2)

Depending on the type of sample and the purpose of the test, one or more of three different detection procedures is/are used:

- **detection procedure A:** Detection of *Campylobacter* by enrichment, in samples with low numbers of campylobacters and low level of background microflora and/or with stressed campylobacters, e.g. cooked or frozen products;
- **detection procedure B:** Detection of *Campylobacter* by enrichment, in samples with low numbers of campylobacters and high level of background microflora, e.g. raw meats (including poultry) or raw milk;
- **detection procedure C:** Detection of *Campylobacter* by direct plating, in samples with high numbers of campylobacters, e.g. faeces, poultry caecal contents or raw poultry meat. This can be used in combination with ISO 10272-2 in order to count numbers of *Campylobacter* per g, per ml, or per cm² in the test material.

If little information is available concerning the best method for the particular type of sample to be tested, then use detection procedure C, in parallel with detection procedure(s) A and/or B.

In general, detection procedure B is useful for products (including cooked or frozen) that contain significant numbers of microflora resistant to third generation β -lactams like cefoperazone. Cefoperazone is used in Bolton broth (detection procedure A) as well as in mCCD agar. Preston broth (detection procedure B) uses different selective principles and is therefore more suitable to suppress this type of resistant microflora.



Microaeroob bebroeden

- Microaeroob versus microaerofiel: taalkundig verschil
- Gassamenstelling: O₂ 5 % $\pm$ 2 %, CO₂ 10 % $\pm$ 3 %, optioneel H₂ $\leq$ 10 %, in balans met N₂.
- ISO 10272-1:2006 NOTE 2 As an alternative to incubation in a microaerobic atmosphere, the enrichment can be incubated in screw-capped bottles or flasks filled with enrichment broth, **leaving a headspace of less than 2 cm, and tightly closing the caps.**
- Na veel discussie: **NOTE 2 weggehaald uit ISO 10272-1:2017** wegens onmogelijkheid om microaerobe bebroeding in flessen met weinig kopruimte te standaardiseren.
- Flessen/buizen zelf in microaeroob milieu: losse doppen

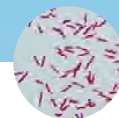


ISO 10272 – part 2: Enumeration

- In navolging van ISO 7218: in **enkelvoud** uitplaten van een decimale verdunningsreeks op mCCDA (wanneer alleen de primaire verdunning wordt gebruikt: in duplo)
 - 0,1 ml per plaat (standaard 9 cm Ø)
 - 1 ml op een 14 cm Ø plaat dan wel 3 standaard platen

NOTE Drying of the plates is critical to produce countable plates. Each laboratory has to use its own standardised way to dry the plates in a proper way.

- Microaeroob bebroeden bij 41,5°C gedurende 44 h $\pm$ 2 h.
- Berekeningen eindresultaat: **zie ISO 7218**



Deel 1 en Deel 2: Bevestiging

- Deel 1:

9.5.2.1 Select at least one typical or suspect *Campylobacter* colony (9.4.3) for purification and confirmation. One confirmed isolate per sample is sufficient. If the first colony is negative, select up to four more suspect colonies.

- Deel 2:

9.4.2.1 For confirmation, take five presumptive colonies from each dish retained for enumeration (9.3.2).

- Bevestigingsreacties inzetten na reinstrijk op niet-selectieve bloedagarplaat

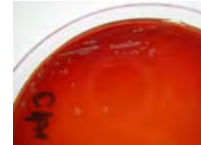
NOTE The suspect colony could be previewed for characteristic morphology and motility before streaking on blood agar.



Deel 1 en deel 2: Bevestiging

2006: Table 1 — Characteristics of *Campylobacter* spp.

Morphology (9.4.3)	small curved bacilli
Motility (9.4.3)	characteristic
Microaerobic growth at 25 °C (9.4.4)	—
Aerobic growth at 41,5 °C (9.4.5)	—
Oxidase (9.4.6)	+



2017: Table 1 — Characteristics of *Campylobacter*

Morphology (9.4.3)	Small curved bacillia ^a
Motility (9.4.3)	Characteristic corkscrew darting ^a
Aerobic growth at 25 °C (9.4.4)	—
Oxidase activity (9.4.5)	+

+ Positive.
— Negative.

^a Older cultures may rapidly lose their characteristic shape and motility and turn into less motile coccoid-forms.



Deel 1 en deel 2: Identificatie (optioneel)

2006: Table 2 — Characteristics of *Campylobacter* species

Characteristic	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalase (9.5.2)	+	+	+	— or slight
Nalidixic acid (9.5.3)	S ^a	S ^a	R/S ^b	S
Cephalothin (9.5.3)	R	R	R	S
Hydrolysis of hippurate (9.5.4)	+	—	—	—
Indoxyl acetate (9.5.5)	+	+	—	+

Key: + = positive; — = negative; S = sensitive; R = resistant.

^a An increase in the resistance to nalidixic acid of *C. jejuni* and *C. coli* strains has been shown.

^b Both sensitive and resistant *C. lari* strains exist.

2017: Table 2 — Characteristics of *Campylobacter* species

Characteristic	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalase activity (9.5.2)	+	+	+	— or weak
Hippurate hydrolysis (9.5.3)	+ ^a	—	—	—
Indoxyl acetate hydrolysis (9.5.4)	+	+	—	+

+ Positive.
— Negative.

^a Some hippurate-negative *C. jejuni* strains have been reported.



Deel 1 en deel 2: bevestiging/identificatie

2017:

As an alternative, or in addition, to the confirmation and identification tests described in this document, other tests (PCR tests, serological methods, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis, etc.) can be used, providing the suitability of the alternative procedure is verified (see ISO 7218).

- TAG 3 on " General requirements relating to molecular methods for detection and quantification of microorganisms"
 - Werkt aan PCR assays voor *Campylobacter* identificatie (≠ directe detectie vanuit ophoping)
 - Bedoeling om dit te zijn tijd als een (informatieve) Annex aan ISO 10272:2017 toe te voegen

Deelnemers ILS m.b.t. bepalen Prestatiekenmerken



Campylobacter



Telling
(n=15)

Detectie
(n=17)

Czech Rep.
France
Germany
Iceland
FYROM
Netherlands(2x)
Poland

Slovakia

Sweden (2x)
Switzerland
UK (3x)

Austria
France
Germany
Iceland

Netherlands (3x)
Poland
Romania
Slovakia
Slovenia
Spain (2x)
Sweden
Switzerland
UK (2x)



Prestatiekenmerken deel 1, Bolton (Procedure A)



	Frozen spinach			Minced meat		
	Blank	Low	High	Blank	Low	High
Number of participating collaborators	17	17	17	17	17	17
Number of collaborators retained after evaluation of the data	16	16	16	16	16	16
Number of samples tested	136	136	136	136	136	136
Number of sample results retained after evaluation of the data	128	128	128	128	128	128
Sample size in g	10	10	10	10	10	10
Level of inoculum (cfu/sample)	0	1,6	16	0	1,3	9,6
Accuracy (sensitivity), %	-	73	100	-	45	91
Accuracy (specificity), %	98	-	-	100	-	-
LOD ₅₀ (95% confidence interval) in cfu/sample		0,84 (0,67 - 1,0)			2,2 (1,8-2,6)	

21



Prestatiekenmerken deel 1: Direct uitplaten (Procedure C), Preston (Pocedure B)



	Broiler caecal material			Raw milk			Chicken skin		
	Blank	Low	High	Blank	Low	High	Blank	Low	High
# participants	17	17	17	17	17	17	17	17	17
# participants retained	17	17	17	16	16	16	15	15	15
# samples tested	136	136	136	136	136	136	136	136	136
# sample results retained	136	136	136	128	128	128	120	120	120
Sample size in g	0,01	0,01	0,01	10	10	10	10	10	10
Level of inoculum (cfu/sample)	0	0,55	136	0	17	206	0	7,5	105
Accuracy (sensitivity), %	-	28	99	-	53	78	-	64	92
Accuracy (specificity), %	100	-	-	100	-	-	99	-	-
LOD ₅₀ (95% CI) in cfu/sample	-	6 (3 - 12)			57 (46-70)			14 (11-19)	

22



Gebaseerd op tellingen in enkelvoud (ISO 7218)



Gebaseerd op tellingen in enkelvoud (ISO 7218)



Example for the repeatability limit

11.2 Repeatability limit

The absolute difference between two independent single (log₁₀-transformed) test results (number of cfu per gram or per millilitre) or the ratio of the higher to the lower of the two test results on the normal scale, obtained using the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same apparatus within the shortest feasible time interval, will in not more than 5 % of cases exceed the repeatability limit r .

As a general indication of repeatability limit (r), the following values may be used when testing **broiler caecal material** samples:

$r = 0,38$ (expressed as a difference between log₁₀-transformed test results),

EXAMPLE A test result of 1 000 000 or $1,0 \times 10^6$ or log₁₀ 6,0 cfu per gram of broiler caecal material was observed in a given laboratory. Under repeatability conditions, the difference between log₁₀-transformed results should not be greater than $\pm 0,38$ log₁₀ units. So the result from a second test of the same sample should be between 5,62 ($6,0 - 0,38$) and 6,38 ($6,0 + 0,38$) log₁₀ units.

11.3 Reproducibility limit → same method on identical test material in different laboratories



Kwaliteitscontrole van de media (Annex B)

- Overgenomen uit ISO 11133, maar WDCM 00156 nu als keuze

Table B.1 — Performance testing of culture media for *Campylobacter*

Medium	Function	Incubation	Control strains	WDCM numbers ^a	Method of control	Criteria ^c	Characteristic reactions of target microorganism
Analoog voor Preston broth	Productivity	(5 ± 1) h / (37 ± 1) °C then (44 ± 4) h / (41.5 ± 1) °C microaerobic atmosphere	<i>Campylobacter jejuni</i> 6	00156 or 00005	Qualitative	>10 characteristic colonies on mCCD agar	Greyish, flat and moist, sometimes with metallic sheen
			+ <i>Escherichia coli</i> 4 + <i>Proteus mirabilis</i>	00012 or 00013 00023			
			<i>Campylobacter coli</i> + <i>Escherichia coli</i> 4 + <i>Proteus mirabilis</i>	00004 00012 or 00013 00023			
	Selectivity		<i>Escherichia coli</i> 8 <i>Proteus mirabilis</i>	00012 or 00013 00023	Qualitative	Total inhibition (0) on TSA	—



Kwaliteitscontrole van de media (Annex B)

- Overgenomen uit ISO 11133, maar WDCM 00156 nu als keuze

Table B.1 (continued)

Medium	Function	Incubation	Control strains	WDCM numbers ^a	Method of control	Criteria ^c	Characteristic reactions of target microorganism
mCCD agar	Productivity	(44 ± 4) h / (41,5 ± 1) °C microaerobic atmosphere	<i>Campylobacter jejuni</i> ^d <i>Campylobacter coli</i>	00156 or 00005 00004	Qualitative	Good growth (2)	Greyish, flat and moist colonies, sometimes with metallic sheen
	Selectivity		<i>Escherichia coli</i> ^d <i>Staphylococcus aureus</i>	00012 or 00013 00034	Qualitative	Total or partial inhibition (0–1) Total inhibition (0)	No characteristic colonies —
Colombia blood agar	Productivity	24 h to 48 h / (41,5 ± 1) °C microaerobic atmosphere	<i>Campylobacter jejuni</i> ^d <i>Campylobacter coli</i> ^d	00156 or 00005 00004	Qualitative	Good growth (2)	



Met dank aan:

- ✓ ISO/CEN networks
- ✓ EURL/NRLs network
- ✓ TAG 19 members:

-Corina Meier	AR
-Trudy Graham	AU
-Nadine Botteldoorn	BE
-Marjaana Hakkinen	FI
-Martine Denis	FR
-Kerstin Stingl	DE
-Csilla Mohács-Farkas	HU
-Zsuzsanna Stréterné-Lancz	HU
-Elisabetta Di Giannatale	IT
-Wilma Hazeleger	NL
-Els Biesta-Peters	NL
-Kinga Wieczorek	PL
-Ingrid Hansson	SE
-Janet Corry	UK
-Ana Vidal	UK
-Carlos Abeyta	US





En dank u voor uw aandacht !



wilma.jacobs@rivm.nl

Detectie en serotypering van *Salmonella*

(NEN-EN-ISO 6579-1 en NPR-CEN-ISO/TR 6579-3)

Kirsten Mooijman
RIVM-Z&O

1. ISO 6579 serie

ISO 6579 voor de analyse van *Salmonella* bestaat uit meerdere delen. De algemene titel is: 'Microbiologie van de voedselketen - Horizontale methode voor de detectie, telling en serotypering van *Salmonella*'. De delen hebben de volgende titels:

- NEN-EN-ISO 6579-1: Horizontale methode voor de detectie van *Salmonella*. Gepubliceerd april 2017.
- NPR-CEN-ISO/TS 6579-2 (Technical Specification): Telling door miniaturbepaling van het meest waarschijnlijke aantal. Gepubliceerd november 2012.
- NPR-CEN-ISO/TR 6579-3 (Technical Report): Richtlijnen voor serotypering van *Salmonella* spp. Gepubliceerd juli 2014
- Concept ISO/TS 6579-4 Identification of monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12,i:-) by Polymerase chain reaction (PCR). Tweede werkdocument beschikbaar sinds maart 2017.

De presentatie geeft informatie over delen 1 en 2.

2. NEN-EN-ISO 6579-1 Detectie van *Salmonella* (2017)

De 'systematic review' van NEN-EN-ISO 6579:2002 vond eind 2007 plaats en de revisie is gestart in 2009. Uiteindelijk is ISO 6579-1 gepubliceerd in februari 2017 en de NEN-EN-ISO 6579-1 in april 2017. NEN-EN-ISO 6579-1:2017 vervangt de volgende normen:

- NEN-EN-ISO 6579:2002 (Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders – Horizontale methode voor de detectie van *Salmonella* spp.)
- NEN-EN-ISO 6579:2002/A1:2007 (Amendment 1: Annex D: Detectie van *Salmonella* spp. in dierlijke fecaliën en in monsters van de primaire productie fase)
- NEN-EN-ISO 6785:2007 (Melk en melkproducten – Detectie van *Salmonella* spp.)

Hieronder volgt een overzicht van de wijzigingen in ISO 6579-1 ten opzichte van de 2002 versie.

2.1 Algemeen

- ISO 6785 (melk en melk producten) is opgenomen in ISO 6579-1 en ingetrokken op 31-3-2017;
- Annex D van ISO 6579 (primaire productie) is opgenomen in ISO 6579-1 en ingetrokken op 31-3-2017;
- Procedure voor de detectie van *S. Typhi* en *S. Paratyphi* is opgenomen in (nieuwe) annex D en beschrijft:
 - gebruik van Seleniet Cystine (SC) bouillon, naast RVS en MKTTn, voor selectieve ophoping;
 - gebruik van Bismut Sulfiet (BS) agar, naast XLD, voor uitplaten;

- Voor de bereiding van de initiële suspensies van specifieke producten wordt verwezen naar de ISO 6887 serie (Microbiologie van de voedselketen – Voorbereiding van monsters en bereiding van verdunningen voor microbiologisch onderzoek–Delen 1 t/m 6)

2.2 Niet-selectieve voorophoping

- De pepton die voor de bereiding van gebufferd pepton water (BPW) nodig is, is minder strikt voorgeschreven:
 - In ISO 6579:2002 stond: ‘enzymatic digest of casein’;
 - In ISO 6579-1:2017 staat: ‘Pepton’, met een voetnoot: ‘for example enzymatic digest of casein’.
- De spreiding van de incubatie temperatuur van niet-selectieve media (bijv. BPW) is breder geworden:
 - In ISO 6579:2002 stond $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
 - In ISO 6579-1:2017 staat: incubeer tussen 34°C en 38°C .
- In een informatieve ‘note’ wordt de mogelijkheid aangegeven om de cultures van de voorophoping en/of de selectieve ophoping op te slaan in de koelkast voor maximaal 72 uur.

2.3 Selectieve ophoping

- Media selectieve ophoping:
 - Medium eerste selectieve ophoping: keuze tussen Rappaport Vassiliadis met Soya (RVS) bouillon en Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) agar;
 - Medium tweede selectieve ophoping: (onveranderd) Muller Kauffmann Tetrathionaat met novobiocine (MKTn) bouillon;
 - Monsters van de primaire productie: alleen MSRV agar (idem als oude Annex D).
- pH MKTn aangepast:
 - In ISO 6579:2002 (Cor.1:2004) stond: pH basis medium: $8,0 \pm 0,2$ en gebruik compleet medium op de dag van bereiding;
 - In ISO 6579-1:2017 staat: pH basis medium: $8,0 \pm 0,2$. Compleet medium kan bewaard worden in het donker bij 5°C , maar mag niet meer gebruikt worden als de pH lager wordt dan 7 (dit is gebaseerd op 5 studies waarbij *Salmonella* goede groei vertoonde bij pH=7-8).
- Incubatietijd van selectieve ophoping is 24 h, behalve voor:
 - Gedroogde melk en kaas (2x 24 h);
 - Monsters van de primaire productie (op MSRV agar; 2x 24h indien nodig).

2.4 Uitplaten

- XLD agar is overanderd het verplichte eerste isolatie medium;
- Voor hulp bij de keuze van een geschikt 2e medium is een nieuwe informatieve Annex E toegevoegd met informatie over selectieve eigenschappen en indicator systemen van diverse uitplaat media;
- De wijze van uitplaten is minder strikt voorgeschreven, het doel is om losse kolonies te krijgen. In een informatieve ‘note’ wordt de suggestie gedaan om 1 grote plaat of 2 normale platen te gebruiken.

2.5 Bevestiging

- Voor bevestiging hoeft slechts één verdachte kolonie gebruikt te worden (i.p.v. 1 kolonie voor iedere medium combinatie). Indien deze negatief is dienen (onveranderd) 4 extra verdachte kolonies bevestigd te worden van verschillende media combinaties;
- Het is toegestaan om de biochemische bevestiging en het uitplaten op niet-selectief medium (check op reinheid en voor serologische test) parallel uit te voeren;
- De keuze van het niet-selectieve medium is vrij naar keuze;
- Twee biochemische tests zijn optioneel geworden: β -Galactosidase test en indol reactie;
- Eén biochemische test is verwijderd: Voges-Proskauer reactie;
- Serologische bevestiging op groep niveau voor O-antigenen én voor H-antigenen;
- Voor serotypering wordt verwezen naar ISO/TR 6579-3;
- Tabel 1 (interpretatie van biochemische tests) is verbeterd.

2.6 Prestatiekenmerken

- Prestatiekenmerken voor kwaliteitscontrole van media zijn toegevoegd (kopie van info in ISO 11133);
- Er is een nieuw Hoofdstuk 11 toegevoegd over prestatiekenmerken;
- De prestatiekenmerken voor analyse van *Salmonella* zijn herberekend en/of toegevoegd (Annex C):
 - Accordance & concordance zijn verwijderd (worden niet meer gebruikt);
 - LOD50 ('Level of detection where probability of detection is 50%') voor levensmiddelen is toegevoegd (berekend van ruwe data van de internationale validatie studie georganiseerd in 2000);
 - Prestatiekenmerken voor de analyse van *Salmonella* in levensmiddelen met MSRV agar zijn toegevoegd;
 - Prestatiekenmerken voor de analyse van *Salmonella* in monsters van de primaire productie op MSRV agar zijn toegevoegd (CEN mandaat studie, 2013 en 2 EURL-*Salmonella* studies, 2008, 2012).

2.7 Introductie van NEN-EN-ISO 6579-1 in de laboratoria

Het betreft hier geen nieuwe norm, maar de revisie van een bestaande norm (NEN-EN-ISO 6579:2002). De procedure voor de analyse van *Salmonella* in mestmonsters en omgevingsmonsters van de primaire productie (Annex D van ISO 6579:2002) is zonder grote wijzigingen opgenomen in ISO 6579-1. De procedure voor de analyse van *Salmonella* in melk en melkproducten is geharmoniseerd met die van andere levensmiddelen, waarbij selectieve ophoping in Seleniet Cystine (SC) bouillon is vervangen door Muller Kauffmann Tetrathionaat novobiocine (MKTTn) bouillon. In de Introductie van ISO 6579-1:2017 staat: 'Main changes in the document, compared to ISO 6579:2002 are considered as minor'. Dit betekent dat de wijzigingen weinig tot geen effect hebben op de prestatiekenmerken.

Voor accreditatie is de algemene regel dat een nieuwe norm een jaar na publicatie in het laboratorium is ingevoerd en de scope is aangepast. Omdat de wijzigingen in NEN-EN-ISO 6579-1:2017 weinig tot geen effect hebben op de prestatiekenmerken zal een hervalidatie (verificatie) in het algemeen niet of beperkt nodig zijn. Verificatie is in ieder geval wel nodig bij, bijvoorbeeld, nieuw

gebruik van MSRV-agar, bij overgang van ISO 6785 naar ISO 6579-1 voor de analyse van melk en melkproducten en bij de analyse van nieuwe productgroepen.

3. NPR-CEN-ISO/TR 6579-3 Serotypering van *Salmonella* (2014)

De TR in ISO/TR 6579-3 staat voor Technical Report wat betekent dat het hier om een richtlijn gaat die informatief is en niet normatief. Het document geeft richtlijnen voor de serotypering van *Salmonella*, gebaseerd op het White-Kauffmann-Le Minor schema. Vanwege het groot aantal *Salmonella* serovars (ruim 2.600) en vanwege het feit dat het voorschrift voor agglutinaties kan verschillen per leverancier van (en soms ook per batch) antisera, wordt de procedure voor serotypering alleen in algemene termen omschreven. Alleen voor de 'top 5' serovars worden voorbeelden gegeven voor serotypering met 'objectglasagglutinatie'. Deze top 5 *Salmonella* serovars zijn: Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Virchow en Hadar (onder andere genoemd in Verordening (EU) nr. 200/2010).

Verder is in ISO/TR 6579-3 aandacht voor de nomenclatuur van *Salmonella* en biochemische en serologische karakteristieken. Ook worden er tips gegeven voor de mogelijke aanpak van isolaten die auto-agglutinatie vertonen en worden er voorbeelden gegeven voor een aantal zaken, zoals kwaliteitscontrole en voor serotypering van (totaal) onbekende *Salmonella* isolaten.

3.1 Naamgeving *Salmonella* species

Het genus *Salmonella* behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae* en bestaat uit slechts 2 species: *enterica* en *bongori*. Onder de species *enterica* vallen 6 subspecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* en *indica*. Onder de species of subspecies vallen de grote aantallen serovars, waarbij die van *Salmonella enterica* subsp. *enterica* het meest frequent geïsoleerd worden (> 99,5% van de *Salmonella* isolaten).

Alleen de serovars van *Salmonella enterica* subsp. *enterica* worden weergegeven met een naam, vaak gerelateerd aan de plaats waar de serovar voor het eerst werd geïsoleerd (bijvoorbeeld Amsterdam, Belfast, Curacao, etc.). De volledige, officiële, naam van deze serovars is lang, bijvoorbeeld: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Het is echter algemeen geaccepteerd om dit verkort weer te geven, bijv. *Salmonella* Typhimurium. Hierbij blijft de serovar naam, Typhimurium, met hoofdletter en niet cursief weergegeven. Serovars van andere subspecies van *S. enterica* en van *S. bongori* worden weergegeven met hun antigene formule.

3.2 Identificatie van *Salmonella* species

De identificatie van *Salmonella* species en subspecies is gebaseerd op verschillen in biochemische reacties (deze informatie wordt weergegeven in Tabel 2 van ISO/TR 6579-3).

De antigene karakteristieken van *Salmonella* zijn verdeeld in 3 hoofdtypen:

- O-antigenen of somatisch antigenen (bevinden zich op de celwand);
- H-antigenen (bevinden zich op de flagella);
- Vi-antigen (bevindt zich op het kapsel).

De O-antigenen bestaan voornamelijk uit polysaccharide, proteïne en fosfolipide en zijn zeer robuust. Oorspronkelijk werden de O-antigenen ingedeeld in groepen A t/m Z, waarbij groep A antigen O:2 bevat en groep Z antigen O:50. Echter in de loop der jaren werden meer O-antigenen toegevoegd en werd het aantal groter dan het aantal letters. Vandaar dat het nu de voorkeur heeft



om de O-groepen in te delen naar de O-factor, waarbij vaak de 'oude' groep tussen haakjes wordt weergegeven, bijv. O:4 (groep B).

De H-antigenen bestaan voor een belangrijk deel uit proteïne en zijn minder robuust dan de O-antigenen. Veel *Salmonella* serovars hebben 2 fases van de H-antigenen. Monofasische en trifasische serovars komen ook voor, maar minder frequent. Voor het aantonen van de 2^e (of 3^e) fase is vaak fase inversie nodig, waarbij de 1^e fase onderdrukt wordt (bijv. met de zogenaamde Sven Gard methode). De eerste H-fase wordt met kleine letters weergegeven (a t/m z₉₁), de tweede fase met letters of cijfers.

Het Vi-antigen bestaat voor een belangrijk deel uit polysacharide en zorgt ervoor dat een *Salmonella* stam meer virulent is. In *Salmonella* geïsoleerd uit levensmiddelen of primaire productie komt het Vi-antigen zelden voor. In slechts 3 *Salmonella* serovars kan het Vi-antigen aanwezig zijn: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C, *Salmonella* Dublin. Vi kan de O-antigenen maskeren waardoor het isolaat niet agglutineert met O-antiserum. Om de O-antigenen dan toch te detecteren kan het nodig zijn om een suspensie van het isolaat te verhitten (bijvoorbeeld 60 min bij 100°C, of 15 min bij 120°C).

3.3 Schrijfwijze antigene formule

Voor de schrijfwijze van de antigene formule van *Salmonella* worden de antigenen in de volgende volgorde weergegeven:

O-antigenen (gescheiden door komma's), Vi-antigen (indien aanwezig): H-antigenen 1^e fase (gescheiden door komma's): H-antigenen 2^e fase (gescheiden door komma's): H-antigenen 3^e fase (indien aanwezig).

In het White-Kauffmann-Le Minor schema worden sommige factors in de antigene formules onderstreept of tussen haken weergegeven. Onderstreepte O-factors worden bepaald door faag-conversie en kunnen alleen aangetoond worden als de cultuur getest wordt met de betreffende faag. O- of H-factors die zijn weergegeven in vierkante haken, kunnen wel of niet aanwezig zijn.

Voorbeelden:

Salmonella Typhimurium: 1,4,[5],12:i:1,2

Salmonella Dublin: 1,9,12,[Vi]:g,p:-

Bij rapportage worden isolaten van *S. enterica* subsp. *enterica* weergegeven met de serovarnaam en eventueel met de antigene formule zoals gevonden, zonder onderstreping of haken (bijvoorbeeld *Salmonella* Typhimurium 4,12:i:1,2). Isolaten van andere (sub)species worden gerapporteerd met de antigene formule zoals gevonden.

Serovars van andere subspecies van *S. enterica* worden met de volgende symbolen weergegeven:

- II voor serovars van *S. enterica* subsp. *salamae*
- IIIa voor serovars van *S. enterica* subsp. *arizonae*
- IIIb voor serovars van *S. enterica* subsp. *diarizonae*
- IV voor serovars van *S. enterica* subsp. *houtenae*
- VI voor serovars van *S. enterica* subsp. *indica*

Voorbeeld: *S.* II 30:z₁₀:e,n,x,z₁₅



ISO 6579 serie voor analyse van *Salmonella*

Microbiologie van de voedselketen – Horizontale methode voor de detectie, telling en serotypering van *Salmonella* –

- **NEN-EN-ISO 6579-1**: Horizontal methode voor de detectie van *Salmonella*; gepubliceerd april 2017
- **NPR-CEN-ISO/TS 6579-2** (Technical Specification): Telling door miniatuurbepaling van het meest waarschijnlijke aantal; gepubliceerd november 2012
- **NPR-CEN-ISO/TR 6579-3** (Technical Report): Richtlijnen voor serotypering van *Salmonella* spp.; gepubliceerd juli 2014
- **Concept ISO/TS 6579-4** Identification of monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12,i:-) by Polymerase chain reaction (PCR); 2^e werkdokument maart 2017

2

ISO 6579 Salmonella

NEN-EN-ISO 6579-1 detectie van *Salmonella*

- Revisie gestart in 2009 na systematic review eind 2007
- Publicatie ISO februari 2017; NEN-EN-ISO april 2017
- Vervangt:
 - o NEN-EN-ISO 6579:2002 (Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders – Horizontale methode voor de detectie van *Salmonella* spp.)
 - o NEN-EN-ISO 6579:2002/A1:2007 (Amendment 1: Annex D: Detectie van *Salmonella* spp. in dierlijke fecaliën en in monsters van de primaire productie fase)
 - o NEN-EN-ISO 6785:2007 (Melk en melkproducten – Detectie van *Salmonella* spp.)



Wijzigingen in ISO 6579-1 t.o.v. versie 2002 (I)

Algemeen

- ISO 6785 (melk en melk producten) opgenomen in ISO 6579-1 → norm is ingetrokken op 31-3-2017;
- Annex D van ISO 6579 (primaire productie) opgenomen in ISO 6579-1 → norm is ingetrokken op 31-3-2017;
- Beschrijving detectie *S. Typhi* en *S. Paratyphi* opgenomen in normative (nieuwe) annex D:
 - Gebruik van Seleniet Cystine (SC) bouillon, naast RVS en MKTTn, voor selectieve ophoping;
 - Gebruik van Bismut Sulfiet (BS) Agar, naast XLD, voor uitplaten;
- Voor de bereiding van de initiële suspensies van specifieke producten wordt verwezen naar de ISO 6887 serie (Microbiologie van de voedselketen – Voorbereiding van monsters en bereiding van verdunningen voor microbiologisch onderzoek – Delen 1 t/m 6)



Wijzigingen in ISO 6579-1 t.o.v. versie 2002 (II)

Niet-selectieve voorophoping

- De pepton die voor de bereiding van BPW nodig is, is minder strikt voorgeschreven:
 - In ISO 6579:2002 stond: 'enzymatic digest of casein'
 - In ISO 6579-1:2017 staat: 'Pepton', met een voetnoot: 'for example enzymatic digest of casein'.
- De spreiding van de incubatie temperatuur van niet-selectieve media (bijv. BPW) is breder geworden:
 - In ISO 6579:2002 stond $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$;
 - In ISO 6579-1:2017 staat: incubeer tussen 34 °C en 38 °C .
- In een informatieve 'note' wordt de mogelijkheid aangegeven om de cultures van de voorophoping en/of de selectieve ophoping op te slaan in de koelkast voor maximaal 72 uur.



Wijzigingen in ISO 6579-1 t.o.v. versie 2002 (III)

Selectieve ophoping

- Media selectieve ophoping:
 - Medium eerste selectieve ophoping: keuze RVS bouillon of MSRV agar;
 - Medium tweede selectieve ophoping: MKTTn bouillon;
 - Monsters van de primaire productie: alleen MSRV agar (idem als Annex D).
- pH MKTTn aangepast:
 - In ISO 6579:2002 (Cor.1:2004) stond: pH basis medium: $8,0 \pm 0,2$ en gebruik compleet medium op de dag van bereiding;
 - In ISO 6579-1:2017 staat: pH basis medium: $8,0 \pm 0,2$. Compleet medium kan bewaard in donker bij 5 °C , maar niet meer gebruiken als $\text{pH} < 7$.
 - › Gebaseerd op info van 5 studies: goede groei *Salmonella* bij $\text{pH}=7-8$
- Incubatietijd van selectieve ophoping is 24 h, behalve voor:
 - Gedroogde melk en kaas (2x 24 h);
 - Monsters van de primaire productie (op MSRV agar; 2x 24h indien nodig).



Wijzigingen in ISO 6579-1 t.o.v. versie 2002 (IV)

Uitplaten en bevestiging

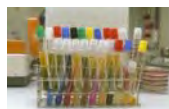
- XLD overanderd verplichte (eerste) isolatie medium.
- Wijze van uitplaten minder strikt voorgeschreven: doel is losse kolonies. In informatieve 'note' suggestie gedaan voor gebruik van 1 grote plaat of 2 normale platen.
- Nieuwe Annex E toegevoegd met info over uitplaat media om te helpen bij de keuze van een geschikt 2^e medium;
- Bevestiging van slechts één verdachte kolonie (i.p.v. 1 kolonie voor iedere medium combinatie). Indien negatief, 4 extra verdachte kolonies bevestigen van verschillende media combinaties.
- Biochemische bevestiging en uitplaten op niet-selectief medium (check op reinheid en voor serologische test) kan parallel.
- Keuze niet-selectieve medium is vrij naar keuze.



Wijzigingen in ISO 6579-1 t.o.v. versie 2002 (V)

Bevestiging

- Twee biochemische tests optioneel geworden:
β-Galactosidase test en indol reactie;
- Eén biochemische test verwijderd: Voges-Proskauer reactie;
- Serologische bevestiging op groeps niveau voor O-antigenen én voor H-antigenen;
- Voor serotypering verwijzing naar ISO/TR 6579-3;
- Tabel 1 (interpretatie van biochemische tests) verbeterd.





Wijzigingen in ISO 6579-1 t.o.v. versie 2002 (VI)

Prestatiekenmerken

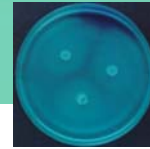
- Prestatiekenmerken voor kwaliteitscontrole van media toegevoegd (copie van info in ISO 11133);
- Nieuw Hfd 11 over prestatiekenmerken procedures;
- Prestatiekenmerken procedures herberekend en toegevoegd (Annex C):
 - Accordance & concordance verwijderd;
 - LOD₅₀ ('Level of detection where probability of detection is 50%') voor levensmiddelen toegevoegd (berekend van ruwe data internationale validatie studie in 2000);
 - Prestatiekenmerken voor analyse van levensmiddelen met MSRV agar;
 - Prestatiekenmerken voor analyse van monsters van de primaire productie op MSRV agar (CEN mandaat studie, 2013 en 2 EURL-*Salmonella* studies, 2008, 2012).



Voorbeeld prestatiekenmerken ISO 6579-1

Parameter	Boot socks +10 g laying hen environmental material +		
	Blank	STM9 ^a	STM81 ^a
Number of participating collaborators	36	36	36
Number of samples per collaborator	8	8	8
Number of laboratories retained after evaluation of the data	33	33	33
Number of samples retained after evaluation of the data	264	264	264
Sample size	Boot socks		
Specificity, in %	99,6	—	—
Sensitivity per level, in %	—	94,7	98,1
LOD ₅₀ (95 % confidence interval), in cfu/sample	—	3,8 (3,2 to 4,4)	

^a The boot sock samples were artificially contaminated with a diluted culture of *Salmonella* Typhimurium (STM) at a level of 9 cfu/sample and a level of 81 cfu/sample.



Introductie NEN-EN-ISO 6579-1 in labs

- Geen nieuwe ISO maar revisie van bestaande ISO 6579:2002;
- Annex D van ISO 6579:2002 (primaire productie) is zonder grote wijzigingen opgenomen in ISO 6579-1:2017;
- Analyse melk en melkproducten geharmoniseerd met andere levensmiddelen (selectieve ophoping was RVS and SC);
- In Introductie van ISO 6579-1 staat: 'Main changes in the document, compared to ISO 6579:2002 are considered as minor' → wijzigingen weinig tot geen effect op prestatiekenmerken;
- Accreditatie (RvA):
 - o 1 jaar na publicatie moet scope zijn aangepast;
 - o Verificatie beperkt nodig, bijv. bij nieuw gebruik MSRV agar, overgang van ISO 6785 naar ISO 6579-1 voor analyse zuivel, analyse nieuwe productgroepen.



ISO/TR 6579-3 serotypering *Salmonella*

- Technical Report: geeft richtlijnen en is informatief en niet normatief;
- Geeft richtlijnen voor serotypering *Salmonella*, gebaseerd op White-Kauffmann-Le Minor schema (welke meer dan 2600 verschillende *Salmonella* serovars beschrijft);
- 'Monster': reincultuur van *Salmonella* spp. onafhankelijk uit welke bron geïsoleerd;
- Info over taxonomie *Salmonella*: nomenclatuur, biochemische en serologische karakteristieken;
- Procedure serotypering in algemene termen omschreven; verwijzingen naar voorschriften leverancier antisera.



ISO/TR 6579-3 Nomenclatuur

Family: *Enterobacteriaceae* (1st letter capital, italicised)

Genus: *Salmonella* (1st letter capital, italicised)

species: *enterica* (not capitalised, italicised)

subspecies: *enterica* (not capitalised, italicised)

serovar (serotype or ser.): e.g. Typhimurium
(1st letter capital, not italicised)

subspecies: *salamae*
arizonae
diarizonae
houtenae
indica

species: *bongori*



ISO/TR 6579-3



Naamgeving *Salmonella*

- Serovars van *Salmonella enterica* subsp. *enterica*:
 - o Meest frequent geïsoleerd (> 99,5% van de *Salmonella* isolaten);
 - o Aangegeven met een naam, vaak gerelateerd aan de plaats waar de serovar voor het eerst werd geïsoleerd (bijv. Amsterdam, Belfast, Curacao, etc.);
 - o Volledige naam is lang, bijv.:
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium.
Algemeen geaccepteerd om af te korten tot:
Salmonella Typhimurium.
- Serovars van andere subspecies van *S. enterica* en van *S. bongori* worden weergegeven met hun antigene formule.



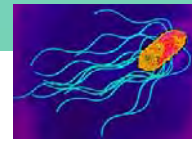
Biochemie en serologie

- Identificatie *Salmonella* species en subspecies gebaseerd op verschillen in biochemische reacties (samengevat in Tabel 2 van ISO/TR 6579-3).
- De antigenen karakteristieken van *Salmonella* zijn verdeeld in 3 hoofd types:
 - o O-antigen of somatisch antigen;
 - o H-antigen of flagel antigen;
 - o Vi-antigen of kapsel antigen.



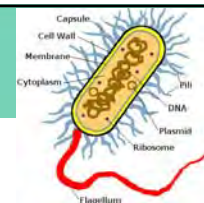
O-antigenen

- Onderdeel celwand;
- Bestaan voor belangrijk deel uit polysaccharide, proteïne, phospholipide;
- Zeer robuust;
- Bestand tegen temperaturen tot 100 °C voor 150 min;
- Bestand tegen behandeling met 95% ethanol of verdund zuur;
- Historische indeling O-antigenen in groepen A t/m Z. Groep A bevat antigen O:2, Groep Z antigen O:50;
- Aantal O-antigenen is groter dan aantal letters → voorkeur om O-groepen in te delen naar O-factor, bijv. O:4 (groep B).



H-antigenen

- Bevinden zich op de flagella;
- Bestaan voor belangrijk deel uit proteïnen;
- Minder robuust dan O-antigenen;
- Niet bestand tegen temperaturen boven 60 °C;
- Niet bestand tegen behandeling met ethanol of zuur;
- Wel bestand tegen behandeling met formaline oplossing 0,5% v/v;
- Veel *Salmonella* serovars hebben 2 fases van de H-antigenen (monofasisch en trifasisch komt minder vaak voor);
- Voor aantonen 2^e (of 3^e) H fase is vaak fase inversie nodig (bijv. Sven Gard methode);
- De eerste H fase wordt weergegeven met kleine letters (a t/m z₉₁), de tweede fase met letters of cijfers.



Vi-antigen

- Bevindt zich op het kapsel;
- Bestaat voor belangrijk deel uit polysaccharide;
- Maakt *Salmonella* stam meer virulent;
- In *Salmonella* isolaten uit levensmiddelen of primaire productie komt Vi-antigen zelden voor;
- In slechts 3 *Salmonella* serovars kan Vi-antigen aanwezig zijn: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C, *Salmonella* Dublin;
- Vi kan de O-antigenen maskeren waardoor isolaat niet agglutineert met O-antiseren → om O-antigenen toch te detecteren kan het nodig zijn om isolaat-suspensie te verhitten (bijv. 60 min bij 100 °C, of 15 min bij 120 °C).



Schrijfwijze antigene formule *Salmonella*

- Volgorde antigenen in antigene formule:
O-antigenen, Vi-antigen (indien aanwezig): H-antigenen 1^e fase: H-antigenen 2^e fase: H-antigenen 3^e fase (indien aanw.)
- Onderstreepte O-factors worden bepaald door faag-conversie, alleen aanwezig als cultuur getest is met betreffende faag;
- O- of H-factors weergegeven in vierkante haken kunnen wel of niet aanwezig zijn.
- Voorbeelden:
Salmonella Typhimurium: 1,4,[5],12:i:1,2
Salmonella Dublin: 1,9,12,[Vi]:g,p:-



Procedure voor *Salmonella* serotypering

Procedure betreft voorbeelden voor serotypering d.m.v. 'objectglas-agglutinatie' van 5 volksgezondheid gerelateerde *Salmonella* serovars (genoemd in Verordening (EU) nr. 200/2010 – 'doelstelling van de Unie voor het verminderen van de prevalentie van serotypen *Salmonella* bij volwassen vermeerderingskoppels van *Gallus gallus*')

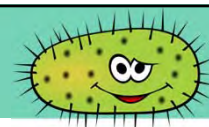
- *Salmonella* Typhimurium
- *Salmonella* Enteritidis
- *Salmonella* Infantis
- *Salmonella* Virchow
- *Salmonella* Hadar





Aanvullende informatie

- Tips voor mogelijke aanpak bij auto-agglutinatie van isolaten;
- Voorbeelden voor kwaliteitscontrole;
- Voorbeeld (schema) voor te nemen stappen vóór serotypering van een *Salmonella* isolaat;
- Voorbeelden (schema's) voor serotypering van onbekende *Salmonella* isolaten;
- Beschrijving microtiter methode voor serotypering (i.p.v. 'objectglas-agglutinatie' methode);
- Voorbeelden voor procedures voor fase inversie (o.a. Sven Gard methode).



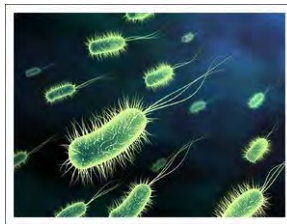
Rapportage

- Isolaten van *S. enterica* subsp. *enterica*: *Salmonella* serovar naam en eventueel de antigene formule zoals gevonden zonder onderstreping of haken (bijv. *Salmonella* Typhimurium 4,12:i:1,2);
- Isolaten van andere (sub)species met antigene formule zoals gevonden;
- Serovars van andere subspecies van *S. enterica* worden met de volgende symbolen weergegeven:
 - o II voor serovars van *S. enterica* subsp. *salamae*
 - o IIIa voor serovars van *S. enterica* subsp. *arizonae*
 - o IIIb voor serovars van *S. enterica* subsp. *diarizonae*
 - o IV voor serovars van *S. enterica* subsp. *houtenae*
 - o VI voor serovars van *S. enterica* subsp. *indica*Voorbeeld: S. II 30:z₁₀:e,n,x,z₁₅



Dank u wel voor uw aandacht

Vragen?





***Enterobacteriaceae*, coliformen en *Escherichia coli*; wanneer welk onderzoek en hoe**

(NEN-EN-ISO 21528, NEN-ISO 4831, NEN-ISO 4832 en NEN-(EN-)ISO 16649)

Els Biesta

Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit

Indicatororganismen

Enterobacteriaceae, coliformen en *Escherichia coli* zijn indicatororganismen. Indicatororganismen zijn micro-organismen waarvan de aanwezigheid duidt op het mogelijk gelijktijdig voorkomen van pathogene micro-organismen of op een ongewenste toestand. Een voorbeeld hiervan is de aanwezigheid van *E. coli* in oppervlaktewater, wat wijst op fecale besmetting van het water en dus op de mogelijke aanwezigheid van pathogene darmbacteriën, zoals *Salmonella*.

Er wordt met regelmaat gebruik gemaakt van onderzoek naar indicatororganismen omdat het een relatief eenvoudige analyse is en omdat ze meestal in hogere aantallen aanwezig zijn dan pathogenen.

Onderzoek naar indicatororganismen is vastgelegd in Verordening 2073/2005 (1). In deze verordening wordt onderscheid gemaakt tussen procesindicatoren en hygiëne-indicatoren. Proces-indicatoren zijn micro-organismen die een indicatie zijn voor een procesfout bij een product dat een bacteriedodende behandeling heeft ondergaan.

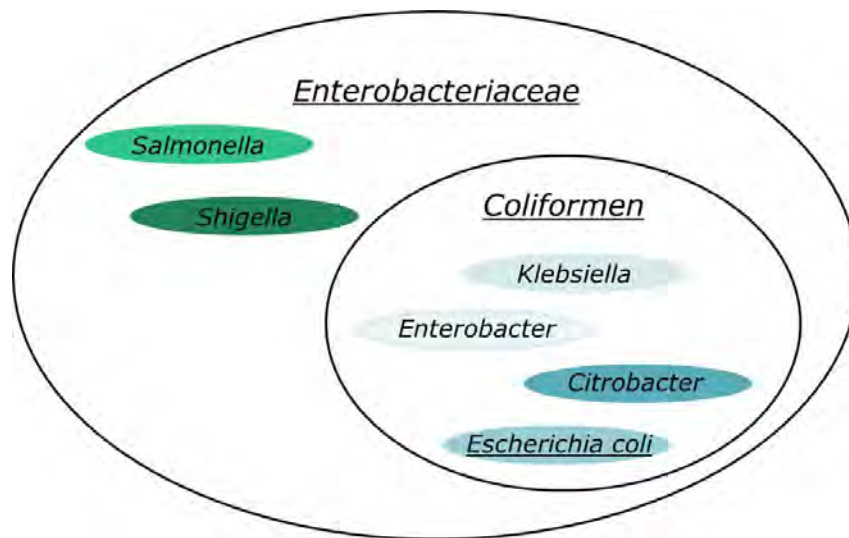
De aanwezigheid van *Enterobacteriaceae* is bijvoorbeeld een indicatie voor onvoldoende verhitte of nabesmetting. Hygiëne-indicatoren zijn micro-organismen die informatie geven over de hygiëne. Bijvoorbeeld *Enterobacteriaceae* in verhitte producten als indicatie voor een slechte hygiënische toestand.

Enterobacteriaceae*, coliformen en *E. coli

Enterobacteriaceae, Coliformen en *E. coli* zijn Proteobacteria behorende tot de orde Enterobacteriales. Ze hebben met elkaar gemeen dat ze facultatief anaeroob, Gram negatief en staafvormig zijn. Ze verschillen van elkaar door het feit dat *Enterobacteriaceae* glucose kunnen fermenteren met zuurvorming en coliformen lactose kunnen fermenteren met gasvorming.

Tot de familie *Enterobacteriaceae* behoren onder andere *Salmonella* en *Shigella*. Voorbeelden van coliformen zijn *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* en *E. coli*. Zie ook Figuur 1.

Het voedselveiligheidsbeleid van de Europese Unie (EU) is gebaseerd op een allesomvattende geïntegreerde aanpak, die betrekking heeft op de hele voedselketen. Het omvat alle sectoren van de voedselketen waaronder de diervoederproductie, de primaire productie, de be- en verwerking van voedsel, de opslag, het transport en de detailhandel.



Figuur 1: Indeling en voorbeelden van *Enterobacteriaceae*, Coliformen en *E. coli*.

De volgende ISO normen beschrijven het onderzoek naar *Enterobacteriaceae*, Coliformen en *E. coli*:

NEN-EN-ISO 21528-1:2017	<i>Enterobacteriaceae</i>	Detectie en MPN	(2)
NEN-EN-ISO 21528-2:2017	<i>Enterobacteriaceae</i>	Telling	(3)
NEN-ISO 4831:2006	Coliformen	Detectie en MPN	(4)
NEN-ISO 4832:2006	Coliformen	Telling	(5)
NEN-ISO 16649-1:2001	<i>Escherichia coli</i>	Telling (filtratie)	(6)
NEN-ISO 16649-2:2001	<i>Escherichia coli</i>	Telling	(7)
NEN-ISO 16649-3:2015	<i>Escherichia coli</i>	Detectie en MPN	(8)

NEN-EN-ISO 21528:2017 *Enterobacteriaceae*

De detectiemethode wordt gebruikt wanneer het verwachte aantal *Enterobacteriaceae* lager is dan 100 kve/ml of g van het te onderzoeken monster.

Detectie van *Enterobacteriaceae* bestaat uit de volgende stappen:

- Monster x g + 9 x ml niet selectief medium
- Incubatie 18 h, 37°C
- Afstrijken op VRBG agar
- Incubatie 24 h, 37°C
- Karakteristieke kolonies reinstrijken op niet-selectieve agar
- Bevestigen met Glucose (O/F) medium en oxidase test

In de voorgaande versie van de norm (9) was na ophoping in een niet-selectief medium nog een extra ophopingsstap in selectief EE medium opgenomen. De aanwezige galzouten en kleurstof in dit medium remden echter van verscheidene stammen de groei, waardoor ze soms niet te detecteren waren (10). Deze stap is daarom niet meer opgenomen in de vernieuwde norm.

Daarnaast is de bevestiging met behulp van glucose agar vervangen door bevestiging met behulp van glucose O/F medium. Door gebruik van glucose O/F medium bleek de bevestiging na 24 uur eenduidiger te kunnen worden afgelezen en was nogmaals 24 uur incuberen niet meer nodig.

De methode zoals beschreven in ISO 21528:2017 is gevalideerd in een Europese Interlaboratorium studie en de prestatiekenmerken zijn vastgesteld voor 5 verschillende matrices (Tabel 1).

Tabel 1: Samenvatting van de prestatiekenmerken voor de detectieve methode *Enterobacteriaceae* voor de matrices vlees, tiramisu, gerookte zalm, zuigelingenvoeding en vloeibaar ei

Matrix en parameters	Besmettingsniveau		
<u>Vlees</u>	<u>Blanco</u>	<u>Laag</u>	<u>Hoog</u>
Besmettingsniveau (kve/10g)	-	6	61
Aantal deelnemende laboratoria	14	14	14
Geteste portiegrootte (g)	10	10	10
Sensitiviteit (%)	-	99	100
Specificiteit (%)	98	-	-
<u>Tiramisu</u>	<u>Blanco</u>	<u>Laag</u>	<u>Hoog</u>
Besmettingsniveau (kve/10g)	-	2	6
Aantal deelnemende laboratoria	14	14	14
Geteste portiegrootte (g)	10	10	10
Sensitiviteit (%)	-	100	100
Specificiteit (%)	99	-	-
<u>Gerookte zalm</u>	<u>Blanco</u>	<u>Laag</u>	<u>Hoog</u>
Besmettingsniveau (kve/10g)	-	2	6
Aantal deelnemende laboratoria	14	14	14
Geteste portiegrootte (g)	10	10	10
Sensitiviteit (%)	-	99	99
Specificiteit (%)	96	-	-
<u>Zuigelingenvoeding</u>	<u>Blanco</u>	<u>Laag</u>	<u>Hoog</u>
Besmettingsniveau (kve/10g)	-	2	6
Aantal deelnemende laboratoria	14	14	14
Geteste portiegrootte (g)	10	10	10
Sensitiviteit (%)	-	98	100
Specificiteit (%)		99	-
<u>Vloeibaar ei</u>	<u>Blanco</u>	<u>Laag</u>	<u>Hoog</u>
Besmettingsniveau (kve/10g)	-	12	25
Aantal deelnemende laboratoria	14	14	14
Geteste portiegrootte (g)	10	10	10
Sensitiviteit (%)	-	100	100
Specificiteit (%)	99	-	-

De telling van *Enterobacteriaceae* bestaat uit de volgende stappen:

- Tienvoudige verdunningsreeks van monster in verdunningsmedium
- 1 ml verdunning in VRBG gietplaat met VRBG deklaag
- Incubatie 24 h, 37°C
- Karakteristieke kolonies reinstrijken op niet-selectieve agar
- Bevestigen; Glucose O/F medium, oxidase test

In de meest recente ISO norm is, gelijk aan de detectie van *Enterobacteriaceae*, de bevestiging aangepast naar glucose O/F medium.

Ook de telling van *Enterobacteriaceae* is gevalideerd in een Europese validatiestudie en de prestatiekenmerken zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2: Samenvatting van de prestatiekenmerken voor telling van *Enterobacteriaceae* voor de matrices vloeibaar ei, vlees, diervoeder, tiramisu en zuigelingenvoeding

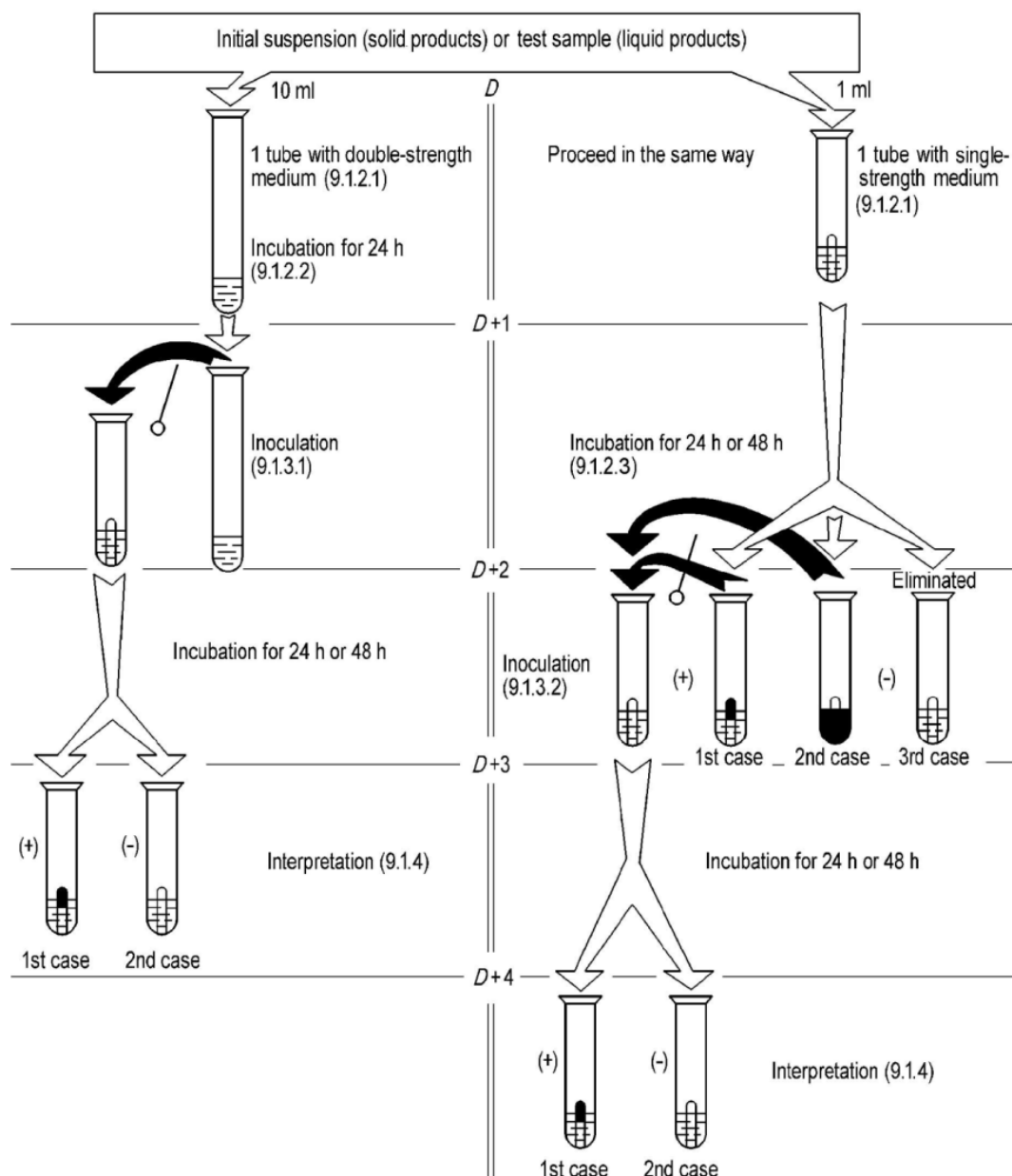
Matrix en parameters	Besmettingsniveau		
	Laag	Midden	Hoog
Vloeibaar ei			
Besmettingsniveau ($\log_{10}$ kve/g)	3,5	4,2	5,8
Aantal deelnemende laboratoria	13	13	13
Gemiddelde waarde Σa ($\log_{10}$ kve/g)	3,48	4,21	5,78
Herhaalbaarheid standaardafwijking s_r ($\log_{10}$ kve/g)	0,12	0,12	0,25
Herhaalbaarheidslimiet r			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,32	0,33	0,70
Reproduceerbaarheid standaardafwijking s_R ($\log_{10}$ kve/g)	0,32	0,50	0,48
Reproduceerbaarheidslimiet R			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,91	1,39	1,33
Vlees			
Besmettingsniveau ($\log_{10}$ kve/g)	2,4	3,7	3,8
Aantal deelnemende laboratoria	13	13	13
Gemiddelde waarde Σa ($\log_{10}$ kve/g)	2,43	3,72	3,75
Herhaalbaarheid standaardafwijking s_r ($\log_{10}$ kve/g)	0,15	0,13	0,10
Herhaalbaarheidslimiet r			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,42	0,36	0,27
Reproduceerbaarheid standaardafwijking s_R ($\log_{10}$ kve/g)	0,28	0,36	0,57
Reproduceerbaarheidslimiet R			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,79	1,02	1,61
Diervoeder			
Besmettingsniveau ($\log_{10}$ kve/g)	1,5	2,5	3,5
Aantal deelnemende laboratoria	13	13	13
Gemiddelde waarde Σa ($\log_{10}$ kve/g)	1,60	2,50	3,53
Herhaalbaarheid standaardafwijking s_r ($\log_{10}$ kve/g)	0,12	0,08	0,08
Herhaalbaarheidslimiet r			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,34	0,23	0,24
Reproduceerbaarheid standaardafwijking s_R ($\log_{10}$ kve/g)	0,18	0,17	0,20
Reproduceerbaarheidslimiet R			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,50	0,46	0,56
Gepasteuriseerde melk			
Besmettingsniveau ($\log_{10}$ kve/g)	1,5	2,5	3,5
Aantal deelnemende laboratoria	13	13	13
Gemiddelde waarde Σa ($\log_{10}$ kve/g)	1,53	2,40	3,46
Herhaalbaarheid standaardafwijking s_r ($\log_{10}$ kve/g)	0,14	0,08	0,11
Herhaalbaarheidslimiet r			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,40	0,24	0,30
Reproduceerbaarheid standaardafwijking s_R ($\log_{10}$ kve/g)	0,24	0,18	0,19
Reproduceerbaarheidslimiet R			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,67	0,49	0,54
Tiramisu			
Besmettingsniveau ($\log_{10}$ kve/g)	2,4	3,7	3,8
Aantal deelnemende laboratoria	13	13	13
Gemiddelde waarde Σa ($\log_{10}$ kve/g)	1,48	2,38	3,36
Herhaalbaarheid standaardafwijking s_r ($\log_{10}$ kve/g)	0,21	0,07	0,06
Herhaalbaarheidslimiet r			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,59	0,18	0,16
Reproduceerbaarheid standaardafwijking s_R ($\log_{10}$ kve/g)	0,22	0,18	0,13
Reproduceerbaarheidslimiet R			
— Afwijking op $\log_{10}$ schaal ($\log_{10}$ kve/g)	0,61	0,52	0,36

NEN-ISO 4831:2006 Coliformen

Detectie en MPN van coliformen vindt plaats door selectieve ophoping in Lauryl sulfate tryptose medium en bevestiging in Brilliant green lactose bile medium, waarbij bij een positieve reactie gasvorming waarneembaar is. De werkwijze is schematisch weergegeven in Figuur 2 (4).

Voor het uitvoeren van de MPN methode wordt gebruik gemaakt van 3 buizen per verdunning en wordt het aantal kve berekend op basis van de tabel uit ISO 7218 (11).

Voor de telling van coliformen wordt gebruik gemaakt van Crystal violet neutral red bile lactose (VRBL) agar. Deze gietplaat met deklaag wordt 24 uur geïncubeerd bij 37°C. Bevestiging gebeurt wederom met Brilliant green lactose bile broth.



Figuur 2: Schematische weergave van onderzoek detectie coliformen (4).

NEN-ISO 16649 *Escherichia coli*

Voor het uitvoeren van een *E. coli* telling volgens NEN-ISO 16649-2 (7) wordt een tienvoudige verdunningsreeks van monster in verdunningsmedium gemaakt. 1 ml hiervan wordt gebruikt in een tryptone-bile-glucuronic medium (TBX) gietplaat. De gietplaat wordt 24 h geïncubeerd bij 44°C en de specifieke kolonies kunnen direct geteld worden zonder verdere bevestiging.

NEN-ISO 16649-1 (6) beschrijft de telling van *E. coli* op TBX na resuscitatie met behulp van een membraan op Mineral-modified glutamate agar (MMGA). Door het toepassen van de resuscitatiestap is de recovery van cellen uit het monster groter. Het membraan wordt geplaatst op de MMGA en 1 ml monster of verdunning wordt op het membraan gedruppeld. De MMGA plaat wordt 4h bij 37 °C geïncubeerd. Hierna wordt het membraan overgebracht op de TBX plaat en verloopt het vervolg van de analyse gelijk aan NEN-ISO 16649-2.

NEN-ISO 16649-3 (8) voor detectie en MPN van *E. coli* is qua opzet gelijk aan de detectie en MPN voor coliformen. Minerals modified glutamate broth wordt gebruikt als selectief ophopingsmedium en 24 h geïncubeerd bij 37°C. Het monster wordt positief beoordeeld als er zuur en/of een gele kleur wordt gevormd. Bevestiging vindt plaats door de ophoping af te strijken op TBX agar.

Conclusie

Enterobacteriaceae, coliformen en *E. coli* zijn indicatororganismen. Ze behoren tot dezelfde familie, maar onderscheiden zich van elkaar door de mogelijkheid tot fermentatie van glucose en lactose.

De werkwijze voor detectie en/of MPN en/of telling is beschreven in de ISO normen 21528 (*Enterobacteriaceae*), 4831/4832 (Coliformen) en 16649 (*E. coli*). De methode voor detectie en telling van *Enterobacteriaceae* is recent gevalideerd en de prestatiekenmerken zijn vastgesteld.

Literatuur

1. Anoniem. 2005. Verordening (EG) Nr. 2073 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen. De Commissie van de Europese Gemeenschappen, Brussels.
2. Anoniem. 2017. ISO 21528 - Microbiologie van de voedselketen – Horizontale methodes voor de detectie en telling van *Enterobacteriaceae* - Deel 1: Detectie van *Enterobacteriaceae*. International Organization for Standardization, Genève.
3. Anoniem. 2017. ISO 21528 - Microbiologie van de voedselketen – Horizontale methodes voor de detectie en telling van *Enterobacteriaceae* - Deel 2: Telplaattechniek. International Organization for Standardization, Genève.
4. Anoniem. 2006. ISO 4831 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique. International Organization for Standardization, Genève.
5. Anoniem. 2006. ISO 4832 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique. International Organization for Standardization, Genève.
6. Anoniem. 2001. ISO 16649-1. Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Horizontale methode voor de bepaling van β -glucuronidase-positieve *Escherichia coli* - Deel 1: Bepaling van



het koloniegetal bij 44 °C met behulp van membraanfiltratie en 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. International Organization for Standardization, Genève.

7. Anoniem. 2001. ISO 16649-2. Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Horizontale methode voor de bepaling van β -glucuronidase-positieve *Escherichia coli* - Deel 2: Bepaling van het koloniegetal bij 44 °C met behulp van 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. International Organization for Standardization, Genève.
8. Anoniem. 2015. ISO 16649-3. Microbiologie van de voedselketen - Horizontale methode voor de telling van het aantal beta-glucuronidase-positieve *Escherichia coli* - Deel 3: Bepaling van het meest waarschijnlijke aantal met gebruik van 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide. International Organization for Standardization, Genève.
9. Anoniem. 2004. ISO 21528-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 1: Detection and Enumeration by MPN technique with pre-enrichment. International Organization for Standardization, Genève.
10. Joosten, H., Marugg, J., Stephan, R., Klijn, A., Jackson, T., and Iversen, C. 2008. A rapid and reliable alternative to ISO 21528-1:2004 for detection of *Enterobacteriaceae*. Int J Food Microbiol. 125 (3): 344-346.
11. Anoniem. 2004. Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Algemene eisen en richtlijn voor microbiologische onderzoeken. International Organization for Standardization, Geneva.



Nederlandse Voedsel- en
Warenautoriteit
Ministerie van Landbouw,
Natuur en Voedselkwaliteit

***Enterobacteriaceae*, coliformen en *Escherichia coli*; wanneer welk onderzoek en hoe**

(NEN-EN-ISO 21528, NEN-ISO 4831, NEN-ISO 4832 en
NEN-(EN-)ISO 16649)

Els Biesta-Peters
Wetenschappelijk medewerker/senior inspecteur
NVWA

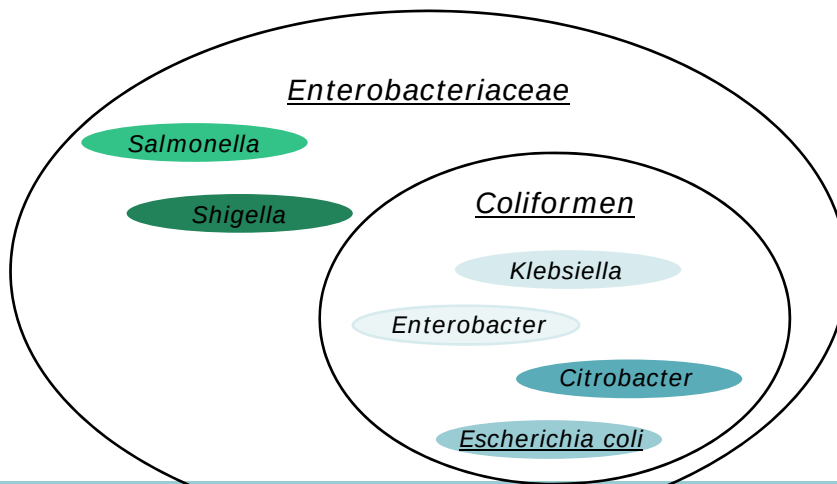


Namen en rugnummers

<i>Enterobacteriaceae</i>	NEN-EN-ISO 21528-1	Detectie (MPN)
	NEN-EN-ISO 21528-2	Telling
Coliformen	NEN-ISO 4831:2006	Detectie en MPN
	NEN-ISO 4832:2006	Telling
<i>Escherichia coli</i> 	NEN-ISO 16649-1:2001	Telling (filtratie)
	(gereviseerde versie begin 2018)	
	NEN-ISO 16649-2:2001	Telling
	(start revisie verwacht in 2018)	
	NEN-ISO 16649-3:2015	Detectie en MPN



Groepering



Overeenkomsten

Facultatief anaeroob
Gram negatief
Staafovormig



Verschillen

<u>Enterobacteriaceae</u>	Glucose fermentatie met zuurvorming
Coliformen	Lactose fermentatie met gasvorming



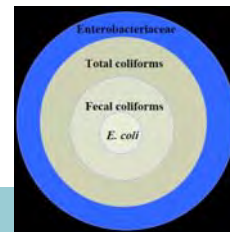


Indicatororganismen

micro-organismen waarvan de aanwezigheid duidt op het mogelijk gelijktijdig voorkomen van pathogene micro-organismen of wijst op een ongewenste toestand

Voorbeeld:

- aanwezigheid van *E. coli* in oppervlaktewater wijst op fecale besmetting van het water en dus op de mogelijke aanwezigheid van pathogene darmbacteriën, zoals *Salmonella*



Indicatororganismen

Voordeel gebruik indicator organisme voor onderzoek:

- relatief eenvoudige analyse
- meestal in hogere aantallen aanwezig zijn dan pathogenen

Enterobacteriaceae hebben coliformen grotendeels verdrongen als indicatororganismen





Proces-indicatoren

Proces-indicatoren: micro-organismen die een indicatie zijn voor een procesfout bij een product dat een bacteriedodende behandeling heeft ondergaan

Voorbeeld:

- *Enterobacteriaceae* als indicatie voor onvoldoende verhitting of nabesmetting (in b.v. gepasteuriseerde eiprodukten)

Proceshygiëne criteria in EU 2073/2005



Hygiëne-indicatoren

Hygiëne-indicatoren: micro-organismen die informatie geven over de hygiëne

Voorbeeld: *Enterobacteriaceae* in verhitte producten als indicatie voor slechte hygiënische toestand





Gecombineerd onderzoek

Bepaling indicatororganismen naast gericht (risk-based) onderzoek op pathogenen

Verordening (EG) 2073/2005 – microbiologische criteria voor levensmiddelen - voorgesneden groenten en fruit:

Voedselveiligheidscriterium

Salmonella n=5, c=0, afwezig in 25 g

Proceshygiëncriterium

E. coli n=5, c=2, m=10 kve/g, M=100 kve/g

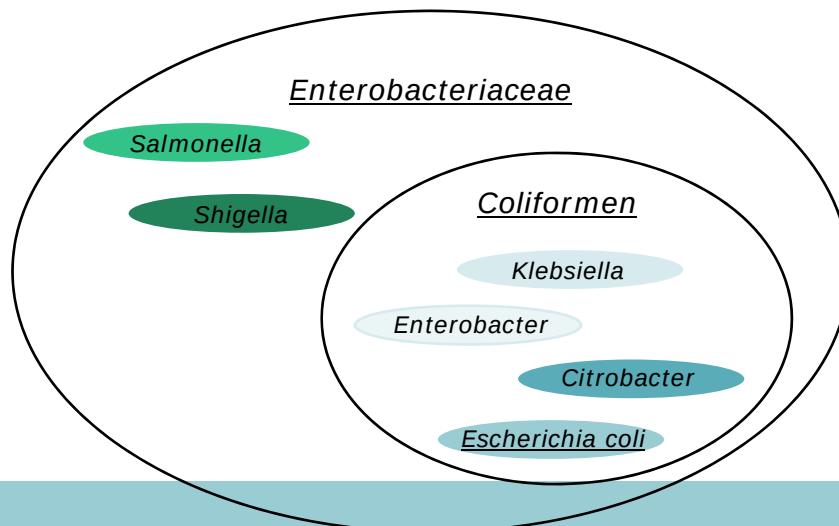


Voorbeeld relevante processtappen en microbiologische richtwaarden in hygiëncodes

	Processtap	Richtwaarden aeroob kiemgetal kve / g	Richtwaarden <i>Enterobacteriaceae</i> kve / g
1	Ontvangst en opslag Grondstoffen / ingrediënten	-	-
2	Bereiding	-	-
3	Afkoelen	10.000	100
4	Bewaren / transport (na bereiding) max. 2 dagen 7°C of 3 dagen 4°C of 4 dagen bij 2-3°C.	1.000.000	1.000
5	Presenteren / verkoop van bereide waar inclusief ongekoeld presenteren gedurende 2 uur	1.000.000	1.000



Inzoomen op methodes



Enterobacteriaceae 21528-1 detectie

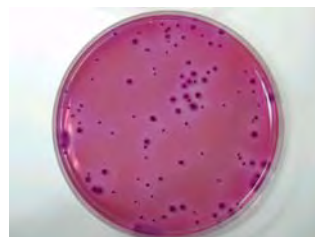
Monster x g + 9 x ml niet selectief medium
Incubatie 18 h, 37° C

~~1 ml + 10 ml EE medium~~
~~Incubatie 24 h, 37° C~~

Afstrijken op VRBG agar
Incubatie 24 h, 37° C

Karakteristieke kolonies reinstrijken op niet-selectieve agar

Bevestigen; Glucose (O/F) medium, oxidase test





Buffered glucose - Brilliant Green-bile broth EE medium

Han Joosten et al., IJFM (2008), 125:344-346

A rapid and reliable alternative to ISO 21528-1:2004 for detection
of *Enterobacteriaceae*

95 *Enterobacteriaceae* stammen gescreend op groei in EE medium

9 stammen groeiden niet door aanwezige galzouten en kleurstof
(7 *Cronobacter sakazakii*, 1 *Cronobacter malonaticus*, 1
Enterobacter amnigenus)



Testen ISO methode met en zonder EE medium

326 monsters

8 verschillende voedsel matrices en omgevingsmonsters

Resultaten:

ISO 21528	235 positieve monsters
ISO 21528 zonder EE medium	232 positieve monsters



Wijziging glucose fermentatie

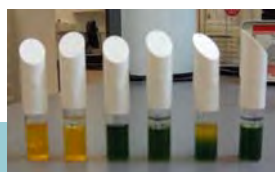
Glucose agar

Pepton (caseine)	10,0 g
Gist extract	1,5 g
Glucose	10,0 g
Natrium chloride	5,0 g
Bromcresol paars	0,015 g
Agar	9 – 18 g
Water	1000 ml



Glucose O/F medium

Pepton (caseine)	2,0 g
Gist extract	1,0 g
Glucose	10,0 g
Natrium chloride	5,0 g
Bromothymol blauw	0,08 g
Agar	2,5 g of 4,0 g
Water	1000 ml



Testen glucose en glucose O/F medium

60 verschillende *Enterobacteriaceae* stammen

	Incubatietijd	Uitslag	Aantal
Glucose	24 h	+	37
		+/-	20
		-	3
	48 h	+	60
Glucose O/F	24 h	+	60
	48 h	+	60



Opzet validatiestudie kwalitatieve methode

21528-1: detectie

3 besmettingsniveaus: blanco, laag, hoog

8 monsters per niveau
(120 monsters per lab)

10 valide datasets

Natuurlijk besmette monsters en kunstmatig besmette monsters



Resultaten validatiestudie kunstmatig besmet

14 deelnemende laboratoria

<u>Zuigelingenvoeding</u>	Blanco	2 cfu/10g	6 cfu/10g
Sensitiviteit	-	98%	100%
Specificiteit	99%	-	-
<u>Tiramisu</u>	Blanco	2 cfu/10g	6 cfu/10g
Sensitiviteit	-	100	100
Specificiteit	99%	-	-
<u>Gerookte zalm</u>	Blanco	2 cfu/10g	6 cfu/10g
Sensitiviteit	-	99%	99%
Specificiteit	96%	-	-



Resultaten validatiestudie natuurlijk besmet

Vlees	Blanco	6 cfu/10g	61 cfu/10g
Sensitiviteit	-	99%	100%
Specificiteit	98%	-	-
-			
Vloeibaar ei	Blanco	12 cfu/10g	25 cfu/10g
Sensitiviteit	-	100%	100%
Specificiteit	99%	-	-



Enterobacteriaceae 21528-2 Telling

Tienvoudige verdunningsreeks van monster in verdunningsmedium

1 ml verdunning in VRBG gietplaat met VRBG deklaag
Incubatie 24 h, 37° C

Karakteristieke kolonies reinstrijken op niet-selectieve agar

Bevestigen; Glucose O/F medium, oxidase test



Opzet validatiestudie kwantitatieve methode

21528-2: Telling

4 besmettingsniveaus: blanco, laag, midden, hoog

2 monsters per niveau

(40 monsters per lab)

8 valide datasets

Natuurlijk besmette monsters en kunstmatig besmette monsters



Resultaten validatie kunstmatig besmet

13 deelnemende laboratoria

Besmettingsniveau ($\log_{10}$ kve/g) 1,5 2,5 3,5



Resultaten validatie kunstmatig besmet

Besmettingsniveau (log10 kve/g)	1,5	2,5	3,5
Diervoeder			
Repeatability limit <i>r</i>	0,34	0,23	0,24
Reproducibility limit <i>R</i>	0,50	0,46	0,56
Gepasteuriseerde melk			
Repeatability limit <i>r</i>	0,40	0,24	0,30
Reproducibility limit <i>R</i>	0,67	0,49	0,54
Tiramisu			
Repeatability limit <i>r</i>	0,59	0,18	0,16
Reproducibility limit <i>R</i>	0,61	0,52	0,36



Resultaten validatie natuurlijk besmet

Vlees

Besmettingsniveau (log10 kve/g)	2,4	3,7	3,8
Repeatability limit <i>r</i>	0,42	0,36	0,27
Reproducibility limit <i>R</i>	0,79	1,02	1,61

Vloeibaar ei

Besmettingsniveau (log10 kve/g)	3,5	4,2	5,8
Repeatability limit <i>r</i>	0,32	0,33	0,70
Reproducibility limit <i>R</i>	0,91	1,39	1,33



Coliformen



Escherichia coli



Citrobacter



Klebsiella



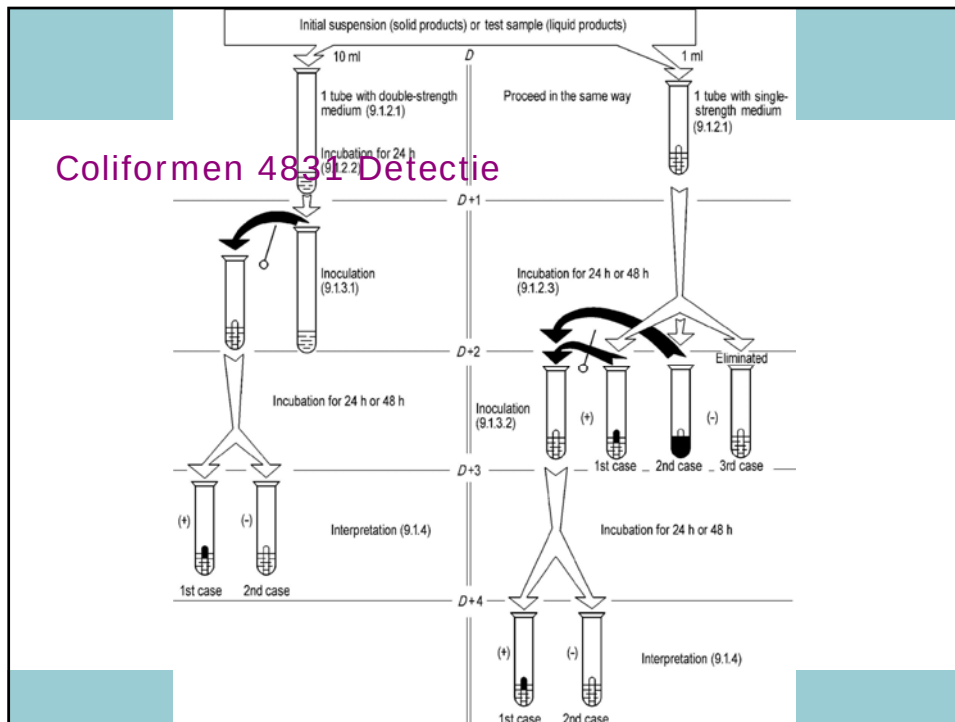
Coliformen 4831 Detectie en MPN

Selectief ophopingsmedium: Lauryl sulfate tryptose broth

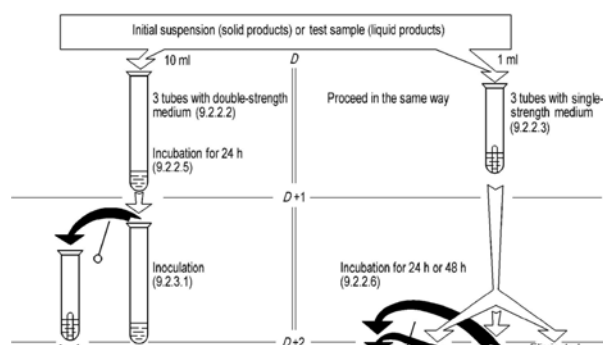
	a) Double-strength medium	b) Single-strength medium
Enzymatic digest of milk and animal proteins	40 g	20 g
Lactose ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	5,5 g	2,75 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	5,5 g	2,75 g
Sodium chloride	10 g	5 g
Sodium lauryl sulfate	0,2 g	0,1 g
Water	1 000 ml	1 000 ml

Bevestigingsmedium: Brilliant green lactose bile broth

Coliformen 4831 Detectie



Coliformen 4831 MPN



Aantal berekend op basis van positieve buizen per verdunning in tabel in ISO 7218

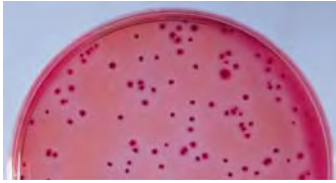


Coliformen 4832 Telling

Crystal violet neutral red bile lactose (VRBL) agar

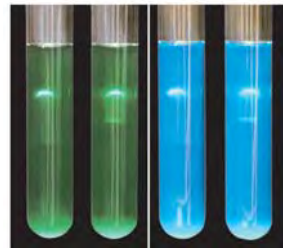
Gietplaat met deklaag

Incubatie 24 h, 37° C



(foto: Biokar diagnostics)

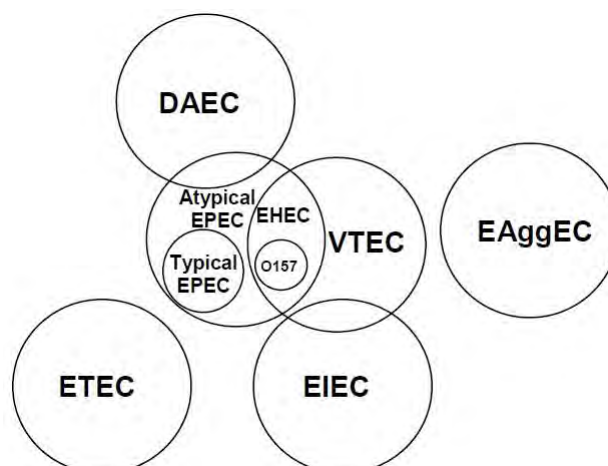
Bevestiging van kolonies in
Brilliant green lactose bile broth



(foto: fishersci.com)



Escherichia coli





E. coli ISO 16649-2 Telling

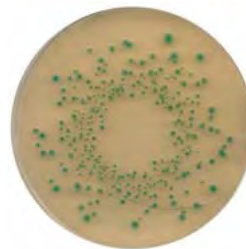
Tienvoudige verdunningsreeks van monster in verdunningsmedium

1 ml in tryptone-bile-glucuronic medium (TBX) gietplaat

Incubatie 24 h, 44° C

TBX:

Enzymatic digest of casein	20,0 g
Bile salts No. 3	1,5 g
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronic acid (BCIG)	144 μ mol ^a
Dimethyl sulfoxide (DMSO) ^b	3 ml
Agar	9 g to 18 g ^c
Water	1 000 ml



(foto: merckmillipore.com)



E. coli ISO 16649-1 Membraanfiltratie telling

Telling op TBX na **resuscitatie** met behulp van membraan op Mineral-modified glutamate agar (MMGA)

Plaats membraan op MMGA

Druppel 1 mL monster of verdunning op membraan

Incubeer 4h, 37 ° C

Breng membraan over op TBX plaat

Verder gelijk aan 16649-2



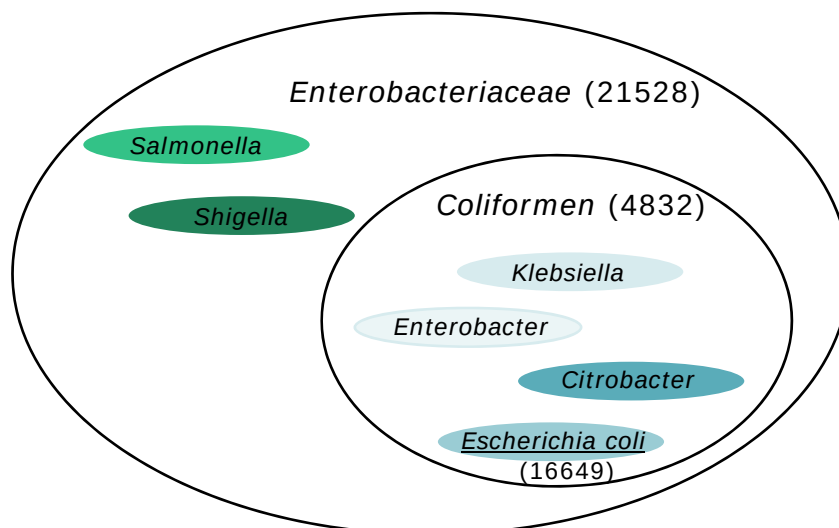
E. coli ISO 16649-3 Detectie en MPN

Opzet methode gelijk aan coliformen

Selectief ophopingsmedium:
minerals modified glutamate broth
Incubeer 24h, 37° C

Beoordeling: positief wanneer zuur gevormd/gele kleur

Bevestig door af te strijken op TBX agar.





Collega's laboratorium voeder- en voedselveiligheid en productveiligheid
Deelnemers aan de interlaboratorium studie *Enterobacteriaceae*
Deelnemers werkgroep TAG 16 *Enterobacteriaceae*



e.g.biesta@nvwa.nl



Nederlandse Voedsel- en
Warenautoriteit
*Ministerie van Landbouw,
Natuur en Voedselkwaliteit*

Validatie en verificatie van microbiologische methoden (NEN-EN-ISO 16140 serie)

Paul in 't Veld
Wetenschappelijk medewerker NVWA



Introductie

- De ISO 16140 serie wordt ontwikkeld door WG3 (method validation) binnen ISO TC 34/SC 9 "microbiologie".
- NL heeft voorzitterschap.
- WG3 gestart in 2006 met volgende mandaat:
 - Revisie ISO 16140 (2003)
 - Ontwikkeling standaard voor verificatie
 - Ontwikkeling standaard voor validatie genormaliseerde referentie methoden
 - Ontwikkeling standaard voor validatie methoden door individuele labs (single lab validation)
 - Ontwikkeling standaard voor een tussenvorm van validatie (intermediate validation)
 - Ontwikkeling standaard voor validatie bevestigingsmethoden.



Gepubliceerde normen

- ISO 16140-1: **Vocabulary** (gepubliceerd 1-7-2016)
- ISO 16140-2: **Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method** (gepubliceerd 1-7-2016)
- ISO 17468: **Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method** (gepubliceerd 1-7-2016)



Nog te publiceren normen

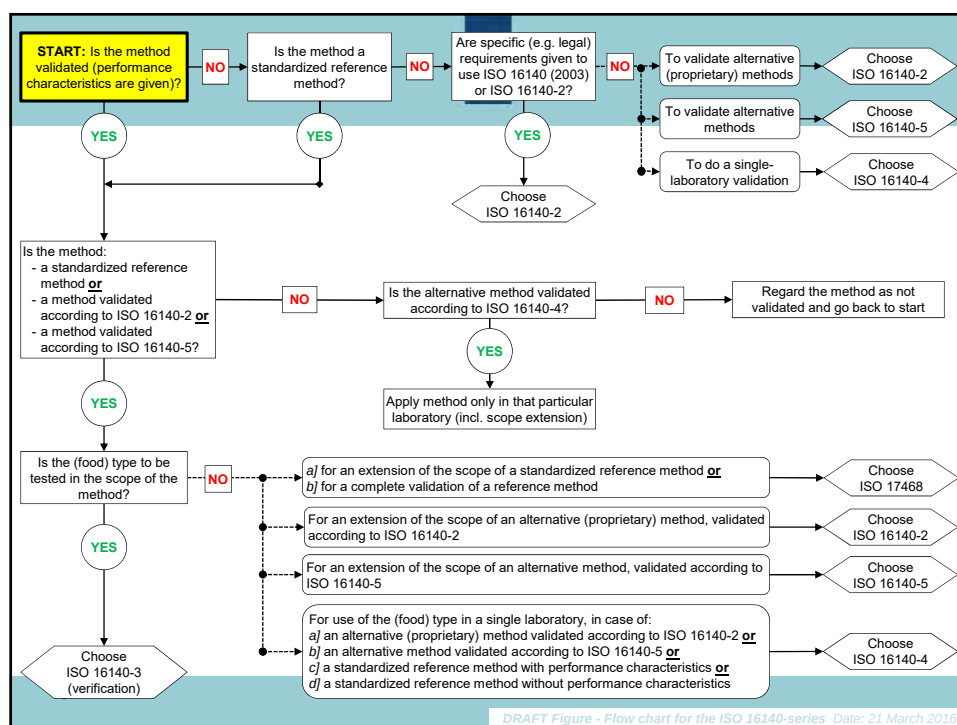
- ISO 16140-3: **Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory** (DIS stemming loopt momenteel)
- ISO 16140-4: **Protocol for single-laboratory (in-house) method validation** (DIS stemming loopt momenteel)
- ISO 16140-5: **Protocol for factorial interlaboratory validation for nonproprietary methods** (DIS stemming loopt momenteel)
- ISO 16140-6: **Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures** (DIS stemming loopt momenteel)



Relatie tussen de delen



5

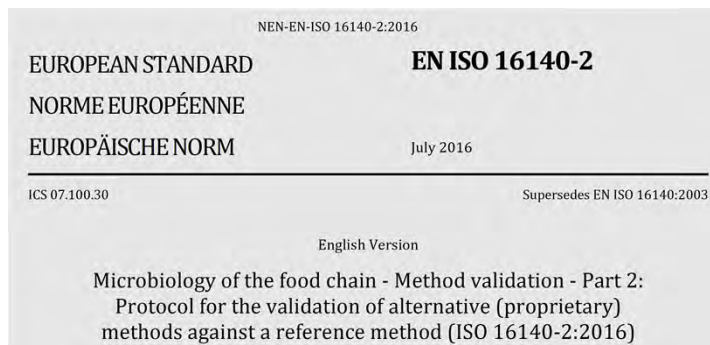


DRAFT Figure - Flow chart for the ISO 16140-series Date: 21 March 2016



ISO 16140-2 (validatie van alternatieve methoden)

- Opvolger van de 16140 (2003).
- Basisopzet behouden (vergelijking referentie en alternatieve methode; methode vergelijkende studie en interlab studie, ...)



ISO 16140-2 (validatie van alternatieve methoden)

Kwalitatieve studie (methode vergelijkende studie):

- Sensitivity study: vergelijking tussen (natuurlijk) besmette monsters. Nieuw: meer categorieën getest; onderscheid tussen gepaarde en ongepaarde studies, geen statistische toets op verschil.
- RLOD study: Vergelijking aantoonbaarheidsgrens op basis van kunstmatig besmette monsters. Nieuw: opzet en evaluatie data.
- Inclusivity/exclusivity study: opzet zelfde, nieuw is verhoging aantal stammen.



ISO 16140-2 (validatie van alternatieve methoden)

Kwantitatieve studie (methode vergelijkende studie):

- Relative trueness study: vergelijking tussen (natuurlijk) besmette monsters. Nieuw: meer categorieën getest; grafische weergave en interpretatie van de data (Bland-Altman- en scatter plots)
- Accuracy profile study: opzet en evaluatie van de data is een combinatie van het kijken naar de juistheid en de precisie van de methode. Nieuw: Opzet, uitvoering en interpretatie geheel nieuw.
- Inclusivity/exclusivity study: opzet zelfde, nieuw is verhoging aantal stammen.



ISO 16140-2 overgangsfase

- Alle methoden die 16140 gevalideerd worden op termijn opnieuw beoordeeld volgens de opzet en de criteria van de 16140-2.
- Betekent dat een deel van de validatie zal worden herhaald, deel wordt opnieuw beoordeeld aan de hand van de nieuwe criteria.
- Nieuwe certificaten worden uitgegeven.
- Transitiedocument door SC9 uitgegeven over hoe de overgang kan worden uitgevoerd.
- In verordening 2073/2005 (microbiologische criteria) zal de tekst worden aangepast om ook 16140-2 daarin op te nemen.
- Tevens aspecten over kwaliteitsborging van de productie en uitgifte certificaat opgenomen.
- Vanaf 1-1-2022 moeten alle alternatieve methoden gevalideerd zijn volgens 16140-2.



ISO 16140-3 (Verificatie van methoden)

- Validation: establishment of the performance characteristics of a method and provision of objective evidence that the performance requirements for a specified intended use are fulfilled.
- Verification: demonstration that a validated method functions in the user's hands according to the method's specifications determined in the *validation* study and is fit for its purpose.
- Momenteel DIS stemming die ook openbaar is. Iedereen kan commentaar leveren tot 1 februari!
<http://www.normontwerpen.nen.nl/Home/Details/600>



16140-3 (methode verificatie)

Verificatie bedoeld voor:

- Referentiemethoden
- Gevalideerde alternatieve methoden



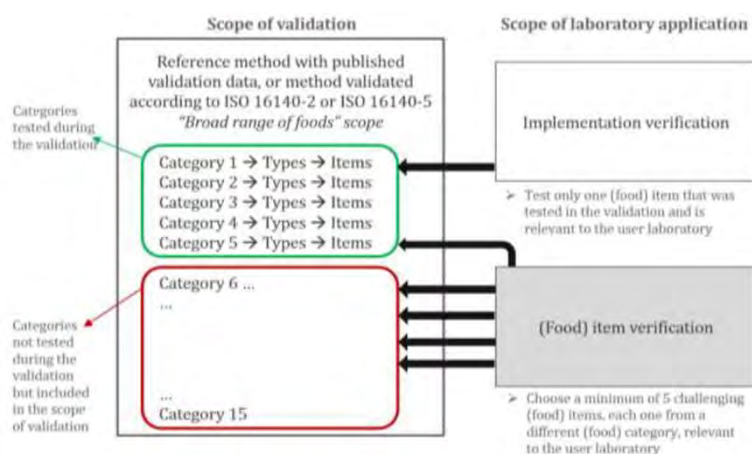
Table 1 — Implementation verification and (food) item verification

	Method with published validation data		Method without published validation data	
	Reference method	Alternative method	Reference method	Alternative method
Implementation verification	✓	✓	Not applicable	Not applicable ^a
(Food) item verification	✓	✓	✓	Not applicable ^a

^a Not applicable: the method shall first be validated to ISO 16140-2 or ISO 16140-5 (see Figure 1) after which validation data are available.



ISO 16140-3 (methode verificatie)



13



ISO 16140-3 (Verification of methods)

- Kwalitatieve methoden:
 - bepaling van een 'geschatte' LOD_{50} ($eLOD_{50}$)
- Kwantitatieve methoden:
 - bepaling van een 'geschatte' bias ($eBias$) en
 - reproduceerbaarheid (S_{IR})
(link met bepalen van meetonzekerheid ISO 19036)

Method	Performance characteristic	Implementation verification	(Food) item verification
Qualitative	Estimated LOD_{50} ($eLOD_{50}$)	✓	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility (S_{IR})	✓	
	Estimated bias ($eBias$)		✓

NOTE Regarding intralaboratory reproducibility (S_{IR}), the relationship with ISO/CD 19036 is further explained in 6.1.

14



Bepaling eLOD₅₀

High inoculation level (targeted 10×LOD ₅₀ /test portion)	Intermediate inoculation level (targeted 5×LOD ₅₀ /test portion)	Low inoculation level (targeted 1×LOD ₅₀ /test portion)	Blank level	eLOD ₅₀ (cfu/test portion)
2/2	2/2	2/2	0/2	< 1×LLI ^a
2/2	2/2	1/2	0/2	= 1×LLI
2/2	2/2	0/2	0/2	= 2×LLI
2/2	1/2	2/2	0/2	= 2×LLI
2/2	1/2	1/2	0/2	= 3×LLI
2/2	1/2	0/2	0/2	= 4×LLI
2/2	0/2	2/2	0/2	Unreliable result ^b
2/2	0/2	1/2	0/2	= 5×LLI
2/2	0/2	0/2	0/2	= 8×LLI

NOTE The MPN calculator used can be found at: <http://standards.iso.org/iso/7218>.

^a LLI = low level of inoculation.

^b This combination of results is very unlikely to occur with the levels of contamination tested and therefore leads to an unreliable result according to the MPN calculator. The test shall therefore be repeated.



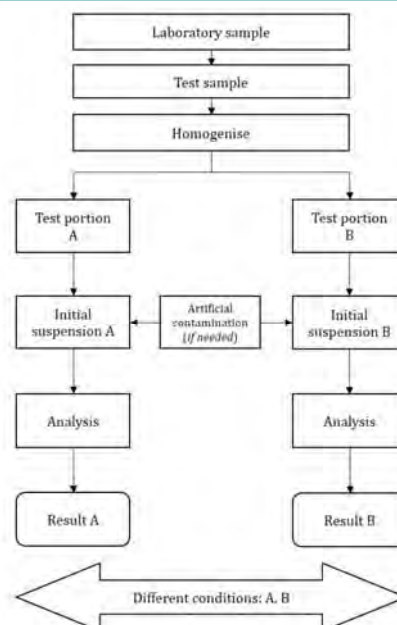
Bepaling eBias

	Results (log ₁₀ cfu/g)		Mean result per batch (log ₁₀ cfu/g)		Difference between method to be verified with artificially contaminated (food) item and the inoculum suspension
	Method to be verified with artificially contaminated (food) item	Method to be verified with inoculum suspension (without (food) item)	Method to be verified with artificially contaminated (food) item	Method to be verified with inoculum suspension (without (food) item)	
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 1	1,87	2,15	2,06	2,17	-0,11
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 2	2,25	2,20			
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 1	3,93	4,23	3,99	4,29	-0,30
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 2	4,04	4,35			
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 1	3,73	3,59	3,68	3,62	0,06
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 2	3,63	3,65			



Bepaling reproduceerbaarheid (S_{IR})

- Experimentele opzet gelijk aan die in het concept ISO 19036.
- Minimaal 10 monsters onderzoeken.
- Bepaling van methode effect van de meetonzekerheid.
- Berekening zelfde als die nu in ISO 19036 staat.



17



ISO 16140-6 (validatie bevestigingsmethoden)

- Is de validatie van een deel of het geheel aan bevestigingstesten die in een referentiemethode staan beschreven tegen een (eigendomsrechtelijke) alternatieve bevestigingsmethode (bv API 20 E of PCR test of Maldi-TOF).
- Uitgangspunt bij de validatie is een verdachte kolonie en geen levensmiddel.
- Is eigenlijk een uitgebreid onderzoek naar de inclusivity/exclusivity zoals in 16140-2 staat opgenomen
- Maakt gebruik van goed gedefinieerde stammen.
- Opzet afhankelijk of er bevestigd wordt op geslacht, species of subspecies niveau.
- Is vergelijking tussen referentie en alternatieve methode. Gegevens over stamidentiteit alleen gebruikt in geval van verschil tussen beide methoden.

18



ISO 16140-4 (validatie door individuele labs)

- Kan gebruikt worden om wijzigingen aan een normmethode te valideren maar ook voor het valideren van een geheel nieuw ontwikkelde methode.
- Validatiedata alleen toepasbaar in het eigen lab.
- In norm 2 validatie aanpakken beschreven (klassiek en factorial design)
- Bij opzet onderscheid gemaakt tussen validatie met en zonder referentiemethode.



ISO 16140-5 (Factorial interlab validation)

- Factorial design bedoeld om op een efficiënte manier (minimalisering van het aantal monsters) een volledige validatie te kunnen uitvoeren.
- Nadeel is dat het inzetten van de monsters onder specifiek gekozen condities moet worden uitgevoerd.
- Voor interlab studie nu minimaal 4 labs nodig.
- Is nieuwe werkwijze waar nog geen/weinig ervaring mee is in de microbiologie.
- Deze werkwijze kan de interlab studie volgens ISO 16140-2 niet vervangen.



DANK VOOR DE AANDACHT





De (on) mogelijkheden van het gebruik van Petrifilm

Frank de Bok

Eurofin Food Safety Solutions

Alternatieve telplaatmethode

Petrifilm van 3M is een alternatieve telplaatmethode voor het uitplaten in of op vaste voedingsbodems in Petrischalen, die meer dan 30 jaar geleden ontwikkeld is door 3M. Voor ongeveer 50% van alle kiemtellingen wordt vandaag de dag (wereldwijd) gebruik gemaakt van Petrifilm platen voor het kwantificeren van specifieke groepen van micro-organismen.

Petrifilm platen bestaan uit een film van 10 bij 7,5 cm met daarop een gedehydrateerde voedingsbodem, die alle nutriënten en componenten bevat om een specifieke groep van micro-organismen te kunnen laten groeien. Door de verdunningsvloeistof hierop te pipetteren ontstaat een gel waarin micro-organismen vanuit de verdunningsvloeistof zich kunnen ontwikkelen.

Verschillende groepen micro-organismen

3M heeft platen ontwikkeld voor verschillende groepen van micro-organismen zoals aeroob kiemgetal, gisten en schimmels, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* en *Escherichia coli*. Deze telplaatmethode heeft veel voordelen ten opzichte van het traditionele kweken in petrischalen; de platen zijn kant-en-klaar voor gebruik, zijn een jaar houdbaar en zeer praktisch in gebruik. Ze nemen ook veel minder ruimte in dan traditionele platen en, zowel het uitplaten als het tellen van de kolonies op de platen, is gemakkelijk te automatiseren.

Gevalideerd en gecertificeerd

Petrifilm platen van 3M zijn door instanties als AFNOR en AOAC gevalideerd en gecertificeerd mogen daarom ook gebruikt worden als alternatief voor de ISO-methoden die genoemd worden in Verordening EG Nr. 2073 (2005).

Gebruik door Eurofins

Eurofins – KBBL, één van de microbiologie laboratoria van Eurofins Food Testing Netherlands (voorheen KBBL), besloot in 2012 om voor een aantal (traditionele) telplaatmethoden over te stappen op Petrifilm van 3M en tegelijkertijd ook te onderzoeken in hoeverre het mogelijk was om de methode te automatiseren.

Inobot en 'Tecnic Automated Plate Reader'

In samenwerking met Tecnic en 3M werd een robot (de 'Inobot') ontwikkeld om het verdunningen automatisch uit te laten platen op Petrifilm en de platen ook meteen te labelen en te sorteren. Ook voor het tellen van kolonies werd een apparaat ontwikkeld; de 'Tecnic Automated Plate Reader' (TAPR).

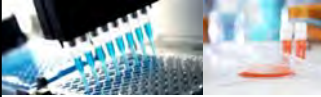


Eurofins – KBBL biedt inmiddels 7 verschillende parameters aan waarvoor gebruik wordt van Petrifilm en de Inobot.

Zes van deze parameters zijn door de Raad voor Accreditatie beoordeeld als gelijkwaardig aan de desbetreffende referentiemethode.

Nadelen

Nadelen van Petrifilm zijn dat deze niet voor alle wettelijk vereiste parameters beschikbaar is en het verder specificeren van kolonies is in veel gevallen niet of maar beperkt mogelijk. Deze nadelen wegen echter niet op tegen de voordelen en na vijf jaar Petrifilm met de Inobot kan Eurofins-KBBL dan ook niet anders dan concluderen dat de overstap één van de beste beslissingen is geweest die het laboratorium gemaakt heeft de afgelopen 10 jaar.



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. This document contains information that is confidential and proprietary to Eurofins Scientific SE and / or its affiliates and is solely for the use of the personnel of Eurofins Scientific SE and all its affiliates. No part of it may be used, circulated, quoted, or reproduced for distribution outside companies belonging to the Eurofins group. If you are not the intended recipient of this document, you are hereby notified that the use, circulation, quoting, or reproducing of this document is strictly prohibited and may be unlawful.



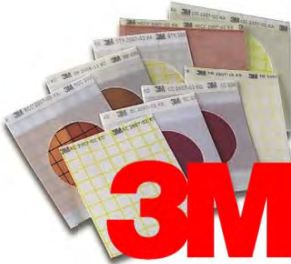
DE (ON) MOGELIJKHEDEN VAN HET GEBRUIK VAN PETRIFILM



Frank de Bok



Food Testing



FiMM symposium 'Nieuwe normen in het lab' / 25 januari 2018 www.eurofins.com

Over Eurofins



Eurofins is marktleider in bio-analytische testen:

- ❑ Omzet van € 2,54 miljard
- ❑ Meer dan 310 laboratoria met 28.000 werknemers
- ❑ Actief in 39 Europese landen, de VS, Azië, het Midden-Oosten en Zuid Amerika
- ❑ 130.000 verschillende analysemethoden
- ❑ Diepgaande kennis van technische en reglementaire zaken
- ❑ Gefocust op het veilig stellen van de producten en merken van onze klanten
- ❑ Investerings in R&D en state-of-the-art apparatuur
- ❑ Snel reactievermogen en grote capaciteit



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

FiMM symposium 'Nieuwe normen in het lab' / 25 januari 2018 2

Over 3M



- ❑ Global sales: \$30,2 miljard
- ❑ International (niet-VS) sales: \$18,23 miljard (60%)
- ❑ Productie in ongeveer 70 landen
- ❑ Verkoop van 3M producten in ongeveer 200 Landen
- ❑ 89.446 medewerkers wereldwijd



2015: \$ 65 miljoen aan cash en product donaties

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd. 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

FiMM symposium 'Nieuwe normen in het lab' / 25 januari 2018

3

KBBL ➔ Eurofins



2018: Integratie van KBBL in Eurofins Food Testing (NL)



Food Testing

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd. 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

FiMM symposium 'Nieuwe normen in het lab' / 25 januari 2018

www.eurofins.com 4

Testen van (dier)-voeding, mest en water / microbiologie



Legionella (water)

Salmonella spp.

Listeria monocytogenes

Aeroob kiemgetal

Enterobacteriaceae

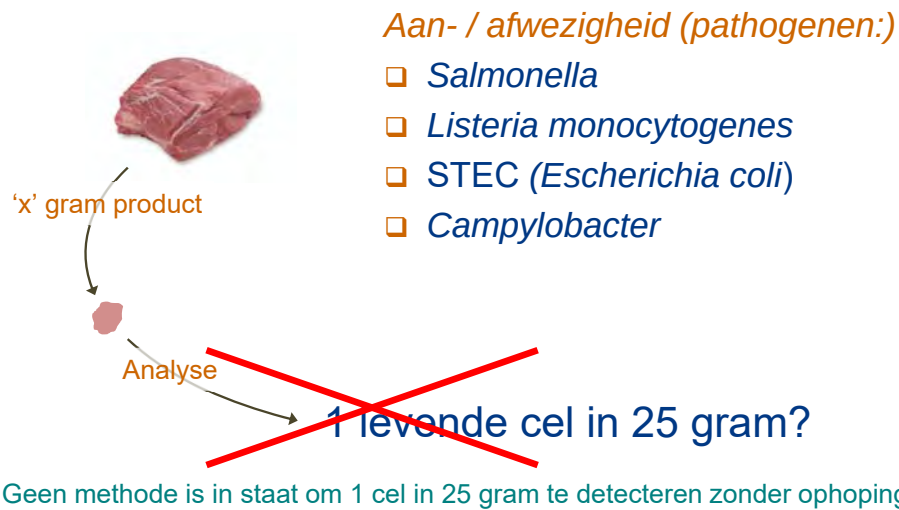
Competitie op het gebied van testen is groot



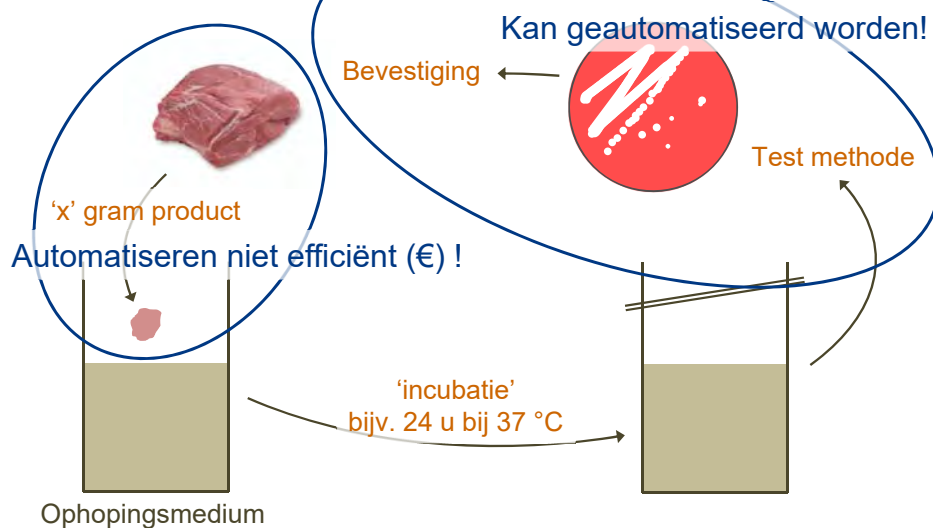
➡ Kosten reduceren...

➡ Mogelijkheden om te automatiseren?

Peter Visser



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Automatisering van detectie methoden ?



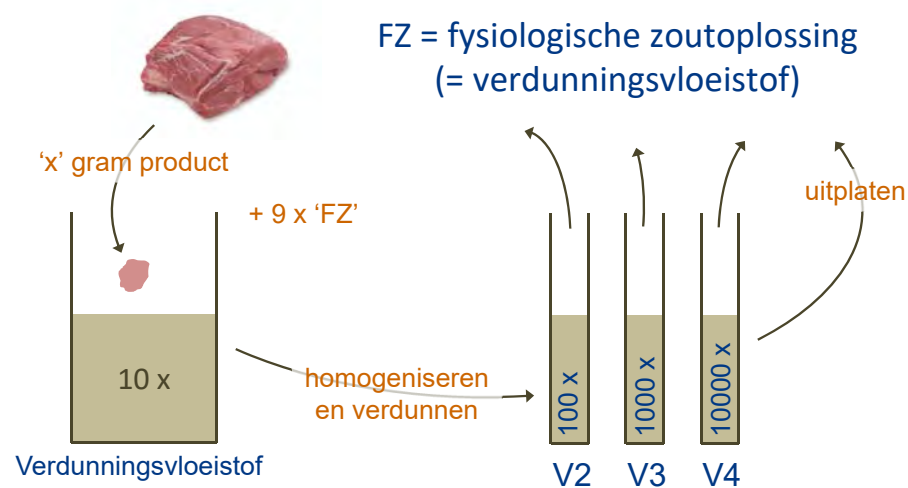
Automatisering van detectie methoden (na ophoping):

- ❑ PCR – Polymerase Chain Reaction
- ❑ ELISA – gebaseerde methoden (immunologie)
- ❑ Mass Spectrometry Maldi-TOF
- ❑ 3M Molecular detection system



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Automatisering van telplaatmethoden ?



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Uitplaten: Automatisering begon al in de jaren zeventig:



The Automatic Spreading of Bacterial Culture over a Solid Agar Plate

R. E. Trotman

First published: September 1971 Full publication history

APPLIED MICROBIOLOGY, Feb. 1973, p. 244-252
Copyright © 1973 American Society for Microbiology



Vol. 25, No. 2
Printed in U.S.A.

Spiral Plate Method for Bacterial Determination

J. E. GILCHRIST, J. E. CAMPBELL, C. B. DONNELLY, J. T. PEELER AND J. M. DELANEY

Division of Microbiology, Food and Drug Administration, Cincinnati, Ohio 45226

Received for publication 18 August 1972

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd. 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Aeroob kiemgetal, #1 parameter bij KBBL (in 2010):

ISO 4833 – 1. Microbiologie van de voedselketen –
Horizontale methode voor de telling van micro-organismen
– Deel 1: Telling bij 30 graden Celsius met de gietplaat-
techniek (ISO 4833-1:2013, IDT):

- ☐ Gietplaatmethode (in agar), Plate Count Agar (PCA)
- ☐ Incubatie bij 30 °C voor 72 ± 3 u
- ☐ Alle zichtbare kolonies worden geteld

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd. 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Verordening (EG) Nr. 2073/2005

Levensmiddelen categorie	Mikro-organismen	Bemonsteringsschema ⁽¹⁾		Grenswaarden ⁽²⁾		Referentie analyse-methode ⁽³⁾
		n	c	m	M	
2.1.6 Gehakt vlees	Aëroob kiemgetal ⁽⁷⁾	5	2	5×10^5 kve/g	5×10^6 kve/g	ISO 4833
	E. coli ⁽⁸⁾	5	2	50 kve/g	500 kve/g	ISO 16649-1 of 2

Microbiologie van de voedselketen – Horizontale methode voor de telling van microorganismen – Deel 1: Telling bij 30 graden Celsius met de gietplaattechniek (ISO 4833-1:2013, IDT)

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Article 5 (5) van de verordening:

“Exploitanten van levensmiddelenbedrijven mogen andere bemonsterings- en testprocedures gebruiken als zij tot tevredenheid van de bevoegde autoriteit kunnen aantonen dat die procedures ten minste gelijkwaardige garanties bieden.”



Petrifilm is gevalideerd en gecertificeerd door AFNOR!

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

3M Petrifilm, een alternatieve telplaatmethode



In 2009 begonnen met Petrifilm Aerobic Count en *E. coli*

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific, etc. is strictly prohibited.

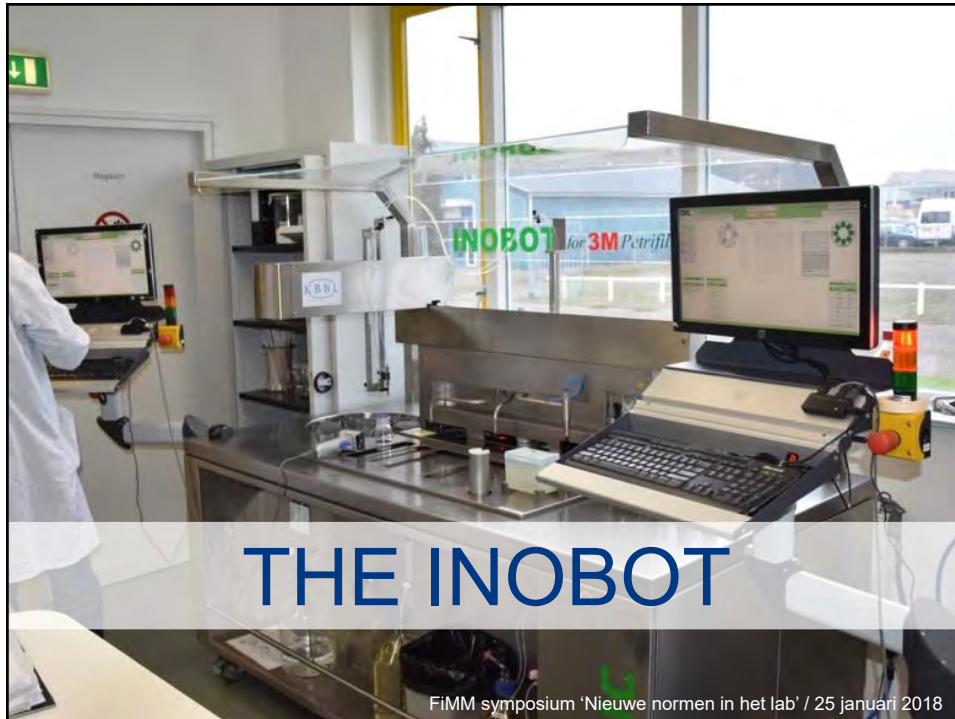
Voordelen van Petrifilm (vs. traditionele telplaatmethoden)

- ☐ Houdbaarheid van 1 jaar (bij $< 7^{\circ}\text{C}$)
- ☐ Kant-en-klaar voor gebruik
- ☐ Praktisch in gebruik, minimale verwerkingstijd
- ☐ Minder ruimte nog voor incubatie en opslag
- ☐ Geautomatiseerd tellen: Petrifilm plate reader



KBBL (in 2009): kunnen we het uitplaten automatiseren?

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific, etc. is strictly prohibited.



Petrifilm van 3M / automatisering



De Inobot:

Uitgaande van 1^e decimale verdunning van een monster:

- ☐ Het maken van decimale verdunningen
- ☐ Mengen en uitplaten van verdunningen op Petrifilm
- ☐ Labelen en sorteren van Petrifilm platen

Video ...



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

In-huis validatie van de Inobot / Petrifilm in 2012

Interne validatie (tegen standaard methoden)

- ❑ Total Colony Count (AC) / ISO 4833-1
- ❑ Coliform Count (CC) / ISO 4832
- ❑ Select *Escherichia coli* (SEC) / ISO 16649-2
- ❑ *Enterobacteriaceae* (EB) / ISO 21528-2
- ➔ Resultaten vergelijkbaar met standaard methoden

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

NR		TESTLABORATORIUM WIJHE, NEDERLAND		Raad voor Accreditatie RvA www.rva.nl	
L239		Eurofins K.B.B.L. B.V.			
Nr.	Materiaal of product	Verrichting / Onderzoeksmethode	Intern referentienummer	Locatie	
9	Mest, digestaat en compost	Bepalen van het aantal Enterococci	ML/AL/45 eigen methode	W	
10	Levensmiddelen, diervoeders en mest	Bepalen van het totaal aeroob koloniegetal bij 30°C; telplaat, Petrifilm	ML/AL/42 gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 4833 (AFNOR 3M 01/01-09/89) Diervoeders en mest; eigen methode	W	
11	Levensmiddelen, diervoeders, mest en compost	Bepalen van het aantal β-D-glucuronidase-positieve <i>Escherichia coli</i> bij 42°C; telplaat, Petrifilm	ML/AL/41 gelijkwaardig aan NEN-ISO 16649-2 (AFNOR 3M 01/08-06/01) Diervoeders, mest en compost; eigen methode	W	
12	Levensmiddelen en diervoeders	Bepalen van het aantal coliformen bij 37°C; telplaat, Petrifilm	ML/AL/54 gelijkwaardig aan NEN-ISO 4832 (AFNOR 3M 01/02-09/89) Diervoeders; eigen methode	W	

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Eurofins – KBBL in 2017

Aerobic Count (AC) Q

Enterobacteriaceae (EB) Q

Coliform Count (CC) Q

Select E. coli (SEC) Q

Staph Express (STX) Q

Rapid Yeast and Mold (RYM) Q

Lactic Acid Bacteria (LAB) AFNOR



Q: Geaccrediteerd door de Raad voor Accreditatie RvA

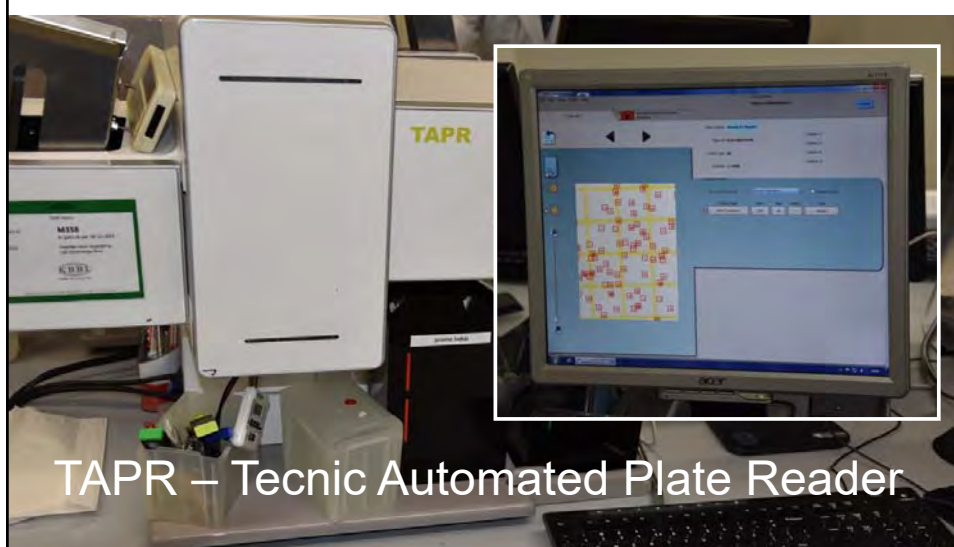
CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

De voordelen voor Eurofins - KBBL:

- ☐ Minder ruimte nodig voor incubatie en opslag
- ☐ Kortere doorlooptijden
- ☐ Minder fouten / laboratorium besmettingen
- ☐ Minder afval
- ☐ Geen media bereiding meer nodig
- ☐ Kosten reducering; ~8 fte (voor 80.000 testen / jaar)



CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.



TAPR – Tecnico Automated Plate Reader

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.

Nadelen / uitdagingen:

- ❑ Specificeren van kolonies maar beperkt mogelijk
- ❑ Niet voor alle relevante parameters beschikbaar

3M: wél voor 80% van het totale volume!

- ❑ Sommige soorten maken de gel vloeibaar ('liquifiers')
- ❑ Meeste melkzuurbacteriën groeien niet op Petrifilm AC

Plaat voor melkzuurbacteriën: Petrifilm LAB

- ❑ Geautomatiseerd tellen nog niet optimaal...

Implementatie van aanpassingen met verhuizing

CONFIDENTIAL AND PROPRIETARY - © Eurofins Scientific (Ireland) Ltd, 2015. All rights reserved. Any use of this material without specific permission of an authorised representative of Eurofins Scientific SE is strictly prohibited.



Hartelijk dank voor uw aandacht!



frankdebok@eurofins.com

www.eurofinsfoodtesting.nl



Food Testing

