



Bepaling van Clostridium perfringens



INHOUD

1	DOEL EN TOEPASSINGSGBIED	3
2	TERMINOLOGIE EN PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	4
4	WERKWIJZE.....	5
4.1	REAGENTIA EN OPLOSMIDDELEN	5
4.2	APPARATUUR EN MATERIAAL	5
4.3	WERKWIJZE	6
4.3.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	<i>6</i>
4.3.2	<i>Analyse via de membraanfiltratie</i>	<i>6</i>
4.3.3	<i>Gietplaat en incubatie</i>	<i>6</i>
4.3.4	<i>Telling en selectie van kolonies</i>	<i>7</i>
4.3.5	<i>Biochemische bevestiging.....</i>	<i>7</i>
4.3.6	<i>Bijkomende biochemische bevestiging met kit.....</i>	<i>8</i>
4.4	WEERGAVE VAN DE RESULTATEN	8
4.5	RAPPORT.....	8
4.6	KWALITEITSBORGING	8
5	REFERENTIES	9

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft een methode voor het kwantificeren van de parameter *Clostridium perfringens* in water via membraanfiltratie op selectieve media.

De procedure is van toepassing bij het onderzoek van water bestemd voor menselijke consumptie enerzijds en oa. oppervlaktewater, recreatiewater anderzijds.

De methode is conform de werkwijze beschreven in de ingetrokken norm ISO/CD 6461-2 Water quality - Detection and enumeration of *Clostridium perfringens* - part 2: Method by membrane filtration.

Daarom wordt verwezen naar de ISO norm 7937 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*-Colony-count technique. Deze methode beschrijft de analysemethode voor de matrices menselijke of dierlijke voedingsstoffen.

Aangezien er dus momenteel geen ISO norm beschikbaar is voor de matrix water is de referentiemethode voor de matrix voedingsstoffen hier vertaald naar een werkwijze voor water.

Afwijkingen van de referentiemethode:

Indien twijfels bestaan bij de interpretatie van de bevestigingstesten wordt een identificatie aan de hand van een biochemische kit uitgevoerd.

2 TERMINOLOGIE EN PRINCIPE

C. perfringens speelt een secundaire rol in wateranalyses. Dit organisme vormt sporen, is warmte bestendig in vergelijking met vegetatieve cellen, wat een voordeel biedt bij de detectie van clostridia in water. *C. perfringens* is de meest belangrijkste van de sulfiet reducerende clostridia en is doorgaans aanwezig in humane en dierlijke faeces.

Clostridiasporen overleven langer dan coliformen, *Escherichia coli* of enterococcon en worden hierdoor als een indicator van postfecale besmetting beschouwd. De sporen worden niet altijd gedesactiveerd door het chloreren van water, maar vormen geen gezondheidsrisico in drinkwater. Alhoewel de resistentie van sporen *C. perfringens* vergelijkbaar is met deze van *Cryptosporidium* en *Giardia*, zijn ze geen betrouwbaar indicator voor de aanwezigheid van deze parasieten in drink- of recreatiewaters. Sporen *C. perfringens* werden gebruikt bij het uittesten van de efficiëntie van filtratieprocessen, maar gezien ze in aantal minder voorkomen dan aërobe sporendragers, zijn ze hierdoor minder relevant.

In monsters zoals oppervlaktewater kan er een brede range *Clostridium species* aanwezig zijn. De meeste stammen *C. perfringens* groeien bij 44°C, sommige andere species niet. Incubatie bij 44°C bevordert hierdoor de selectiviteit en recovery van *C. perfringens* in zulke monsters.

De methode beschreven in de Drinkwaterdirectieven 98/83/EC gebaseerd op m-CP agar geeft een heel lage recovery van *C. perfringens* en werd weerlegd door ISO ten gunste van de TSC agarmethode zoals hier beschreven.

De bepaling van *Clostridium perfringens* in drinkwater omvat zowel de vegetatieve cellen als de sporen. Bij drinkwateranalyses dient er dus geen voorafgaande warmtebehandeling aan het watermonster te worden gegeven¹.

¹ Indien niet drinkbaar water met hoge achtergrondflora dient geanalyseerd te worden dan wordt een watermonster eerst 15 ± 1 min verwarmd tot 60 ± 2°C, waardoor enkel het aantal sporen wordt bepaald. De tijd

Een vast volume of een verdunning van het monster wordt gefilterd door een membraan van 0,45µm, voldoende om cellen en sporen tegen te houden. Het membraan wordt anaëroob geïncubeerd bij 44±1°C op tryptose-sulfiet-cycloserine agar gedurende 21±3 uur. Incubatie bij 44±1°C verhoogt dus de selectiviteit voor *Clostridium perfringens*, en de cycloserine inhibeert *Bacillus* species.

Clostridium perfringens vormt over het algemeen zwart tot geel-bruine kolonies door de reductie van sulfiet tot sulfide welke een reactie geeft met ijzerzouten in het medium. Soms komt de zwartverkleuring niet volledig tot uiting en dienen de beige kolonies als presumptieve *Clostridia* beschouwd te worden.

Karakteristieke kolonies worden geteld en bevestigingstesten worden uitgevoerd.

Het aantal kve *Clostridium perfringens* wordt per 100 ml bepaald.

Theoretisch kan de aanwezigheid van 1 kolonievormende eenheid per 100 ml bepaald worden. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

De volgende definities zijn van toepassing:

Presumptieve *Clostridium perfringens*

Gram positieve, anaërobe sporevormende staafjes die zwarte of grijze tot geelbruine kolonies geven op tryptose-sulfiet-cycloserine agar na anaërobe incubatie bij 44±1°C gedurende 24 uur.

Bevestiging naar *Clostridium perfringens*

Gram positieve, anaërobie sporevormende staafjes die karakteristieke kolonies vormen op een groeimedium met sulfiet bij 44°C, niet-beweeglijk zijn, nitraat reduceren, lactose vergisten en gelatine vervloeien.

3 OPMERKINGEN

Alle manipulaties -behalve het filteren zelf - worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet (4.2.12).

De besmette vaste afval (petriplaten, doekjes, pipettips...) worden in een speciale daartoe bestemde container verwijderd. Na het waarnemen van de resultaten worden de resterende monsters en suspensies verwijderd als vloeibare bacterie-afval.

Glaswerk dat gecontamineerd is met klasse twee bacteriën wordt vóór de afwas eerst geautoclaveerd (4.2.13).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium³⁸ (4.1.12) en nadien met 70% ethanol (4.1.13).

Vóór het enten van agarmedia in petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een veiligheidskabinet (4.2.12) of in een droogstoof. Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

nodig om deze temperatuur te bereiken kan worden bepaald met een recipiënt gevuld met eenzelfde volume water en een thermometer.

4 WERKWIJZE

4.1 Reagentia en oplosmiddelen

- 4.1.1 Tryptose-sulfiet-cycloserine TSC agar gietklaar met selectief supplement (D-cycloserine)
- 4.1.2 Gebufferd nitraat-motiliteit medium NMM
- 4.1.3 Nitraat reagens A
- 4.1.4 Nitraat reagens B
- 4.1.5 Zink-poeder
- 4.1.6 Lactose-gelatine medium LGM
- 4.1.7 Nutrient agar platen
- 4.1.8 TGM-USP medium
- 4.1.9 Reagentia voor anaërobe incubatie
- 4.1.10 Ringer 1/40 oplossing²
- 4.1.11 RapidTM ANA II System of gelijkwaardige kit
- 4.1.12 Umonium³⁸ 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 4.1.13 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 4.1.14 Referentiestam *Clostridium perfringens*
- 4.1.15 Ultrapuur water

4.2 Apparatuur en materiaal

- 4.2.1 Koelkast $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 4.2.2 Schudtoestel
- 4.2.3 Vortex
- 4.2.4 Pipetus akku
- 4.2.5 Filtratietoestel met pomp
- 4.2.6 Membrandispenser met steriele cellulose ester $0,45 \mu\text{m}$ filters
- 4.2.7 Incubator $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.2.8 Incubator $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4.2.9 Warmwaterbad op $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4.2.10 Warmwaterbad op $99^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4.2.11 Kolonietelapparaat
- 4.2.12 Veiligheidskabinet
- 4.2.13 Autoclaaf $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 4.2.14 Wegwerppipetten
- 4.2.15 Steriele flessen
- 4.2.16 Automatische pipetten en wegwerptips
- 4.2.17 Pincet
- 4.2.18 Petriplaten van 90mm of 50 mm
- 4.2.19 Entnaald met Pt-öse
- 4.2.20 Pt-steekentnaald
- 4.2.21 Anaërobe jar

² Voor een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/40 andere diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture) alsook steriel leidingswater of steriel demiwater

4.3 Werkwijze

4.3.1 Monstervoorbereiding

Een monster wordt zo snel mogelijk bij aankomst in het laboratorium geanalyseerd, en maximum gedurende 24 uur bewaard bij $5 \pm 3^\circ\text{C}$ in een koelkast (4.2.7).

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (4.2.2) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Uit voorkennis van een monster wordt indien nodig een verdunning gemaakt. Van een te verdunnen watermonster wordt aan de hand van wegwerppipetten (4.2.14) bediend door de pipetus (4.2.4) een verdunning uitgevoerd van een factor 10:

- In een fles (4.2.15) gevuld met 225 ml steriele Ringer 1/40 (4.1.10) wordt 25 ml van de suspensie van de hoogste verdunning toegevoegd; vermenging met de hand of op een schudtoestel (4.2.2).
- De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.
- De verdunningen van een monster dient dusdanig gekozen te worden dat het aantal te tellen kolonies op een membraan standaard tussen 10 en 100 ligt. De voorkeur wordt gegeven aan de verdunning met een resultaat in deze range. Aangezien *Clostridium perfringens* doorgaans grote zwarte kolonies vormen, zal in de praktijk de hoogste telbare waarde op een filter lager liggen.

4.3.2 Analyse via de membraanfiltratie

De membraanfiltratie uitvoeren met een filtratietoestel met pomp (4.2.5). De steriele filtratiekokers worden of zijn voorzien van steriele $0,45\mu\text{m}$ membraanfilters (4.2.6). Filtratie van 100 ml monster.

4.3.3 Gietplaat waarbij de filter wordt overgoten met TSC

- Maak de TSC gebruiksklaar: kant en klare gestolde agarflesjes opkoken in een kokend warmwaterbad van $99^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (4.2.10) en minstens 45 min afkoelen in een warmwaterbad op $45 \pm 1^\circ\text{C}$ (4.2.9)
- De filter aan de hand van een steriele pincet (4.2.17) telkens in een benoemde lege petrisplaat (4.2.18) aanbrengen
- 15-20 of 10 ml vloeibare (4.1.1) TSC agar heel voorzichtig in de plaat met filter gieten (naargelang petriplaten (4.2.18) van 90mm of 50mm worden gebruikt)

4.3.4 Gietplaat waarbij de filter wordt aangebracht op een TSC plaat

- Maak de TSC gebruiksklaar: kant en klare gestolde agarflesjes opkoken in een kokend warmwaterbad van $99^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (4.2.10) en minstens 45 min afkoelen in een warmwaterbad op $45 \pm 1^\circ\text{C}$ (4.2.9)
- 15-20 of 10 ml vloeibare (4.1.1) TSC agar gieten (naargelang petriplaten (4.2.18) van 90mm of 50mm worden gebruikt)
- De filters worden aan de hand van een steriele pincet (4.2.17) telkens aangebracht op een TSC agar (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden), en geïncubeerd op $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.2.7).

4.3.5 Incubatie

- De plaat gedurende 20 min met open deksel drogen in een veiligheidskabinet (4.2.12).
- Na het stollen de platen in een anaërobe container (4.1.9 en 4.2.21) incuberen bij $44\pm 1^\circ\text{C}$ (4.2.8) gedurende 21 ± 3 uur. De tijd tussen het gieten van TSC en de anaërobe incubatie in een jar moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 2 uren niet overschrijden.

4.3.6 Telling en selectie van kolonies

- Tel na de incubatie het aantal zwarte of grijze/beige-geelachtige/bruine presumptieve *Clostridium perfringens* kolonies ($>2\text{mm}$) met behulp van een kolonietelapparaat (4.2.11).
- Tel de kolonies van de platen en hou de platen met minder dan 100 kolonies en hun respectievelijke verdunningen.
- Selecteer 10 (of indien minder alle) karakteristieke kolonies van elke plaat en voer een bevestiging uit.
- Indien geen typische kolonies aanwezig zijn, zijn er geen *Clostridia* in het monster aanwezig.

Opmerkingen:

- De zwarting ontstaat door de ijzerammoniumcitraat indicator bij de sulfietreductie van natriummetabisulfiet.
- *Serratia marcescens*, *Streptococcus lactis* en *Salmonellae* zijn facultatieve anaëroben die op TSC kunnen groeien. Zij geven kleinere kolonies.

4.3.7 Biochemische bevestiging

- Strijk aan de hand van een Pt-naald (4.2.19) de geselecteerde 10 (of allen indien er minder aanwezig zijn) karakteristieke kolonies op nutriënt agar (4.1.7)
- 21 ± 3 uur anaërobe incubatie (4.1.9 en 4.2.21) bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.2.7). Controleer op zuiverheid.
- Juist vóór het gebruik van NMM (4.1.2) en LGM (4.1.6) de tubes in een kokend bad (4.2.10) brengen gedurende 15 min en snel afkoelen.
- Ent 10 tubes NMM (4.1.2) en 10 tubes LGM (4.1.6) met lange Pt- steekentnaald (4.2.20).
- 21 ± 3 uur anaërobe incubatie (4.2.21 en 4.1.9) bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.2.7).

NMM tubes:

- Voor de motiliteit diffuse of geen diffuse groei langs de entlijn evalueren (negatief voor *Clostridium perfringens* = niet beweeglijk).
- Meng gelijke volumes nitraat A en B (4.1.3; 4.1.4) juist voor de test ([aantal NMM tubes + 1] x 0,5 ml).
- Voeg 0,5 ml van het mengsel aan elke NMM tube (4.1.2).
- Een rode kleur toont aan dat nitriet gevormd is uit reductie van nitraat (= positief voor *Clostridium perfringens*).
- Indien geen rode verkleuring: voeg een beetje zink poeder (4.1.5) toe en lees af na 10 min.
- Een rode verkleuring betekent dat nitraat niet gerduceerd is en dus is de test negatief.

LGM tubes:

- Lees de kleur van het medium af. Het medium vertoont gele kleur bij vorming van zuur (positief voor *Clostridium perfringens*).
- Koel de tubes af gedurende 1 à 2 uur in een koelkast $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ (4.2.1) en controleer op gelatine vervloeiing (is positief voor *Clostridium perfringens* = vervloeiing van het medium).
- Indien negatief: incubeer overnacht in de koelkast (4.2.1) en controleer opnieuw op gelatine vervloeiing.

Besluit: beige/bruin/zwarte kolonies op TSC medium, niet motiel, met reductie van nitraat tot nitriet, productie van zuur en gas uit lactose en vervloeiing van gelatine binnen 48 uur zijn *Clostridium perfringens*. Culturen die slecht een lichte roze reactie van nitriet geven moeten geëlimineerd worden, daar *Clostridium perfringens* altijd een intense en onmiddellijke reactie geeft.

4.3.8 Bijkomende biochemische bevestiging met kit

Indien twijfel bestaat bij de interpretatie van de bevestigingsmedia, selecteer één of meerdere karakteristieke kolonies en ent in een tube TGM USP (4.1.8), 21 ± 3 uur anaërobe incubatie (4.1.9 en 4.2.21) bij $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Voer de biochemische identificatie uit aan de hand van een kit (4.1.11) voor anaërobe organismen volgens de werkwijze omschreven in de bijsluiter.

4.4 Weergave van de resultaten

- Bepaal het aantal kve *Clostridium perfringens* per 100ml watermonster, rekening houdend met de verhouding uitgevoerde bevestigingstesten.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde *Clostridium perfringens* (waarde tussen 10-100 kolonies) vermenigvuldigd met de overeenstemmende verdunningsfactor.
- Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monster, wordt het resultaat als <1 kve / 100 ml vermeld.
- Indien meer dan 100 kolonies op de geïncubeerde schalen met de grootste verdunning 10^{-x} voorkomen, wordt het resultaat als benaderend vermeld (geschat aantal $>100 \cdot 10^x$ kve/gefilt. volume).

4.5 Rapport

Vermelding in het rapport van:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de gebruikte methode
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

4.6 Kwaliteitsborging

Een blanco controle wordt bij elke analysepakket uitgevoerd. Een volume van 100 steriel water (4.1.15) wordt gefiltreerd en de filter op een TSC plaat aangebracht, en gelijktijdig de analyses geïncubeerd.

Een positieve controle wordt per lot analysemedia ingezet. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een *Clostridium* referentiestam (reincultuur van *Clostridium perfringens* (4.1.14)).

De resultaten van de positieve en negatieve controlemonsters worden genoteerd.

Indien de resultaten van de positieve controlemonsters niet binnen de vooropgestelde waarden vallen, of de blancocontrole een positief resultaat geeft (>1 kve presumptieve *Clostridium* per 100 ml) wordt de proef als niet betrouwbaar beschouwd. De test wordt dan opnieuw uitgevoerd. Dit ook indien onjuiste verdunningen zijn ingezet.

De analyseverantwoordelijke volgt de test op en beslist over de geldigheid van de resultaten. Validatie van de analysemethode op verschillende matrices: herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en meetonzekerheid testen. De juistheid afleiden uit ringtestresultaten.

5 REFERENTIES

- ISO 7937 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*-Colony-count technique.
- ISO 8199 (2005) Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture.
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- ISO 6687-1 (1999) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 1
- ISO/CD 6461-2 Water quality - Detection and enumeration of *Clostridium perfringens* part 2: Method by membrane filtration. Versie 2, december 2002.