

Verwerkte mest - Detectie van Clostridium perfringens

INHOUD

1	Werkwijze	3
2	Media en materiaal	3
3	Procedure	3
3.1	<i>Initieel suspenderen van een monster in gebufferd peptoon water</i>	3
3.2	<i>Telling en selectie van kolonies voor bevestiging</i>	4
3.3	<i>Biochemische bevestigingstest</i>	4
3.4	<i>Zuur fosfatase test</i>	4
3.5	<i>Sulfiet Indol Motility (SIM) agar test</i>	4
3.6	<i>Interpretatie</i>	4
3.7	<i>Microbiologische identificatie van Clostridium perfringens door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	5
3.8	<i>Berekening van het resultaat (zie ISO 7218: Amd. 1)</i>	5
4	Weergave van de resultaten	5
5	Kwaliteitscontrole	5
6	Referenties	5

1 WERKWIJZE

De detectie van *Clostridium perfringens* gebeurt door:

- isolatie en telling van karakteristieke kolonies door analyse van de initiële suspensie met het selectief medium SC agar via de gietplaatmethode;
- bevestigen van karakteristieke kolonies;
- berekenen van het aantal *Clostridium perfringens* per gram monster aan de hand van het aantal bevestigde kolonies.

2 MEDIA EN MATERIAAL

- gebufferd pepton water BPW;
- (T)SC agar;
- voor de bevestigingstest: **Zuurfosfatase test, Sulfiet Indol Motility (SIM) agar test** of een commerciële biochemische kit;
- autoclaaf 121±3°C; incubator **37±1°C**, waterbad op 45±1°C, waterbad op 46±0,5°C geschikt glaswerk, pipetten, pH-meter, petrischalen, entnaald, anaërobe jar en reagentia;
- Stomachertoestel of gelijkwaardige homogenisator.

3 PROCEDURE

3.1 INITIEEL SUSPENDEREN VAN EEN MONSTER IN GEBUFFERD PEPTOON WATER

- Aan 10 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak 90 ml gebufferd pepton water aseptisch toevoegen (1/10 massa/volume verhouding).
- Als het monster fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-)zak, vóór het homogenisatieproces.
- Homogenisatie in de homogenisator gedurende 2 minuten.
- Uit de stomacherzak wordt van de gebufferd pepton suspensie 1 ml¹ van het te analyseren monsterextract overgebracht in een lege en steriele petrischaal (1 ml suspensie is representatief voor 0,1 gram monster). **De suspensie wordt 1/10, 1/100, en indien nodig 1/1000 verdund². Van elke verdunning wordt telkens 1 ml overgebracht in lege en steriele petrischalen. Het gebruik van duplo platen heeft de voorkeur.** De tijd tussen het aanbrengen van de suspensie in de petrischaal en het gieten van SC moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 15 min niet overschrijden.
- Petrischalen vullen met ± 15 ml vloeibaar SC agar medium bewaard bij 44-47°C in een waterbad.
- Entmateriaal en medium mengen door draaiende bewegingen met de schaal.
- Agar laten stollen en daarna overgieten met een tweede laag vloeibaar medium (± 10 ml).
- Agar laten stollen en drogen in laminaire flow en geïnverteerd anaëroob incuberen bij **37°C** gedurende 20 ± 2 u.

¹ Het criterium is max. 1000 kve *Clostridium perfringens* in 1 g verwerkte mest, dit betekent maximum 100 kve/plaat.

² Indien mogelijk, selecteer alleen de kritische verdunningsstappen (minstens twee opeenvolgende decimale verdunningen) voor het enten van de schalen die kolonietellingen van tussen 10 en 150 kolonies per plaat zullen opleveren.

3.2 TELLING EN SELECTIE VAN KOLONIES VOOR BEVESTIGING

- Tel de zwarte presumptieve *Clostridium perfringens*.
- Selecteer vijf karakteristieke kolonies uit de schaal voor biochemische bevestiging.
- Strijk elk van de geselecteerde kolonies met een steriele entnaald uit op één niet-selectieve bloedagarplaat (bv Columbia-bloedagar of Columbia-agarbasis) of een ander rijk medium (zoals tryptone soya agar of brain heart infusion agar). Platen anaëroob incuberen bij 37°C gedurende 20 ± 2 u.

3.3 BIOCHEMISCHE BEVESTIGINGSTEST

Voor de identificatie kan een commerciële biochemische kit worden gebruikt. De interpretatie van de resultaten van een identificatiekit gebeurt volgens de daarbij horende handleiding. Zoniet wordt de volgende methode gebruikt.

3.4 ZUURFOSFATASE TEST

- Kolonies die anaëroob gegroeid zijn op bloed- of nutriëntagarplaten worden op een filterpapier uitgesmeerd en er worden 2 tot 3 druppels van het zuurfosfatasereagens op de kolonies aangebracht. Als een commercieel verkrijgbaar testpakket wordt gebruikt, volg dan de instructies van de fabrikant.
NOOT: Het is mogelijk om zuurfosfatasereagens op de kolonies te druppelen als geen verdere analyse van de kolonies nodig is.
- Een paarsachtige kleur die zich binnen 3 tot 4 minuten ontwikkelt, wordt beschouwd als een positieve reactie.
NOOT: Het is bekend dat, naast *C. perfringens*, sommige andere *Clostridium*-stammen (bijv. sommige stammen van *C. baratii*) zuurfosfatase kunnen produceren, maar dit vermogen is zeer beperkt. Daarom wordt slechts een zeer laag percentage vals-positieve resultaten verwacht.

3.5 SULFIET INDOL MOTILITY (SIM) AGAR TEST

- Kolonies die anaëroob gegroeid zijn op bloedagar- of nutriëntagarplaten worden in SIM-tubes geënt. De tubes worden gedurende 22 ± 2 u geïncubeerd bij 37 °C.
- Na incubatie worden de ze beoordeeld op:
 - ✓ sulfietproductie positief: tubes die zwartverkleuring (ijzersulfide) vertonen;
 - ✓ motiliteit negatief: tubes die enkel groei langs de inoculatielijn vertonen, geen vertroebeling van het medium;
 - ✓ indolproductie negatief: tubes die direct na toevoeging van Kovacs-reagens geen roodgekleurde ring geven.

C. perfringens is positief voor sulfietproductie en negatief voor indolproductie en voor motiliteit.

3.6 INTERPRETATIE

Clostridium perfringens vormt zwarte of grijze tot geelbruine kolonies op TSC-agar (zelfs als de kleur zwak is) en bezit zurefosfatase, of is positief voor sulfietproductie, negatief voor indolproductie en voor motiliteit in SIM-agar.

3.7 MICROBIOLOGISCHE IDENTIFICATIE VAN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *Clostridium perfringens* kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Daarvoor moet wel een validatie uitgewerkt worden conform ISO 16140.

3.8 BEREKENING VAN HET RESULTAAT (ZIE ISO 7218: AMD. 1)

Bereken het aantal *Clostridium perfringens* **a** in 1 gram monster met de volgende formule:

$$a = b/A \times C$$

waarbij:

C: het aantal presumptieve *Clostridium perfringens* kolonies;

A: het aantal geïnoculeerde kolonies ter bevestiging (=5);

b: het aantal geconfirmeerde kolonies.

4 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Het aantal *Clostridium perfringens* wordt uitgedrukt als aantal kve in 1 g monster. Indien afwezig wordt <10 (of 5 bij duplo uitplatingen) kve/g monster gerapporteerd. In het rapport wordt eveneens de gebruikte BAM- methode vermeld.

5 KWALITEITSCONTROLE

Inzetten van een blanco controle bij de selectieve media bij elke meetreeks.

Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia.

Validatie van de analysemethode op verschillende matrices (natte en ingedroogde mest): herhaalbaarheid testen. Daarvoor wordt een controlemonster beënt met een referentie-*Clostridium perfringens*-stam en behandeld als elk ander onbekend monster.

De juistheid afleiden uit de tweedelijscontrole.

6 REFERENTIES

- a. ISO 15213-2 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. -- Part 2: Enumeration of *Clostridium perfringens* by colony-count technique
- b. ISO 7218:2024 Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations.