

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 MONSTERVEROORBEREIDING

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 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 geïnoculeerde 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.