

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>Inoculatie en incubatie</i>	4
3.5	<i>Interpretatie</i>	4
3.6	<i>Microbiologische identificatie van Clostridium perfringens door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	4
3.7	<i>Berekening van het resultaat (zie ISO 7218: Amd. 1)</i>	4
4	Weergave van de resultaten	5
5	Kwaliteitscontrole	5
6	Referentie	5

1 WERKWIJZE

De detectie van *Clostridium perfringens* gebeurt door:

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

2 MEDIA EN MATERIAAL

- a. gebufferd pepton water BPW;
- b. (T)SC agar;
- c. voor de bevestigingstest: Fluid Thioglycolaat Medium TGM, lactose sulfiet medium LS (met Durham buisje) of een commerciële biochemische kit;
- d. autoclaaf 121±3°C; incubator 36±2°C, waterbad op 45±1°C, waterbad op 46±0,5°C geschikt glaswerk, pipetten, pH-meter, petrischalen, entnaald, anaërobe jar en reagentia;
- e. Stomachertoestel of gelijkwaardige homogenisator.

3 PROCEDURE

3.1 INITIEEL SUSPENDEREN VAN EEN MONSTER IN GEBUFFERD PEPTOON WATER

- a. Aan 10 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak 90 ml gebufferd pepton water aseptisch toevoegen (1/10 massa/volume verhouding).
- b. Als het monster fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-)zak, vóór het homogenisatieproces.
- c. Homogenisatie in de homogenisator gedurende 2 minuten.
- d. 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 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.
- e. Petrischaal vullen met ± 15 ml vloeibaar SC agar medium bewaard bij 44-47°C in een waterbad.
- f. Entmateriaal en medium mengen door draaiende bewegingen met de schaal.
- g. Agar laten stollen en daarna overgieten met een tweede laag vloeibaar medium (± 10 ml).
- h. Agar laten stollen en drogen in laminaire flow en geïnverteerd anaëroob incuberen bij 36°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.

3.2 TELLING EN SELECTIE VAN KOLONIES VOOR BEVESTIGING

- a. Tel de zwarte presumptieve *Clostridium perfringens*.
- b. Selecteer vijf karakteristieke kolonies uit de schaal voor biochemische bevestiging.

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 INOCULATIE EN INCUBATIE

- a. Inoculeer elk van de geselecteerde kolonies met een entnaald in vloeibaar TGM.
- b. Anaërobe incubatie bij 36°C gedurende 18-24 u.
- c. Pipetteer na incubatie 5 druppels TGM cultuur in LS medium.
- d. Incubatie in een waterbad van 46°C gedurende 18-24 u.

3.5 INTERPRETATIE

- a. Onderzoek elke tube LS medium op gasproductie en op een zwarte verkleuring van het medium door ijzersulfiet precipitatie. Tubes met Durham buisjes die meer dan 1/4 met gas gevuld zijn en waarin een zwart precipitaat voorkomt, worden als positief beschouwd.
- b. Bij twijfel, als in een zwarte LS tube een Durham buisje met minder dan 1/4 gevuld is, pipetteer onmiddellijk 5 druppels LS cultuur in een nieuwe LS tube.
- c. Incubatie in een waterbad van 46°C gedurende 18-24 u.
- d. Onderzoek deze tube(s) zoals hierboven vermeld.

Bacteriën die zwarte kolonies geeft op SC medium en die een positieve bevestiging geven in LS medium, worden als *Clostridium perfringens* beschouwd. In elk andere geval is het resultaat negatief.

3.6 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.

3.7 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. Als er meer dan 100 kolonies per plaat zijn bepaald als *Clostridium perfringens*, wordt het aantal gerapporteerd als > 1000 kve *Clostridium perfringens* /g monster. Indien afwezig wordt <10 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 tweedelijnscontrole.

6 REFERENTIE

- a. ISO 7218: 2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
- b. ISO 7937:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony-count technique