

Bepaling van *Pseudomonas aeruginosa*

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Opmerkingen	4
4	Reagentia en bereidingen	5
5	Apparatuur en materiaal	5
6	Procedure	5
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Analyse via de membraanfiltratie</i>	6
6.3	<i>Bevestigingstesten vanuit PCN</i>	6
6.4	<i>Identificatie van <i>Pseudomonas aeruginosa</i> door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	7
6.5	<i>Telling</i>	7
	Kwaliteitscontrole	8
7	Rapportering	8
7.1	<i>Rapport</i>	8
8	Referenties	8

1 TOEPASSINGSGEBIED

Dit voorschrift volgt de ISO 16266:2006 procedure, die een methode geeft voor het aantonen en kwantificeren van *Pseudomonas aeruginosa* in water.

De procedure is van toepassing bij het onderzoek van flessenwater alsook bijvoorbeeld van water bestemd voor menselijke consumptie, recreatiewater en zwemwater.

Voor analyse van flessenwater kan voor de detectie van *Pseudomonas aeruginosa*, de detectie gebaseerd op enzymatische reacties op het chromogene medium Rapid'*P.aeruginosa* agar (Afnor gevalideerd Fr.) gebruikt worden.

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.

2 PRINCIPE

Pseudomonas aeruginosa zijn opportunistische humane (en animale en plant-) pathogenen, in staat om te groeien in water met heel lage concentraties aan voedingsstoffen.

Bacteriën van het genus *Pseudomonas* zijn Gram-negatieve, katalase positieve niet-sporevormende staafjes die beweeglijk zijn door het bezit van één of meer polaire flagellen. Ze zijn strikt aëroob (uitgez. soorten die nitraat als waterstofacceptor kunnen gebruiken) en zetten suikers uitsluitend oxidatief om. Vele stammen produceren pigmenten waaronder het geel-groene pyoverdine en het blauwe pyocyanine die van diagnostische waarde zijn. Om de pigmentproductie te bevorderen is er in het groeimedium magnesiumchloride en kaliumsulfaat aanwezig. Cetrimide is de selectieve agens van *Pseudomonas* in het groeimedium.

De analyse omvat een membraanfiltratie (0,45µm) van een bepaald volume water, en het aantal karakteristieke kolonies op het membraan worden geteld na incubatie. Pyocyanine producerende kolonies worden als bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* beschouwd. Andere fluorescerende of roodbruine kolonies vereisen een bevestiging.

Ter specifieke bevestiging worden presumptieve kolonies gegroeid op nutrient agar (of een gelijkwaardig niet-selectief medium zonder fermenteerbare C-bron). Na incubatie worden culturen die initieel niet fluorescent waren getest op oxidase reactie. De oxidase-positieve culturen worden getest op de productie van fluoresceïne en de eigenschap om ammoniak te produceren vanuit acetamide. Culturen die oorspronkelijk fluorescent waren worden getest op de eigenschap om ammoniak te produceren uit acetamide.

Op het chromogene medium Rapid'*P.aeruginosa* agar wordt *Pseudomonas aeruginosa* bepaald via membraanfiltratie (0,45µm), zonder verdere bevestigingstesten. Het principe berust op enzymatische klieving van het chromogeen substraat waardoor *Pseudomonas aeruginosa* als blauw tot blauwgroene kolonies verschijnen. Groei van andere micro-organismen worden deels onderdrukt of geven de vorming van geelgroene kolonies die gemakkelijk van *Pseudomonas aeruginosa* te onderscheiden zijn.

In de directieven van 80/777/EEC is omschreven dat vanaf de bron en ook bij de verkoop van mineraal water of bronwater deze vrij moet zijn van *Pseudomonas aeruginosa* (in een monster van 250 ml).

Andere te koop aangeboden gebottelde waters moeten eveneens vrij zijn van *Pseudomonas aeruginosa* in 250 ml (Directieven van 98/83/EC).

Waters zoals oa. zwemwaters worden getest, en water voor menselijke consumptie kan met het oog op volksgezondheid worden getest op *Pseudomonas aeruginosa*.

Het aantal kve *Pseudomonas aeruginosa* wordt dan 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.

Pseudomonas aeruginosa zijn micro-organismen die:

- groeien op selectieve media die cetrimide bevatten en die pyocyanine produceren
- of groeien op selectieve media die cetrimide bevatten, oxidase positief zijn en fluoresceren onder UV 360 ± 20 nm en die in staat zijn ammoniak te produceren uit acetamide
- of groeien op Rapid' *P.aeruginosa* agar onder vorm van blauwe tot blauwgroene kolonies.

Omschrijving van *Pseudomonas aeruginosa* conform de ISO 16266

Pseudomonas aeruginosa is het type species van het genus *Pseudomonas*.

Het is een Gram-negatieve, niet-sporevormende staaf dat oxidase en katalase positief is. Het vertoont oxidatieve metabolisme zoals weergegeven door Hugh en Leifson test, reduceert normaal nitraat tot een verder stadium dan nitriet en produceert ammoniak uit de afbraak van acetamide, en de meeste stammen (98%) produceren een wateroplosbaar fluorescerend pigment. Het overgrote deel van de stammen groeien bij 42°C en niet bij 4°C. Op deze basis kan een onderscheid worden gemaakt tussen *Pseudomonas aeruginosa* en *Pseudomonas fluorescens* die groeit bij 4°C en niet bij 42°C. Gelatine wordt vervloeid, caseïne gehydrolyseerd, maar zetmeel wordt niet gehydrolyseerd. Het pigment pyocyanine (blauw/groen) wordt door meer dan 90% van de stammen geproduceerd.

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.

Alle manipulaties -behalve het filtreren zelf - worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet (5.1.7).

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 (5.1.8).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium³⁸ (4.1.8) en nadien met 70% ethanol (4.1.9).

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 (5.1.7) 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 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

- 4.1.1 Pseudomonas agar base + supplement PCN platen of Rapid'*P.aeruginosa* agar
- 4.1.2 King's B medium
- 4.1.3 Acetamide bouillon
- 4.1.4 Nutrient agar platen
- 4.1.5 Oxidase reagens
- 4.1.6 Nessler reagens
- 4.1.7 Ringer 1/40¹ oplossing
- 4.1.8 Umonium³⁸ 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 4.1.9 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 4.1.10 Referentiestammen *Pseudomonas aeruginosa* en *E.coli*
- 4.1.11 ultra puur water

5 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.1.1 Schudtoestel
- 5.1.2 Pipetus akku
- 5.1.3 Filtratietoestel met pomp
- 5.1.4 Membraandispenser met steriele cellulose ester 0,45 µm filters
- 5.1.5 Incubator 36 ± 2°C
- 5.1.6 Kolonietelapparaat
- 5.1.7 Veiligheidskabinet
- 5.1.8 Autoclaaf 121 ± 3°C
- 5.1.9 Wegwerppipetten
- 5.1.10 Steriele flessen
- 5.1.11 Automatische pipetten en wegwerptips
- 5.1.12 Pincet
- 5.1.13 Entnaald met Pt-öse
- 5.1.14 UV lamp met golflengte 360 ±20 nm

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVOORBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (5.1.1) te brengen.

Uit voorkennis van een monster wordt indien nodig een verdunning gemaakt. Van een te verdunnen watermonster wordt aan de hand van wegwerppipetten (5.1.9) bediend door de pipetus (5.1.2) een verdunning uitgevoerd van een factor 10:

in een fles (5.1.10) gevuld met 225 ml steriele Ringer 1/40 (4.1.7) wordt 25 ml van de suspensie van de hoogste verdunning toegevoegd; vermenging met de hand of op een schudtoestel (5.1.1).

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

¹ 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

De verdunningen van de monsters dienen 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 *Pseudomonas aeruginosa* doorgaans grote kolonies vormen, zal in de praktijk de hoogste telbare waarde op een filter lager liggen.

6.2 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (5.1.3). De steriele filtratiekokers worden of zijn voorzien van steriele 0,45µm membraanfilters (5.1.4).

Een volume van 250 ml of 100 ml monster wordt gefiltreerd.

De filters worden aan de hand van een steriele pincet (5.1.12) telkens aangebracht op een PCN agar of Rapid'*P.aeruginosa* agar (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden) (4.1.1), en geïncubeerd op $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (5.1.5). Filters worden na 22 ± 2 uur afgelezen in geval van overgroei en de verder opkomende kolonies worden onderzocht na 44 ± 4 uur. De kolonies op het membraan worden geteld met behulp van een kolonietelapparaat (5.1.6).

- Blauwe tot blauwgroene kolonies op het chromogeen medium Rapid'*P.aeruginosa* agar worden als bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* beschouwd.
- Pyocyanine producerende kolonies op PCN die een blauw-groene tot geel-groene kleur vertonen worden als bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* beschouwd.
- Het membraan op PCN wordt onderzocht onder een ultraviolet lamp (5.1.14) van $360 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ in een donkere kamer. De tijd dient beperkt te worden tot een minimum zodat de bacteriën niet worden afgedood en niet meer zouden groeien op de bevestigingsmedia. Alle niet-pyocyanine producerende fluorescerende kolonies worden geteld als presumptieve *Pseudomonas aeruginosa* en bevestigd in een acetamide bouillon (4.1.3).
- Alle andere roodbruine gepigmenteerde kolonies die niet fluoresceren worden als presumptieve *Pseudomonas aeruginosa* geteld en bevestigd met oxidase test (4.1.5), acetamide bouillon (4.1.3) en King's B (4.1.2).

De tellingen worden genoteerd; de hoogste telling in zijn totaliteit wordt gerapporteerd.

Overzicht van nodige bevestigingstesten van kolonies op PCN agar

Omschrijving van kolonie op PCN agar	Ammonium uit acetamide	Oxidase productie	Fluorescentie op King's B	Bevestigd als <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Blauw/groen	NG	NG	NG	Ja
Fluorescent (geen blauw/groen)	+	NG	NG	Ja
Roodbruin	+	+	+	Ja
Andere type kolonies	NG	NG	NG	Nee
NG: niet getest				

6.3 BEVESTIGINGSTESTEN VANUIT PCN

Nutriënt agar

Met een Entnaald met Pt-öse (5.1.13) alle of zoveel mogelijke (5-tal) kolonies strijken op nutriënt agar (4.1.4) die een bevestiging eisen, en gedurende 22 ± 2 uur bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (5.1.5) incuberen. De subculturen op zuiverheid controleren.

De oorspronkelijke roodbruine kolonies aan een oxidasetest onderwerpen.

Oxidasetest

De oxidase test wordt uitgevoerd aan de hand van een oxidase reagens (4.1.5) volgens specificaties vermeld in de bijsluiters. Een oxidase positieve reactie wordt veroorzaakt door het enzyme cytochrom oxidase dat inwerkt op het N,N-dimethyl-p-fenyleendiamine, met de vorming van indofenolblauw. Het reagens wordt op een goed geïsoleerde kolonie van een nutriënt plaat getest en na een vastomschreven tijd afgelezen. Indien geen kleurverandering optreedt, leest men nog eens af na een langere tijdspanne.

Pseudomonas zijn oxidase positief en vormen een blauwe verkleuring. Als negatieve controle wordt bijvoorbeeld een *E.coli* cultuur (4.1.10) getest.

King's B medium

De oxidase positieve roodbruine culturen enten in een King's B medium (4.1.2) en 24 uur (tot 5 dagen) incuberen bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (5.1.5). De groei onder UV licht (5.1.14) bekijken en de aanwezigheid van fluorescentie noteren.

De reactie is positief wanneer fluorescentie binnen de 5 dagen voorkomt.

Acetamide bouillon

Een tube acetamide bouillon (4.1.3) inoculeren van een kolonie uit elke plaat nutriënt agar en gedurende 22 ± 2 uur bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (5.1.5) incuberen. Aan de hand van een automatische pipet en wegwerptips (5.1.11) nadien 1 à 2 druppels Nessler reagens (4.1.6) toevoegen en de tubes op ammoniak vorming onderzoeken door het waarnemen van een kleuromslag variërend van geel tot siennarood afhankelijk van de concentratie.

Deze reeks bevestigingstesten kunnen door een commerciële identificatiekit voor *Pseudomonas spp.* vervangen worden.

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

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

6.5 TELLING

Vanuit PCN:

Al de bevestigde *Pseudomonas aeruginosa* kolonies tellen die pyocyanine produceren (blauw/groen pigment) of die een oxidase positief zijn en fluoresceren onder UV licht en in staat zijn om ammoniak te produceren uit acetamide.

Opmerking: kolonies die fluoresceren op het oorspronkelijk PCN membraan zijn steeds oxidase positief en dienen dus hiervoor niet te worden getest.

Indien geen blauw/groene kolonies of geen positief bevestigde kolonies aanwezig zijn, zijn geen *Pseudomonas aeruginosa* in het monster aanwezig.

Vanuit het chromogeen medium:

Alle blauwe tot blauwgroene kolonies op het chromogeen medium Rapid'*P.aeruginosa* agar.

KWALITEITSCONTROLE

~~Inzetten van een blanco controle bij elke meetreeks: wordt getest door filtratie van 100 ml of 250 ml steriel water (4.1.11), de filter wordt op een PCN plaat aangebracht, en gelijktijdig de analyses geïncubeerd. Een positieve controle wordt per lot analysemedia ingezet. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een *Pseudomonas* referentiestam (reïncultuur van *Pseudomonas aeruginosa* (4.1.10).~~

~~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 geeft (>1 kve presumptieve *Pseudomonas* per 100/250 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.~~

7 RAPPORTERING

- De kve *Pseudomonas aeruginosa* waarden per 250 ml (mineraal water, flessenwater, bronwater) of 100 ml watermonster bepalen, rekening houdend met de verhouding uitgevoerde bevestigingstesten.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde *Pseudomonas aeruginosa* (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 of 250 ml of als 0 kve / 100 of 250 ml vermeld.
- Indien meer dan 100 kolonies op de geïnculeerde schalen met de grootste verdunning 10^x voorkomen, wordt het resultaat als benaderend vermeld (geschat aantal $>100 \cdot 10^x$ kve/gefilt. volume).

7.1 RAPPORT

Vermelding in het rapport van:

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

8 REFERENTIES

- ISO 16266 (2006) Water quality -- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* -- Method by membrane filtration.
- Afnor validatierapport voor Rapid'*P.aeruginosa* agar (attest n° BRD 07/21-04/12)

- 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.
- EN 12780 (05/2002) Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration.
- ISO 8360-2 (1988) Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* part two: Membrane filtration method.
- 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
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.