

Microbiologische methoden in het laboratorium



Suzanne Arts - van den Hoven
NutriControl BV
Dinsdag 11 februari 2020

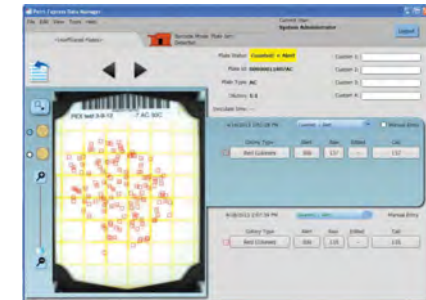
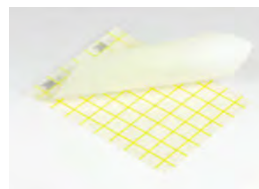
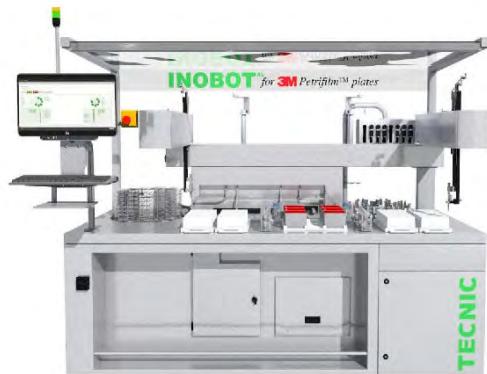
Microbiologische methoden in het laboratorium

Traditionele



VS

Alternatieve



methoden voor food / feed

Microbiologische methoden in het food / feed laboratorium

- > Tellingen (inclusief MPNs)
- > Detecties (met / zonder isolatie)
- > Bevestigingen



Klassieke telmethoden

Doel: bepalen van aantal micro-organismen welke in staat zijn tot groei.

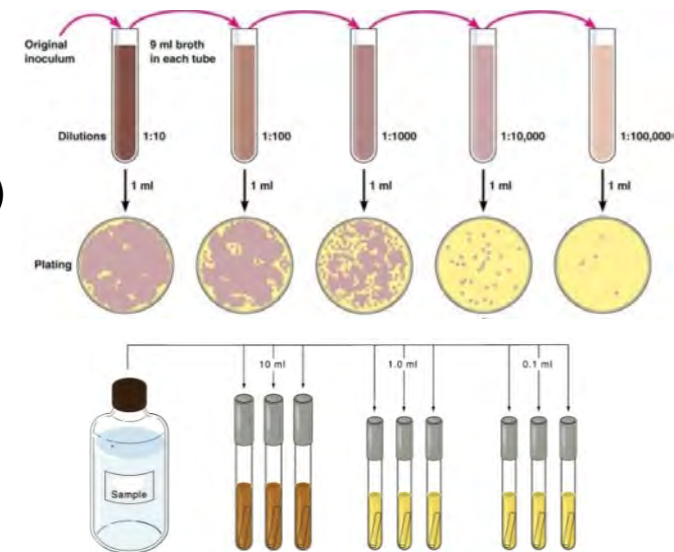
Methode:

Primaire verdunning (evt. resuscitatie) → Uitplaten in / op vaste voedingsbodem
of diverse verdunningen in vloeibaar medium (MPN) → evt. bevestiging

Voor- en nadelen:

- + Vaak erkend als referentie methode
- + Goedkoop qua media en investeringen* (indien handmatig)
- Arbeids- en materiaalintensief
- Lange doorlooptijd (bv. G&S ≥ 5 dagen)
- Bevestigingen
- Persoonsgebonden interpretatie

* Automatisering: mediabereider, gietstraat, kolonieteller



Instrumentele alternatieve telplaat

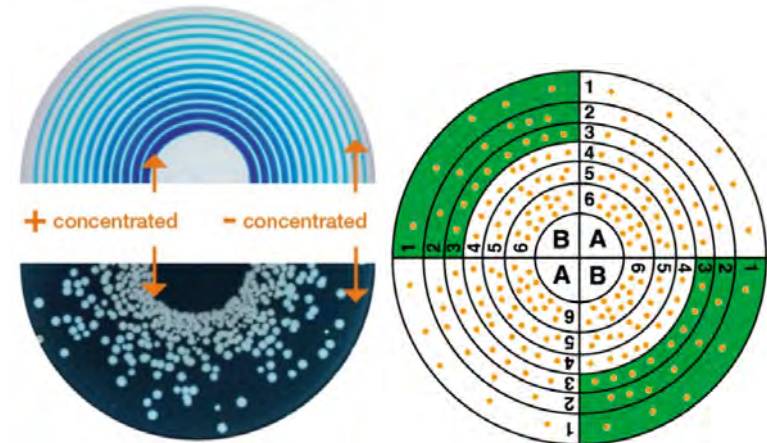
- > Spiraalplaat (IUL, Interscience)

Voor- en nadelen:

- + Geen last van matrixmateriaal bij telling
 - kolonieteller
- + Te gebruiken voor alle media in petrischaal
- + Telbereik $> 10^6$ kve/g (geen decimale verdunningen
 - minder arbeid / materiaal)
- 50 μ l → detectiegrens 20x hoger dan 1 ml gietplaat

Bij gebruik rekening houden met:

- > Aanvullend gietplaten (tellingen < 200 kve/g)
- > Tellingen giet- en spiraalplaat niet altijd vergelijkbaar
- > Verstoppingen stylus mogelijk door matrix



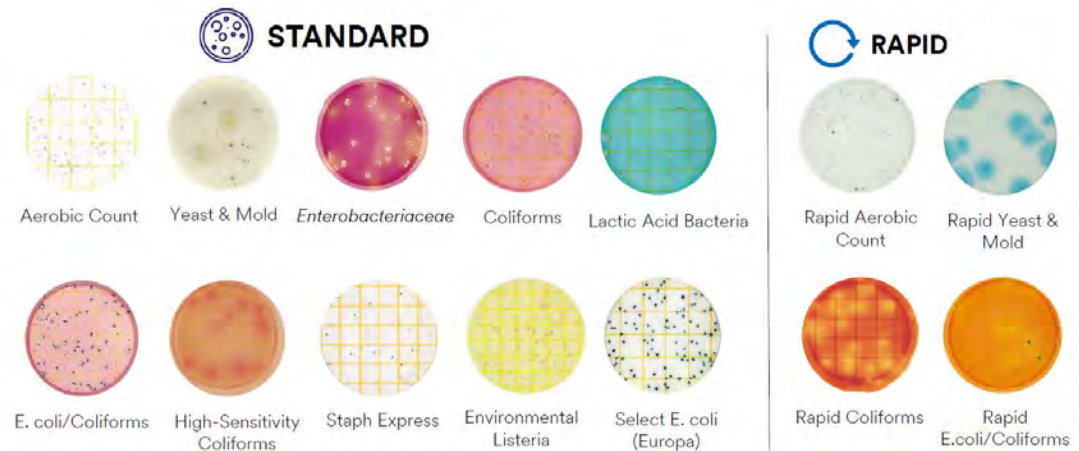
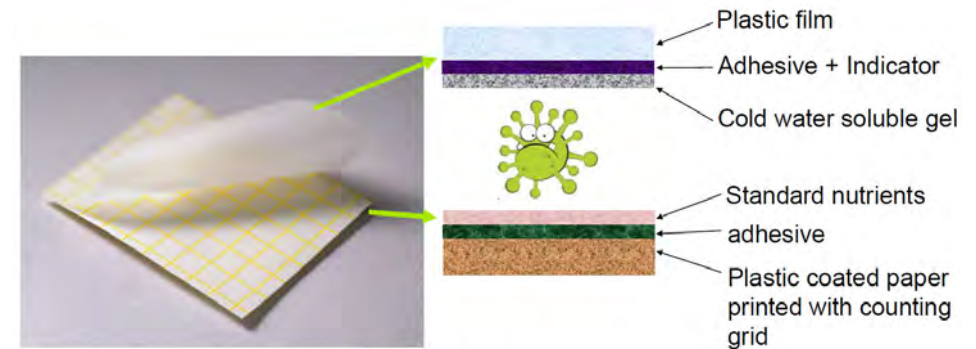
Compacte alternatieve telplaat

> Petrifilm (3M)

AC, YM, EB, CC, LAB, EC, SA (LS)

Voor- en nadelen:

- + Direct te gebruiken
- + Lange THT (tot 18 mnd kk)
- + (Meestal) snelheid
- + Minder ruimte, minder afval
- + Automatisering: inzetten / tellen
- + Ook geschikt voor afdrukmonsters
- Kleiner teloppervlak



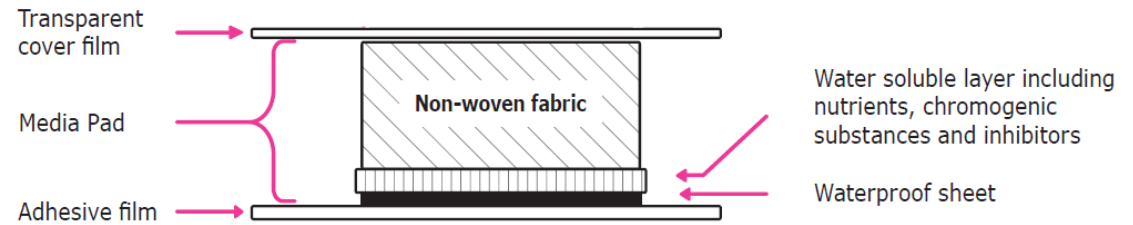
Compacte alternatieve telplaat

> MC-Media Pad (JNC)

AC, EC (YM, CC, SA)

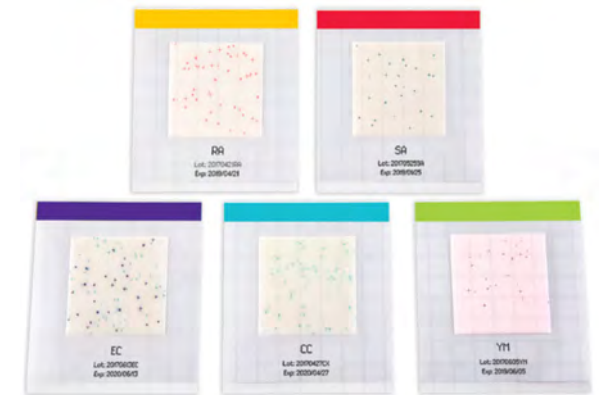
> Compact Dry (HyServe)

EB, EC, BC, ETC, PA (AC, YM, CC, SA, LS, SL)



Voor- en nadelen:

- + Direct te gebruiken
- + Lange THT (tot 3 jaar kk vs. tot 2 jaar kt)
- + (Meestal) snelheid
- + Minder ruimte, minder afval
- Kleiner teloppervlak
- (Nog) niet te automatiseren



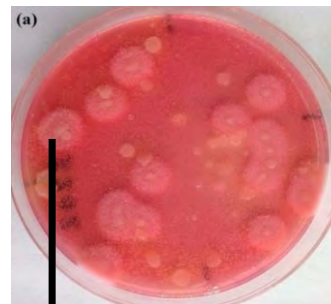
Chromogene telmedia

- > Solabia (Compass, Symphony, Rhapsody), bioMérieux/AES (ChromID, Rebecca, Bacara), Bio-Rad (RAPID'), Oxoid (Brilliance)

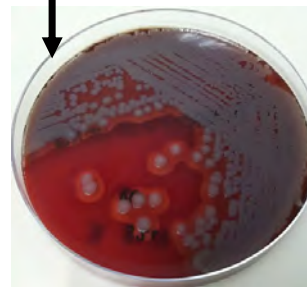
Voor- en nadelen:

- + Sneller dan ISO
- + Duidelijker aflezen
- + Minder stoorflora
- + Meestal geen bevestiging
- Kostprijs media

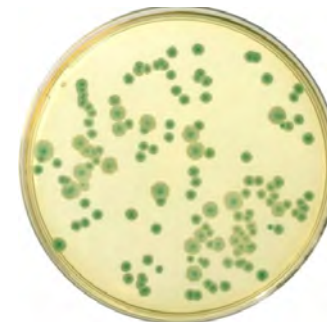
MYP (2d)



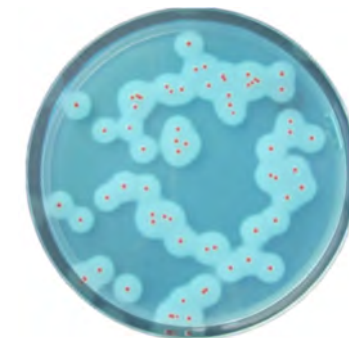
+ BA (1d)



vs. 1d: Compass B. cereus



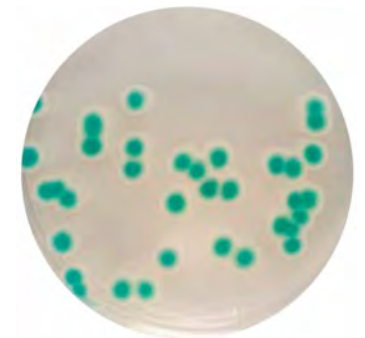
RAPID'



Bacara



Brilliance



MPN methoden

- > TEMPO (bioMérieux): 16 kanaals (10-49.000 kve/ml)
AC, STA, EB, EC, TC, BC (CC, YM, LAB, CAM)
- > SimPlate (BioControl): 84 wells (1-738 kve/ml)
AC (TC, EC, YM, CAM)

Voor- en nadelen:

Tempo:

+ Minimale kans cross-contaminatie, minder afval, automatisering

Algemeen:

+ Direct te gebruiken, lange THT

- Grenzen telbereik

- Meetonzekerheid



Keuze telmethoden

- > Doel?
- > Type lab: weinig / veel verschillende methoden / ISO 17025

Bij gebruik rekening houden met:

- > Status methode: wel / geen ISO 16140-2 validatie
Indien ISO 16140-2 validatie: let op toepassing (type producten)
- > Automatisering / traceerbaarheid / LIMS
- > Verificeren geschiktheid met eigen producten



Klassieke detectie methoden

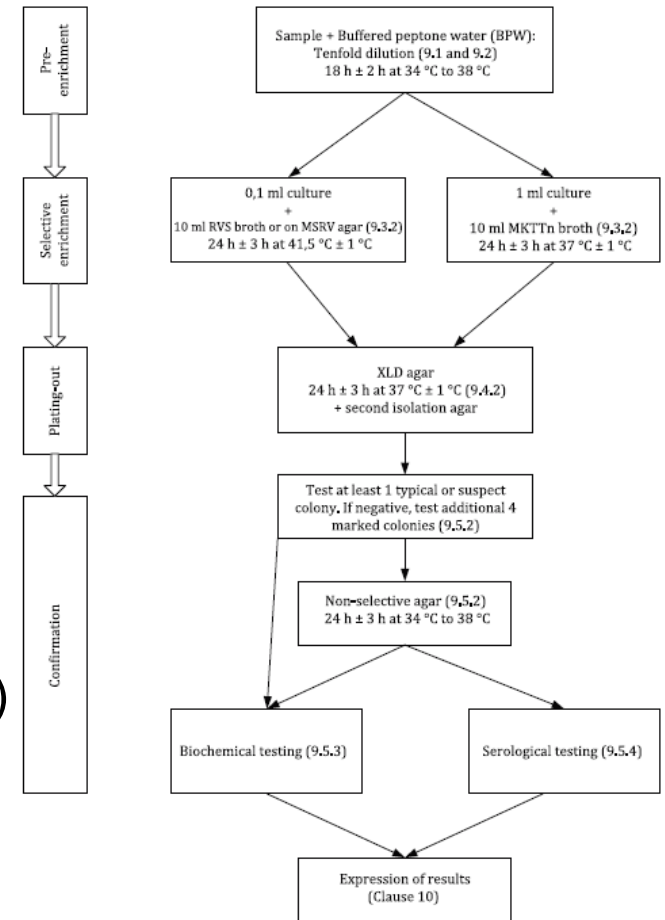
Doel: Aantonen min. 1-5 kve target-organismen / testportie

Methode:

Primaire ophoping → Secundaire selectieve ophoping
→ Isolatie medium → evt. bevestiging

Voor- en nadelen:

- + Vaak erkend als referentie methode
- + Goedkoop qua media en investeringen
- Arbeids- en materiaalintensief
- Lange doorlooptijd (neg. 1-4 dagen, pos. 5-7 dagen)
- Veel bevestigingen
- Persoonsgebonden interpretatie



Detectie methoden

Modificaties aan ophopingsmedia:

> Bouillons t.b.v. *Listeria/Salmonella*:

ONE Broth (Oxoid), *Listeria* Special Broth (Bio-Rad), *Listeria* Xpress (bioMérieux)

> Semi-solid media t.b.v. *Salmonella*:

MSRV, SESAME (Solabia), SMS (bioMérieux/AES)

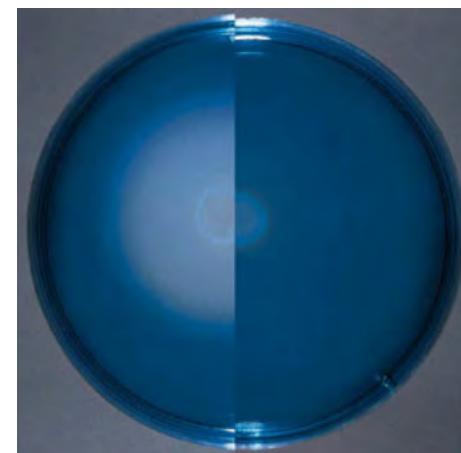
Voor- en nadelen:

+ Sneller dan ISO

+ Minder arbeid / materiaal

Semi-solid:

- Mist niet-beweeglijke *Salmonella*

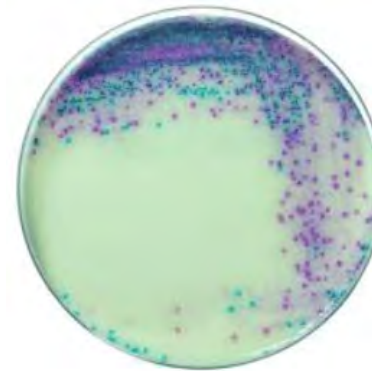
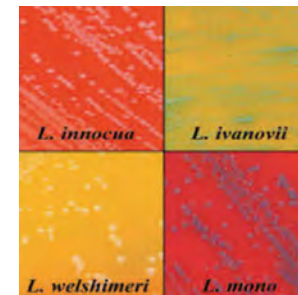
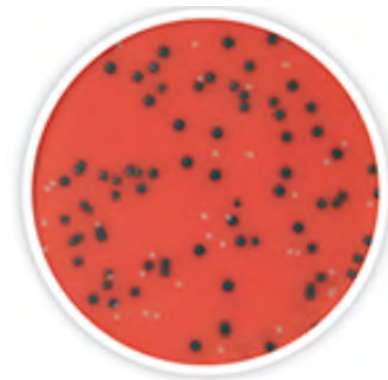


Chromogene detectie media (met isolatie)

- > Solabia (Compass, SESAME, IRIS), bioMérieux/AES (ChromID, ... One Day), Bio-Rad (RAPID'/AL agar), Oxoid (Precis), Neogen (LESS Plus)

Voor- en nadelen:

- + Sneller dan ISO
- + Minder arbeid / materiaal
- + Duidelijker aflezen
- + Differentiatie species
- + Geen of eenvoudige bevestiging
- Kostprijs media



Immunochemisch detectie (zonder isolatie)

- > VIDAS Next Day & 48h (bioMérieux), Transia Plate Gold (BioControl), Ridascreen (R-Biopharm), Reveal (Neogen), Solus ELISA (Solus), OLRT (Oxoid), BACSpec (Eurofins)

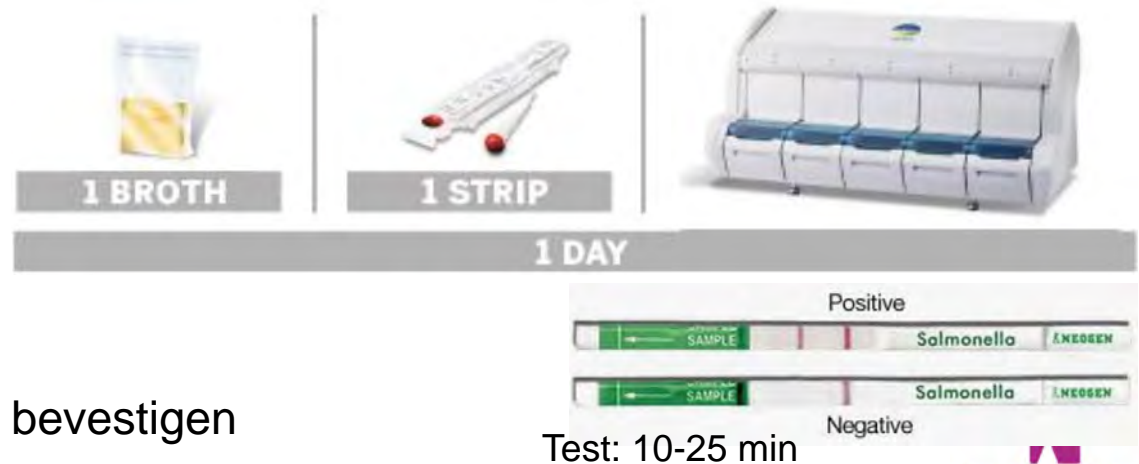
Voor- en nadelen:

- + Eenvoud
- + Relatief snel (test: 45-120/180 min), uitslag vaak binnen 1 tot 2 dagen
- + Duidelijke uitslag
- + Meeste te automatiseren
- Veel pipetteerwerk (handmatig)

Bij gebruik rekening houden met:

Detectiegrens: 10^4 - 10^5 kve/ml

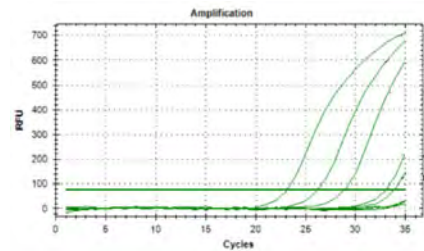
Indien verdacht, aanvullend isoleren / bevestigen



Moleculaire detectie (zonder isolatie)



- > Bio-Rad (iQ-Check), GeneDisc (PALL), Eurofins (BacGene), Assurance GD (BioControl), BAX (Qualicon), Gene-up, AdiaFood (bioMérieux/AES), SureTect, RapidFinder (Oxoid/Thermo Scientific), ANSR (Neogen), MicroSEQ, Pathatrix (Life Technologies), Qiagen Mercon (Qiagen), LumiProbe (Euralam), Accuprobe, FoodProof (Biotecon), *Salmonella* DNA test kit (BioCheK), MDS (3M)



Moleculaire detectie (zonder isolatie)

Voor- en nadelen:

- + Snel (test: 30-120 min), uitslag vaak binnen 1 dag
- + Indien 96 wells: 1-94 monsters / run
- + Gevoelig (10^1 - 10^3 kve/ml) = vergelijkbaar kweek
- + Duidelijke uitslag
- + Automatisering mogelijk
- Evt. dode micro-organismen
- Gevoelig voor inhibitie
- Gevoelig voor contaminatie
- Kostprijs kits



Moleculaire detectie (zonder isolatie)

Bij gebruik rekening houden met:

- > Indien verdacht, aanvullend isoleren / bevestigen
- > 1 PCR protocol voor alle testen (incubatietijden)
- > Reagentia pipetteren / k&k
- > Opslag kits kk / kt
- > Open / gesloten PCR systemen
- > Capaciteit PCR machine
- > Contaminatierisico bij PCR (gescheiden ruimtes)
- > Kalibratie PCR machines



Keuze detectiemethoden

- > Doel?
- > Vergeet de tijd voor voorophoping niet

Bij gebruik rekening houden met:

- > Status methode: wel / geen ISO 16140-2 validatie
Indien ISO 16140-2 validatie: toepassing (type producten) goed lezen
- > Automatisering / traceerbaarheid / LIMS
- > Verificeren geschiktheid met eigen producten



Bevestigings- en identificatie technieken

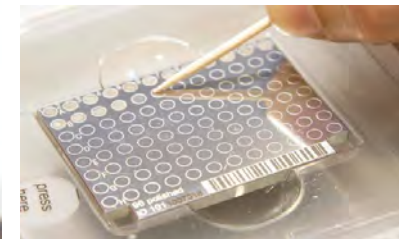
- > API, VITEK 2 (bioMérieux)
- > BBL Crystal ID (BD)
- > EnteroPluri Test (Liofilchem)
- > Microbact (Oxoid)
- > MALDI Biotyper (Bruker, ISO 16140-6)

Voordelen / nadelen:

- + Arbeidsbesparing
- + Eenvoudig
- Kostprijs

MALDI Biotyper:

- + Identificatie (± 3000 species)
- + Snel (96 monsters < 60 min)
- Investering / onderhoud



Conclusie

Indien alternatieve methode aantoonbaar werkt in lab:

Voordelen:

- > Snel (kortere doorlooptijd / betere doorstroming)
- > Eenvoud (uitvoering / automatisering)
- > Reproduceerbaarheid
- > Algemene kostenreductie

Opmerkingen:

Geen enkele methode is 100% gevoelig en specifiek

Opleiding van analisten blijft belangrijk

(onjuist gebruik = afwijkende resultaten)

Extern gevalideerde alternatieve methoden

Validatie volgens ISO 16140-2 en ISO 16140-6:

Minimaal gelijkwaardige resultaten t.o.v. ISO

→ methode geaccepteerd als gelijkwaardig aan ISO:

- AFNOR:

<https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/#discover-certified-methods>

- MicroVal:

<https://microval.org/en/issued-certificates/>

- NordVal:

<https://www.nmkl.org/index.php/en/publications/category/nordval-sertifikater>

Validatie volgens AOAC richtlijnen:

- AOAC International:

<https://www.aoac.org/>



**Bedankt voor
de aandacht!**

Nog vragen?

