

Die hohe Zahl der durch Lebensmittel verursachten menschlichen Salmonella-Erkrankungen und die in manchen Fällen sehr geringe minimale Infektionsdosis zwingen dazu, das Vorhandensein von Salmonellen in Lebensmitteln, auch bei Vorliegen hoher Gehalte an Begleitflora, möglichst immer nachweisen zu können. Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur quantitativen Bewertung der Effektivität eines flüssigen Selektivmediums (RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) - Medium) aufzuzeigen und gleichzeitig die Effizienz des RV-Mediums hinsichtlich geringer Salmonellen- und hoher Begleitkeimzahlen zu prüfen.

Zu diesem Zweck wurden experimentelle Untersuchungen mithilfe von Mischkulturen in bekannten Keimkonzentrationen durchgeführt. Als Testkeime für das RV-Medium wurden *Salmonella enteritidis* als Zielkeim sowie *Klebsiella pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* als Begleitkeime gewählt.

1. Versuchsteil:

Insgesamt 21 Kombinationen unterschiedlicher Keimkonzentrationen wurden in jeweils 100 ml RV-Medium inokuliert; dabei wurde *S. enteritidis* von 10^1 bis 10^3 KbE, die Zahl der Begleitkeime jeweils von 10^1 bis 10^8 KbE variiert. Die Keimmischungen dienen dabei der Simulation von Keimkonzentrationen, wie sie nach Ablauf einer nicht-selektiven Voranreicherung möglich sein können.

Die Mischungen wurden im RV-Medium in Anlehnung an die Bedingungen der Methode nach § 35 LMBG (Amtliche Sammlung, Methode L 00.00 20, Juni 1990) für 48 h bei 42°C bebrütet. Nach 8 h, 16 h, 24 h sowie 48 h wurden jeweils Ösen-Ausstriche auf festen Selektivmedien durchgeführt; jeder Ansatz wurde 10-fach wiederholt. Zu den Ausstrichzeitpunkten wurden die Salmonella-Nachweisraten sowie die mittleren Zahlen Salmonella-positiver Selektivplatten ermittelt.

Ergebnisse: Prinzipiell konnte *S. enteritidis* aus allen Keimmischungen bereits nach 24-stündiger Anreicherung nachgewiesen werden; alle Nachweise ließen sich auch nach auf 48 h verlängerter Anreicherungsdauer wiederholen. Aus einigen der Keimmischungen war *S. enteritidis* außerdem schon nach 8 h bzw. 16 h Anreicherung nachzuweisen; zu diesen Zeitpunkten war eine deutliche Abhängigkeit der Nachweisbarkeit von der Zahl der inokulierten Salmonellen und der Höhe des Begleitkeimgehaltes feststellbar.

2. Versuchsteil:

Acht ausgewählte Keimmischungen wurden im RV-Medium auch quantitativ hinsichtlich ihrer Keimzahlentwicklung untersucht. Hier wurde die Dauer der Anreicherung auf 24 h begrenzt und die Testkeime quantitativ im Verlauf der Anreicherung in 4-stündigen Intervallen mit dem Oberflächenspatelverfahren auf Blutagar bestimmt. Durch parallel durchgeführte Ösen-Ausstriche auf Selektivplatten wurde gleichzeitig der jeweilige Keimgehalt zum Zeitpunkt des frühesten qualitativen Salmonella-Nachweises bestimmt, außerdem wurde aufgrund der vorliegenden Keimzahlverhältnisse zwischen Ziel- und Konkurrenzkeimen zu Beginn sowie am Ende der Anreicherung jeweils der Enrichment Index (nach RHODES et al. 1985) ermittelt.

Durch Vergleich entsprechender Keimmischungen wurde mittels Varianzanalyse der Einfluß unterschiedlicher Begleitkeimgehalte sowie unterschiedlicher Salmonellenzahlen bei Beginn der Anreicherung auf die Entwicklung von *S. enteritidis* untersucht.

Ergebnisse: Bei allen Keimmischungen war ein Anstieg von *S. enteritidis* im 24-stündigen Anreicherungsverlauf festzustellen, der bei Mischungen mit niedrigen Begleitkeimgehalten wesentlich steiler verlief als bei solchen mit hohen Begleitkeimgehalten. Mit Ausnahme der Mischung mit niedrigster Salmonellenzahl (10^1) und höchstem Begleitkeimgehalt (10^8), die nach 24-stündiger Anreicherung erst einen Anstieg der Salmonellenzahl auf etwa 10^5 KbE/ml aufwies, waren die Salmonellenzahlen aller anderen Mischungen nach 24 h bis ca. 10^7 KbE/ml angestiegen.

Die Keimzahl von *K. pneumoniae* hingegen erwies sich als abhängig von der Inokulationsmenge: geringe Mengen Klebsiellen (10^1 , 10^2) wurden im Verlauf der Anreicherung vollständig eliminiert, während mittlere Mengen (10^5) in der Zahl nur geringfügig (bis etwa 10^2 KbE/ml) reduziert wurden. Bei hohen Inokulationsmengen von *K. pneumoniae* (10^6 - 10^8) stellte sich der Keimgehalt auf etwa 10^6 KbE/ml ein.

Die Keimzahl von *S. aureus* wurde bereits in der ersten Hälfte der Anreicherung, unabhängig ihrer inokulierten Menge, drastisch reduziert, so daß *S. aureus* spätestens nach 12 h nicht mehr nachweisbar war.

Die Zahl von *S. enteritidis* betrug zum Zeitpunkt des frühesten Nachweises auf den Selektivplatten 10^2 KbE/ml, sofern zum Zeitpunkt des Ausstrichs kein Begleitkeimgehalt vorhanden war; wurden jedoch gleichzeitig Begleitkeime in der Anreicherung festgestellt, stieg die für einen Nachweis erforderliche Zahl von *S. enteritidis* entsprechend der Höhe des Begleitkeimgehaltes an.

Die mit den verschiedenen Keimmischungen ermittelten Enrichment Indices für das RV-Medium lagen zwischen 5,42 und 9,39. Diese Werte weisen auf eine mittlere bis hohe Produktivität und Selektivität des RV-Mediums hin.

Mittels varianzanalytischem Vergleich wurde festgestellt, daß sehr niedrige inokulierte Begleitkeimgehalte einen relativ günstigen, sehr hohe Begleitkeimgehalte einen negativen Einfluß auf die Schnelligkeit des Salmonellenwachstums in der RV-Anreicherung ausübten. Den günstigsten Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Salmonellen wiesen mittlere Begleitkeimgehalte in den Keimmischungen auf.

Schlußfolgerungen:

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte eine Nachweisgrenze hinsichtlich zu geringer Salmonellenzahlen oder zu hoher Begleitkeimkonzentrationen für das RV-Medium nicht ermittelt werden. Aufgrund der Ergebnisse erscheint ein sicherer Salmonella-Nachweis bei Verwendung des RV-Mediums gewährleistet, wenn in der Voranreicherungskultur am Ende der Voranreicherung mindestens 10^1 Salmonellen und gleichzeitig 10^8 Begleitkeime vorliegen. Eine lange Anreicherungsdauer (48 h) bzw. das Auslassen früherer Ausstrichzeitpunkte bewirkt keinen negativen Einfluß auf den Salmonella-Nachweis. Zu kurze Anreicherungszeiten können Ursache für falsch-negative Untersuchungsergebnisse sein.

Zusammenfassend läßt sich die Effektivität des RV-Mediums hinsichtlich Produktivität und Selektivität als gut und effektiv für die Praxis einschätzen.

STEINHOF, UTE

Growth kinetics of mixed cultures to evaluate RAPPAPORT-VASSILIADIS medium

Because of foodborne human salmonellosis and low minimal infectious dose in some cases there is a need for detecting as every presence of salmonellae in foods as possible, despite of presence of high numbers of competing flora. The intention of this study was to assess the sensitivity of a liquid selective (RAPPAPORT-VASSILIADIS) medium for low numbers of salmonellae and high numbers of competing flora.

The experiments have been conducted by means of mixed cultures of known numbers of salmonellae and competing organisms. Test strains were *Salmonella enteritidis* as well as *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*.

First part of the study:

A total of 21 combinations of the 3 test strains in various concentrations were inoculated in 100 ml RV medium, respectively; the number of *S. enteritidis* ranged from 10^1 to 10^3 cfu, the number of each of the competing organisms from 10^1 to 10^8 cfu. The concentrations of the mixed cultures represented situations, as they may occur at the end of pre-enrichment.

Conditions of incubation of mixed cultures in RV medium (incubation at 42°C for 48h) followed the official instructions of German § 35 LMBG (Method No. L 00.00 20, June 1990); during incubation (after 8 h, 16 h, 24 h and 48 h) each of the enrichment broths was subcultured by streaking a loopful on selective plating media. The test was repeated tenfold with each of the mixed culture combinations.

The incubated plating media were scrutinized for typical *Salmonella* colonies, the results were qualitatively determined as *Salmonella* detection rates and as mean numbers of *Salmonella*-positive plates.

Results: *S. enteritidis* was detectable in all cases of mixtures after 24 hours of incubation in RV medium; each salmonella positive result was also repeatable after continued enrichment for 48 h. Moreover, *S. enteritidis* was detectable in some cases of mixtures after 8 h or 16 h respectively; the findings were dependent on the count of inoculated salmonellae and the count of inoculated competing flora.

Second part of the study:

Eight culture mixtures were examined quantitatively for growth patterns during enrichment in RV medium. The incubation was limited to 24 hours, during this time each test strain was counted in 4h-intervals by surface agar plating on blood agar. By simultaneously streaking a loopful of RV medium on selective plating media, it was possible to determine counts of the strains at the time of earliest qualitative *Salmonella* detection.

By determining the ratio between *S. enteritidis* and the competitors at the beginning and the end of enrichment period, the Enrichment Index (RHODES et al. 1985) was calculated. The influence of various numbers of inoculated competing flora as well as the influence of various numbers of inoculated salmonellae on growth development of *S. enteritidis* has been statistically analysed.

Results: An increase of *S. enteritidis* has been found in all cultures during the 24h-period. The increase was more steeply in cultures with low numbers than in cultures with high numbers of competitors. In the culture with lowest number of salmonellae (10^1) and highest number of competitors (10^8), the number of salmonellae increased after 24 h enrichment only to about 10^5 cfu/ml. In all the other cultures the number of salmonellae increased to about 10^7 cfu/ml.

Growth of *K. pneumoniae* depended on the number of inoculation: low numbers (10^1 , 10^2) were completely eliminated during enrichment period, whereas higher numbers (10^5) decreased to about 10^2 cfu/ml. High numbers of inoculated *K. pneumoniae* (10^6 - 10^8) adjusted themselves to about 10^6 cfu/ml during enrichment period.

The number of *S. aureus* was, independent of its inoculated number, reduced drastically in the first half of enrichment period. Thus *S. aureus* was detected no longer than after 12 h of enrichment.

S. enteritidis at time of earliest qualitative Salmonella detection counted at least 10^2 cfu/ml, in case of absence of any competitors at time of subculturing; but if there were competitors in the enrichment medium, the number of *S. enteritidis* necessary for detection increased corresponding to number of competitors.

The Enrichment Indices varied from 5,42 to 9,39 in RV medium, indicating mean to high degrees of productivity and selectivity for the RV medium.

Statistical comparison showed advantageous influences of very low numbers of competitors, whereas very high numbers of competitors had negative influences on rapidity of growth of salmonellae in RV medium. Though, in mixtures with mean numbers of inoculated competitors the highest rapidity of growth of salmonellae has been shown.

Conclusions:

In the studies carried out no limit in sensitivity of RV medium because of too low numbers of salmonellae or too high numbers of competing flora has been found.

A reliable detection of salmonellae with the use of RV medium appears to be ensured, if there are at least 10^1 salmonellae and at the same time 10^8 competitors in the pre-enrichment culture at the end of pre-enrichment period.

Long enrichment period (48 h) resp. neglecting earlier times of subculturing has no negative influence on detection of Salmonella. Too short periods of enrichment, however, can cause false-negative results.

Summing up, the efficiency of RV medium with regard to productivity and selectivity can be assessed as positive and effective for practise.