

## Bepaling van enterokokken

---

**INHOUD**

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGEBIED</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>OPMERKINGEN</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b>	<b>4</b>
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	5
<b>5</b>	<b>REAGENTIA EN BEREIDINGEN</b>	<b>5</b>
5.1	<i>Reagentia</i>	5
<b>6</b>	<b>PROCEDURE</b>	<b>5</b>
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Analyse via de membraanfiltratie</i>	6
6.3	<i>Bevestigingstesten enkel vanuit de Slanetz platen</i>	6
6.4	<i>Identificatie van enterokokken door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	6
	<b>KWALITEITSCONTROLE</b>	<b>6</b>
<b>7</b>	<b>RAPPORTERING</b>	<b>7</b>
<b>8</b>	<b>REFERENTIES</b>	<b>7</b>

## 1 TOEPASSINGSGBIED

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van drinkwater, mineraal water enerzijds en grondwater, oppervlaktewater, recreatiewater, en afvalwater anderzijds.

De bepaling van de parameter enterokokken in water wordt uitgevoerd volgens ISO 7899-2.

Voor analyse van drinkwater kan voor de detectie van enterokokken, ook de detectie gebaseerd op enzymatische reacties op chromogene media gebruikt worden zowel voor membraanfiltratie als voor de Enterolert-DW MPN methode (die voorzien zijn van een supplement specifiek ter onderdrukking van nevenflora).

Voor analyse van oppervlakte- of afvalwater kan voor de detectie van enterokokken, de ISO 7899-1 (1998) MPN methode gebruikt worden alsook de Enterolert-DW MPN methode (voorzien van een supplement specifiek ter onderdrukking van nevenflora).

In het kader van wateronderzoek kunnen enterokokken beschouwd worden als secundaire indicatoren voor fecale besmetting. Het principe van deze analyse is om de aanwezigheid van coliformen in een watermonster bij afwezigheid van *E.coli* te evalueren. In bepaalde gevallen kan de bepaling van het species streptokokken aanwezig in een watermonster helpen om een menselijke of dierlijke besmetting te kunnen onderscheiden.

Een aangewende analysemethode dient conform de WAC methode te zijn. Het meetprincipe mag niet anders zijn, en het isolatiemedium moet hetzelfde zijn. Afwijkingen mogen niet kritisch zijn en geen invloed hebben op een resultaat. Extra stappen zijn aanvaardbaar, zolang ze het resultaat enkel meer ondersteunen.

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.

## 2 PRINCIPE

Fecale enterococci zijn Gram-positieve kokken die paren of kettingen kunnen vormen en die een Lancefield's Groep D antigen bevatten. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* en *E. hirae* kunnen worden gedetecteerd en geënumereerd met deze methode. Sommige andere *Enterococcus* species en sommige species van het genus *Streptococcus* (nl. *S.bovis* en *S. equinus*) kunnen mogelijks worden gedetecteerd. Deze *Streptococcus* species overleven niet lang in het water en zullen waarschijnlijk niet kwantitatief worden bepaald.

Organismen uit een watermonster worden geïsoleerd op een 0,45 µm membraanfilter en op een Slanetz & Bartley of een gelijkwaardig chromogeen medium agarplaat aangebracht die wordt geïncubeerd gedurende 40-48 uur bij 36°C.

Het Slanetz & Bartley selectief medium bevat natriumazide om de groei van Gram-negatieve bacteriën en andere Gram-positieve bacteriën te onderdrukken. Natriumazide inhibeert de enzymen catalase en cytochroom c oxydase, waardoor het electronen-transport in de cel wordt onderbroken. Streptokokken / enterokokken en lactobacillen zijn de enige facultatief anaërobe bacteriën die geen van beide enzymen bevatten zodat hun ademhaling niet onderbroken wordt door natrium azide.

Het medium bevat eveneens de kleurloze 2,3,5-trifenylnitroimidazolium chloride TTC, dat door de fecale enterococci wordt gereduceerd tot rode formazan. De typische kolonies hebben een roos-rood tot bruin uitzicht van het centrum van de kolonie tot mogelijks de volledige kolonie. Ter bevestiging wordt de membraanfilter met alle kolonies overgebracht op een esculine bile agarplaat die wordt geïncubeerd gedurende 2 uur bij 44°C. De galzouten inhiberen de groei van andere Gram-positieve bacteriën. Het esculine wordt door de enterokokken omgezet tot een gehydrolyseerde verbinding die samen met het aanwezige Fe (III) citraat een zwart complex vormt.

Bij het gebruik van chromogene media zijn er geen bevestigingstesten uit te voeren.

Het aantal kve enterokokken wordt per 100 ml bepaald.

### 3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Het Slanetz medium beschreven in deze methode bevat natrium azide. Aangezien deze substantie hoog toxisch is, dient heel voorzichtig te worden gewerkt wanneer het medium wordt bereid, vooral wanneer het medium onder poedervorm wordt gebruikt. Natrium azide vormt explosieve verbindingen met metalen, specifiek koper en lood.

Alle manipulaties -behalve het filtreren zelf- worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet (4.1.8).

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 (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium<sup>38</sup> (5.1.4) en nadien met 70% gedenatureerde ethanol (5.1.5).

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 (4.1.8) 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).

## 4 APPARATUUR EN MATERIAAL

### 4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf 121 ± 3°C
- 4.1.2 Incubator 36 ± 2°C
- 4.1.3 Incubator 44 ± 0,5°C
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Membraandispenser met steriele 0,45 µm filters of gelijkwaardig systeem
- 4.1.6 Kolonietelapparaat
- 4.1.7 Pipetus akku
- 4.1.8 Veiligheidskabinet
- 4.1.9 Filtratietoestel met pomp

## 4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Glazen flessen
- 4.2.3 Wegwerppipetten

## 5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

### 5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Ringer 1/40 oplossing<sup>1</sup>
- 5.1.2 Slanetz and Bartley agar + TTC supplement of een gelijkwaardig chromogeen medium
- 5.1.3 Bile-esculine-azide agar
- 5.1.4 Umonium<sup>38</sup> 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 5.1.5 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 5.1.6 ultra puur water
- 5.1.7 enterokokken referentie bacterie

## 6 PROCEDURE

### 6.1 MONSTERVOORBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.4) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Uit voorkennis van een monster wordt indien nodig een verdunningsreeks gemaakt. Van een te verdunnen watermonster worden drie opeenvolgende verdunningen geanalyseerd  $10^0$  tot  $10^{-2}$ , of van  $10^{-1}$  tot  $10^{-3}$ .

Aan de hand van wegwerppipetten (4.2.3) bediend door de pipetus (4.1.7) wordt een verdunning uitgevoerd met stappen factor 10:

- in flesjes (4.2.2) gevuld met 90 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) waaraan 10 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.4).
- in flessen (4.2.2) gevuld met 900 ml steriele Ringer 1/40 (voor ringtestmonsters) (5.1.1) waaraan 100 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.4).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.

De verdunningen van de monsters dienen dusdanig gekozen te worden dat het aantal te tellen kolonies op een membraan tussen 20 en 80 ligt. De voorkeur wordt gegeven aan de verdunning met een resultaat in deze range.

---

<sup>1</sup> 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

## 6.2 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). Er worden steriele aangekochte kokers met filter gebruikt, of geflambeerde kokers worden aan door middel van een pincet (4.2.1) voorzien van steriele filters van 0,45 µm (4.1.5).

Van één monster wordt 100 ml (of een kleiner volume 50 ml, 10 ml) volume gefiltreerd. Wanneer een volume van een monster minder is dan 50 ml, brengt men eerst 20 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) in de filterkoker vóór het toevoegen van het monster. Dit bevordert de dispersie van de bacteriën over het volledige oppervlak van het membraan gedurende het filtratieproces.

De filter(s) worden aangebracht op een Slanetz schaal of een gelijkwaardig chromogeen medium (5.1.2) (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden), en geïncubeerd op  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.2) gedurende  $44 \pm 4$  uur, om het aantal enterokokken te bepalen.

Een bijkomende incubatie van  $21 \pm 3$  uur is nodig indien sommige enterokokken species heel kleine kolonies vormen na de eerste  $44 \pm 4$  uur.

Alle kolonies op de Slanetz platen, onafhankelijk van grootte, die roze rode kolonies geven, of dieprode kolonies op de chromogene platen worden als typische presumptieve kolonies (Slanetz) of als bevestigde kolonies (chromogeen medium) beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarde wordt genoteerd.

Indien geen typische kolonies aanwezig zijn, zijn geen presumptieve enterokokken in het monster aanwezig.

## 6.3 BEVESTIGINGSTESTEN ENKEL VANUIT DE SLANETZ PLATEN

De volledige filter wordt aan de hand van een geflambeerde pincet (4.2.1) op een bij  $44^\circ\text{C}$  voorverwarmde Bile-esculine-azide agar plaat (5.1.3) aangebracht en geïncubeerd bij  $44^\circ\text{C}$  (4.1.3) gedurende 2 uur ter bevestiging van de enterokokken.

Het esculine wordt door de enterokokken reeds binnen de 2 uur omgezet tot de verbinding (zie 2) dat samen met het Fe (III) citraat een zwart complex vormt. Indien alle presumptieve kolonies een zwarte verkleuring vertonen, dan is het aantal enterokokken reeds gekend. Indien slechts een deel van de presumptieve kolonies zwart zijn, worden deze geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6), en gerapporteerd.

Indien geen zwarte kolonies aanwezig zijn geen enterokokken in het monster aanwezig.

## 6.4 IDENTIFICATIE VAN ENTEROKOKKEN DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van enterokokken of ter vervanging van de bevestigingstest kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een validatie uitgewerkt te worden conform ISO 16140.

## KWALITEITSCONTROLE

~~Inzetten van een blanco controle bij elke meetreeks: wordt getest door filtratie van 100 ml steriel water (5.1.6). Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een enterokokken referentie bacterie (5.1.7).~~

~~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 blanco controle een positief resultaat ( $>1$  kve presumptieve enterokokken/100 ml)~~

~~geeft 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.~~

## 7 RAPPORTERING

- Bepaal aan de hand van het aantal karakteristieke presumptieven en bevindingen van de bevestigingstest de kve enterokokken waarden per 100 ml watermonster volgens ISO 8199, of de getelde kolonies per 100ml watermonster op de chromogene voedingsbodem.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde kolonies vermenigvuldigd met de overeenstemmende verdunningsfactor.
- Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monster, vermeld het resultaat als <1 kve / 100 ml of als 0 kve / 100 ml.
- Indien meer dan 100 kolonies op de geïnoculeerde schalen met de grootste verdunning  $10^{-x}$  voorkomen, wordt het resultaat als benaderend vermeld (geschat aantal  $>100 \cdot 10^x$  kve/gefilt. volume).

### Rapport

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de gebruikte methode bvb. de betreffende WAC methode
- (incubatietijd en -temperatuur)
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

## 8 REFERENTIES

- ISO 7899-2 (2000) Water quality-Detection and enumeration of intestinal enterococci part 2: Membrane filtration method.
- ISO 7899-1 (1998) Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water.
- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance 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.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- MALDI-TOF MS  
[http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/documents/2015-04\\_labinfo13-p12\\_en.pdf](http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/documents/2015-04_labinfo13-p12_en.pdf)  
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.