

SNELLE METHODEN

microbiologie van voedingsmiddelen en water

1e druk

MYbusinessmedia

COLOFON

Snelle Methoden - Microbiologie van voedingsmiddelen en water
ISBN 978-90-857-2043-0

'Snelle Methoden - Microbiologie van voedingsmiddelen en water' is een uitgave van:
MYbusinessmedia b.v.
Essebaan 63c, 2908 LJ Capelle aan den IJssel; Postbus 8632, 3009 AP Rotterdam
Tel: 010-2894078; fax: 010-2894076
E-mail: Abonnementenservice@mybusinessmedia.nl
Internet: www.mybusinessmedia.nl

Uitgever

Drs. S. Wanders

Redactie

Drs. P.M.M. Enthoven, dr. H.J.M. Aarts (RIVM), dr. A. Stals (Universiteit Gent),
ir. H. Stegeman, prof. dr. ir. M. Uyttendaele (Universiteit Gent), H.R. Veenendaal
(KWR Watercycle Research Institute) en dr. ir. P. in 't Veld (NVWA)
E-mail: redactie.amm@mybusinessmedia.nl

Eindredactie

A. Grootenhuis (Circade)

Vormgeving

W.G. Dam en A. Grootenhuis (Circade)

Coördinatie

Ing. J. Damman

Dit boekwerk is met de grootste zorgvuldigheid en nauwkeurigheid samengesteld. De redactie en uitgever nemen geen verantwoording voor de juistheid van door derden verstrekte gegevens, noch voor de gevolgen van onjuistheden en zetfouten die in handboeken met een veelheid aan gegevens, blijkens de ervaring, zelfs bij de meest nauwkeurige en zorgvuldige bewerking kunnen voorkomen.

© 2012 MYbusinessmedia b.v.

Behoudens uitzondering door de wet gesteld, mag zonder schriftelijke toestemming van de rechthebbende(n) op het auteursrecht niets uit deze uitgave verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of anderszins, hetgeen ook van toepassing is op de gehele of gedeeltelijke bewerking. De uitgever is met uitsluiting van ieder ander gerechtigd de door derden verschuldigde vergoedingen voor kopiëren, als bedoeld in artikel 17 lid 2 van de Auteurswet van 1912 en in het Koninklijk Besluit van 20 juni 1974 (Stb. 351) ex artikel 16b van de Auteurswet 1912, te innen en/of daartoe in en buiten rechte op te treden.

DE REDACTIE

De onafhankelijke redactie van 'Snelle methoden - Microbiologie van voedingsmiddelen en water' wordt gevormd door deskundigen die op een of andere manier nauw betrokken zijn bij de ontwikkeling en/of validatie van alternatieve methoden dan wel in de praktijk hiermee ervaring hebben opgedaan.

- *Drs. Peter Enthoven* (hoofdauteur) heeft als microbioloog bij een commercieel laboratorium zo'n dertig jaar ervaring opgebouwd op onder andere het gebied van snelle methoden. Hij is werkzaam als vakdeskundige bij de Raad van Accreditatie (RvA) en is lid van NEN/ISO-werkgroepen.
- *Dr. Henk Aarts* werkt bij het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), meer specifiek bij het Centrum Infectieziektebestrijding/Laboratorium voor Zoönose en Omgevingsmicrobiologie. Hij is daar zowel afdelingshoofd Voedsel als senior-onderzoeker. Speerpunten zijn typering, antibiotica-resistentie en dynamiek van micro-organismen in voedsel. Moleculaire detectie en typering behoren tot zijn expertise.
- *Dr. Ambroos Stals* (gastauteur) onderzocht gedurende zijn PhD studie de moleculaire detectie van norovirussen in levensmiddelen. Hij is sinds 2011 post-doctoraal medewerker bij het Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie en -conservering aan de Universiteit Gent (België) en bij het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO).
- *Ir. Henk Stegeman* is als microbiologisch adviseur onder andere werkzaam als method reviewer voor MicroVal, als teamleider/vakdeskundige bij de Raad voor Accreditatie (RvA) en is lid van NEN/ISO-werkgroepen.
- *Prof. dr. ir. Mieke Uyttendaele* studeerde aan de Universiteit Gent (België) Bio-Science Engineering (1992) en behaalde in 1996 haar PhD in Applied Biological Sciences. Bij deze universiteit is zij sinds 2004 hoogleraar bij het Department of Food Safety and Food Quality van de Faculty of Bioscience Engineering. Haar onderzoeksterrein beslaat de microbiële analyse van voedingsmiddelen, voedselveiligheid en microbiologische risico-evaluatie. Zij verzorgt op de universiteit voor bio-ingenieurs cursussen 'Microbiologische Analyse en Veiligheid van Levensmiddelen' en 'Moleculaire en Microbiële Technieken'.
- *Harm Veenendaal* was als hoofd van het Laboratorium voor Microbiologie van KWR Watercycle Research Institute nauw betrokken bij de ontwikkeling van snelle detectietechnieken en kwantitatieve methoden op onder meer het gebied van DNA en RNA voor de waterleidingbedrijfstack.
- *Dr. ir. Paul in 't Veld* houdt zich bij het NVWA-laboratorium voor voeder en voedselveiligheid vooral bezig met methode-ontwikkeling, -validatie en -implementatie. Hij is voorzitter van de werkgroep 'ISO WG3 revisie ISO 16140' en is daarnaast vakdeskundige microbiologie voor de Raad voor Accreditatie (RvA).

VOORWOORD

Snelle (alternatieve) methoden: wie zijn het, waar komen ze vandaan, wat hebben ze te bieden, door welke laat ik mij verleiden? Het topic 'snelle methoden' gaat meestal gepaard met enige suspense. Er worden bepaalde verwachtingen opgeroepen en nieuwe veelbelovende ontwikkelingen doen zich voortdurend voor. Aan een ontknoping van het verhaal en het antwoord op de (voor velen) ultimate vraag - zullen snelle methoden de klassieke methoden verdringen - zijn we nog steeds niet toe.

De realiteit is wel dat snelle methoden in de 21e eeuw volledig ingeburgerd zijn in de diagnostische laboratoria voor voedingsmiddelen en water. Moleculaire technieken, de laatste echt 'nieuwe' ontwikkeling qua detectiemethode, zijn midden jaren negentig van de vorige eeuw commercieel op de markt geïntroduceerd en inmiddels volwassen geworden. Snelle methoden zitten niet langer onder de vleugels van de onderzoeker, maar leiden hun eigen leven in de markt. Deze evolutie is ook gestimuleerd door het aanbieden van de soms complexe methoden in een gebruiksvriendelijk jasje. Zo worden in onze tijd van rationalisatie (gebruiksvriendelijke) geautomatiseerde methoden bijzonder gewaardeerd door gebruiker en klant.

Bij elke introductie van een nieuwe techniek is er aanvankelijk wat aarzeling en voorbehoud, maar tijd en ervaring (en een stevig validatiedossier) geven vertrouwen en zorgen voor acceptatie. Bovendien wordt steeds duidelijker dat snelle methoden onontbeerlijk zijn om in onze veeleisende kennismaatschappij binnen de kortst mogelijke tijd een zo juist mogelijk antwoord te geven op de vraag of ons voedsel (en water) voldoet aan gestelde kwaliteitsnormen en veiligheidseisen. Ook kloppen er steeds nieuwe gevaren aan de deur waardoor klassieke kweekmethoden alleen niet langer voldoen: denk aan (nieuwe varianten van) virussen, pathogene *E. coli*'s en bacteriële toxinen.

Snelle methoden verdienen dan ook hun eigen boek. Een team van redactieleden heeft veel kennis en praktijkervaring samengebracht om het scenario ervan uit te werken. Dit heeft geleid tot een handig boek waarin de lotgevallen van elk van de familieleden (chromogene media, automatisering, immunologische en moleculaire technieken, etc.) in geuren en kleuren worden beschreven.

Het blijft aan de gebruiker om uit te maken welk lid van de familie (welke techniek) zijn of haar persoonlijke favoriet is. Ik ben er ook zeker van dat de familie de komende tijd nog verder zal groeien en dat er nog onverwachte plotwendingen te verwachten zijn. Het blijft dus een boek met een open einde. Wordt vervolgd...

Veel leesgenot,

Mieke Uyttendaele

Hoofddocent Microbiologische Analyse en Veiligheid van Levensmiddelen, Universiteit Gent

INHOUDSOPGAVE

Toelichting	9
Begrippenlijst	11
1 Inleiding	15
2 Teltechnieken	17
2.1 Compacte alternatieven voor de telplaat	17
2.1.1 Petrifilm	17
2.1.2 Ridacount en Sanita-kun	22
2.1.3 Compact Dry	23
2.2 Chromogene en fluorogene agars	24
2.3 Op MPN gebaseerde methoden	28
2.3.1 SimPlate	28
2.3.2 Colilert	30
2.3.3 Tempo	31
2.4 Op metabole activiteit van micro-organismen gebaseerde methoden	34
2.4.1 Tellen met ATP-meting	34
2.4.2 Impedantiemeting	36
2.4.3 Turbidimetrie en andere fotometrische bepalingen	39
2.4.3.1 Troebelheid meten	39
2.4.3.2 Fotometers om veranderingen te meten	39
2.4.3.3 Kleurstoffen als indicator voor metabolische of specifieke enzymactiviteit	39
2.4.3.4 GreenLight-methode om het totaal koloniegetal te bepalen	40
2.5 Op microscopische technieken gebaseerde telmethoden	41
2.5.1 DEFT	41
2.5.2 Flowcytometrie	42
2.6 qPCR	43
3 Detectietechnieken	47
3.1 Op modificatie van klassieke technieken gebaseerde detectiemethoden	48
3.1.1 Chromogene agars	49
3.1.2 Semisolid agar	52

3.1.2.1	MSRV-agar	52
3.1.2.2	De 1-2 Test	53
3.1.2.3	Salmonella Rapid Test	53
3.1.2.4	Ophopingsmedia	53
3.1.2.5	Colitag	56
3.1.2.6	Op impedantie gebaseerde methode	56
3.2	Op immunochemische technieken gebaseerde detectiemethoden	56
3.2.1	ELISA (of EIA)	58
3.2.2	LIA	65
3.2.3	Immunoconcentratie	68
3.3	Op DNA of RNA gebaseerde detectiemethoden	71
3.3.1	DNA- en RNA-probes	72
3.3.2	PCR-technieken	73
3.3.2.1	Conventionele PCR	73
3.3.2.2	Real-time PCR	79
3.3.2.3	PCR-kits	82
4	Identificatie- en bevestigingstechnieken	87
4.1	Definities	87
4.2	Morfologische en biochemische testen en/of galerijen	88
4.3	Serologische bevestiging	93
4.4	Moleculaire technieken voor bevestiging, identificatie of typering	95
4.4.1	CAMP en hemolysetest van <i>L. monocytogenes</i> versus PCR als bevestigingstest	96
4.4.2	Bevestiging en identificatie van <i>Campylobacter</i> spp. met PCR	97
4.4.3	Bevestiging en karakterisering van VTEC-stammen	97
4.4.4	Bevestiging en karakterisering van <i>Bacillus cereus</i> -stammen	99
4.4.5	Microarrays	100
4.5	Chemotaxonomie als basis voor identificatie	100
4.5.1	Vetzuuranalyse	100
4.5.2	Analyse van eiwitprofielen via SDS-PAGE	101
4.5.3	Massaspectrometrie	102
4.5.4	DNA- of RNA-sequentie-analyse	102

5	Detectie van via voedsel overdraagbare virussen	105
5.1	Virusextractie	105
5.2	RNA-zuivering	107
5.3	Moleculaire detectie en genotypering	108
5.4	Controles	109
5.5	Detectielimieten en recovery	109
5.6	Ontwikkelingen	111
6	Detectie van bacteriële toxinen	113
6.1	Staphylococcus aureus	113
6.2	Bacillus cereus	117
6.3	Clostridium perfringens	119
6.4	Clostridium botulinum	120
7	Nieuwe ontwikkelingen	123
7.1	Op DNA gebaseerde methoden	123
7.1.1	Amplificatie	123
7.1.1.1	Thermal cycling	123
7.1.1.2	Isotherme reacties	125
7.1.2	Microarray-analyse	126
7.1.3	DNA-sequentie-analyse en MALDI-TOF MS	131
7.2	Biosensoren	131
7.2.1	Bioreceptoren	132
7.2.2	Optische biosensoren	133
7.2.3	Elektrochemische biosensoren	134
7.2.4	Massagevoelige (piëzo-elektrische) biosensoren	134
8	Procesautomatisering	137
8.1	Mediumbereiding	137
8.1.1	De mediumbereider	138
8.1.2	De platengieter	140

8.1.3	Instrumenten voor uitvullen	142
8.1.4	Gamma-gesteriliseerde droge media	143
8.2	Automatisering van de klassieke methoden	144
8.2.1	Stappen in het analyseproces	145
8.2.2	Geautomatiseerde processtappen koppelen	154
8.3	Automatisering van alternatieve methoden	155
8.3.1	Robots	155
8.4	Dataverwerking met LIMS-programma's	157
9	Randvoorwaarden	161
9.1	Selectiecriteria voor alternatieve methoden	161
9.1.1	De microbiologische analyse: 'Bezint eer ge begint'	162
9.1.2	Snelheid en kostprijs: essentieel in laboratoriummanagement	166
9.1.3	Betrouwbaarheid van de methode en laboratoriuminfrastructuur	168
9.1.4	Het belang van duurzaamheid	171
9.1.5	Een keuze conform de vereisten van het laboratorium	173
9.1.5.1	Methoden voor tellingen van bedervers en hygiëne-indicatoren	173
9.1.5.2	Snelle pathogeedetectie: immunologische en PCR-technieken	179
9.2	Validatie en verificatie van alternatieve methoden	186
9.2.1	Validatie van alternatieve methoden (volgens NEN-EN-ISO 16140)	188
9.2.2	Verificatie van alternatieve methoden	191
9.2.3	Gebruik van het validatiecertificaat	193
	Tabellenoverzicht	195
	Leveranciersoverzicht	196
	Index	213

TOELICHTING

Het gebruik van kweekmethoden vormt al ruim een eeuw de basis voor het microbiologisch onderzoek, waaronder het onderzoek van voedingsmiddelen. Deze methoden zijn gebaseerd op het vermogen van micro-organismen om zich te vermenigvuldigen tot zulke grote aantallen dat er op isolatiemedia zichtbare kolonies ontstaan.

Door de keuze van de incubatiecondities (temperatuur, tijd, beschikbaarheid van zuurstof), variaties in de aanwezige nutriënten, het toevoegen van selectieve stoffen (remmen de groei van ongewenste organismen) en electieve stoffen (maken een verschil tussen het doelorganisme en andere organismen beter zichtbaar) zijn isolatiemedia geschikt te maken voor verschillende (groepen) organismen.

Het handboek 'Microbiologie van Voedingsmiddelen', waarvan in 2007 de 4e druk verscheen onder redactie van ir. R. Dijk e.a., is al meer dan een decennium hét naslagwerk en een begrip voor ieder in het Nederlandse taalgebied die met dit onderwerp te maken heeft. Dit handboek beschrijft uitvoerig de verschillende kweekmethoden en hun toepassing.

Ook wordt een hoofdstuk ('Alternatieve methoden') gewijd aan methoden die op andere technieken dan de traditionele kweektechniek gebaseerd zijn. Maar vanwege het toegenomen aanbod en gebruik van deze methoden alsook de steeds verdergaande nieuwe ontwikkelingen, wordt nu aan de alternatieve methoden een apart boek gewijd.

De titel

Als titel voor dit boek hebben we gekozen voor 'Snelle methoden'. Deze term is van toepassing op een (groot) deel van de alternatieve methoden die voor de microbiologische analyse van voedingsmiddelen en water zijn ontwikkeld. De voordelen van snelle methoden kunnen liggen op het gebied van snelheid, maar ook in eenvoud van analyse, hogere robuustheid, verbeterde betrouwbaarheid en lagere kosten. Dus redenen genoeg om te kiezen voor 'Snelle methoden voor microbiologie van voedsel en water'.

Hoofdstukindeling

In de negen hoofdstukken worden de meest relevante alternatieve (= snelle) methoden (hoofdstukken 2 t/m 7), procesautomatisering (hoofdstuk 8) en de randvoorwaarden voor het gebruik van alternatieve methoden (hoofdstuk 9) beschreven.

Methoden

De alternatieve methoden zijn onderverdeeld in kwantitatieve of telmethoden (hoofdstuk 2), kwalitatieve of detectiemethoden (hoofdstuk 3) en methoden voor de bevestiging en/of identificatie van geïsoleerde stammen (hoofdstuk 4).

De alternatieve methoden zijn onderverdeeld op basis van hun werkingsmechanismen. Naast de beschrijving van de werking ervan wordt ook een overzicht gegeven van de producten die

momenteel op de markt zijn. Dit overzicht blijft echter een onvolledige momentopname: ten eerste omdat er voortdurend nieuwe producten worden ontwikkeld, ten tweede omdat de redactie niet pretendeert alle producten te kennen.

Er zijn aparte hoofdstukken voor het aantonen van virussen in voedingsmiddelen (hoofdstuk 5), de detectie van bacteriële toxinen (hoofdstuk 6) en voor nieuwe ontwikkelingen (hoofdstuk 7). Met betrekking tot de nieuwe ontwikkelingen is er aandacht voor moleculaire technieken (zoals multiplex PCR), isotherme amplificatie (zoals NASBA) en microarrays. Ook biosensoren komen aan bod.

Procesautomatisering

In hoofdstuk 8 worden bekende en recente ontwikkelingen op het gebied van procesautomatisering besproken. Naast de analysesnelheid zijn in een modern laboratorium voor levensmiddelenmicrobiologie ook de kostprijs en de kwaliteit van het analyseproces belangrijk. Automatisering van zowel klassieke processen als van alternatieve methoden kan daarbij een grote rol spelen. Verder wordt ingegaan op mediumbereiding en dataverwerking. Dataverwerking vindt vooral plaats in Laboratorium Informatie Management Systemen (LIMS). Niet alle aspecten van LIMS komen aan de orde, alleen enkele onderwerpen die specifiek gaan over de verwerking van microbiologische analyseresultaten worden behandeld.

Randvoorwaarden

Hoofdstuk 9 is gewijd aan de randvoorwaarden voor het gebruik van alternatieve methoden. Immers: niet elke methode is voor elk gebruik geschikt. Er zijn vele factoren waarmee rekening kan of moet worden gehouden. Deze worden beschreven bij de selectietools (paragraaf 9.1). Ook wordt er in dit deel ingegaan op de validatie, de verificatie en het vaststellen van de prestatiekenmerken van de alternatieve methoden (paragraaf 9.2).

Voor de alternatieve methoden geldt - evenals voor de klassieke methoden - dat ze niet altijd de beste oplossing vormen. Daarom wordt ook gewezen op de beperkingen van alternatieve methoden.

Uw mening

De redactie realiseert zich dat dit boek niet volledig is. Daarom stellen we het op prijs wanneer lezers en gebruikers ons laten weten of bepaalde methoden, technieken of producten in dit boek zouden kunnen of moeten worden opgenomen. Hetzelfde geldt voor het leveren van commentaar op de inhoud van dit boek en het melden van onjuistheden en wensen. De redactie zal bij een volgende druk dankbaar van deze reacties gebruikmaken. U kunt uw reacties mailen naar redactie.amm@mybusinessmedia.nl.

BEGRIPPENLIJST

In een boek over methoden is het zinvol een aantal veelgebruikte begrippen in relatie tot de genoemde methoden te definiëren. De redactie is daarbij uitgegaan van de definities zoals die zijn geformuleerd in de ontwerptekst 'Terminology of Method Validation' (van 29 maart 2009) voor de revisie van NEN-EN-ISO 16140, Methode Validatie, deel 1.

Voor de leesbaarheid wordt in deze lijst de term 'organisme' gebruikt om het onderwerp van een analyse ('analyt' in de eerder genoemde ontwerptekst) aan te duiden. In plaats van organisme kan soms ook 'metabool' worden gelezen. Metabool is een algemene term voor een door een (micro-)organisme geproduceerde stof, bijvoorbeeld melkzuur of een enterotoxine.

Alternatieve methode

Methode waarmee hetzelfde organisme als bij de corresponderende referentiemethode wordt aangetoond of bepaald. Een alternatieve methode kan commercieel worden geëxploiteerd en eigendomsrechtelijk beschermd (proprietary) of vrij beschikbaar zijn. De methode beschrijft een volledige analyseprocedure: van monstervoorbewerking tot testresultaat. Uiteraard kan daarbij voor onderdelen van de methode (bijvoorbeeld voor ophoping of isolatie) worden verwezen naar andere procedures of onderdelen van de referentiemethoden.

In het algemeen biedt het gebruik van een alternatieve methode voordelen ten opzichte van de referentiemethode. Zo heeft een alternatieve methode vaak betere eigenschappen. Bijvoorbeeld: snelheid van de analyse, gemak in uitvoering, de mogelijkheid tot automatisering, kostenbesparing en miniaturisatie, maar ook: een lagere detectiegrens en een grotere nauwkeurigheid of precisie.

Analyt

Datgene wat wordt gemeten of bepaald. In dit boek wordt de term zoveel mogelijk vervangen door de term 'organisme'.

Bevestigen (bevestiging)

Vaststellen of een geïsoleerde cultuur (kolonie) het in de methode gezochte organisme is.

Detecteren (detectie)

Het aantonen van de aanwezigheid van een organisme in (een bepaalde hoeveelheid van) een monster.

Formaat (format van een methode)

Deze term verwijst naar de indeling of inrichting van een test(kit) (vergelijkbaar met de Engelse term 'format').

Identificeren (identificatie)

Het vaststellen van de identiteit, oftewel de juiste taxonomisch naam (= genus en soort) van een geïsoleerd organisme.