

1 TOEPASSINGSGEBIED

De procedure beschrijft de bepaling van de parameter coagulase positieve stafylokokken in water via membraanfiltratie op de voedingsbodems:

- Baird Parker (BP) en bevestiging met coagulase test in tube of met agglutinatie latex test of op de voedingsbodem Baird Parker met Rabbit plasma met fibrinogeen (BP + RPF).
- Baird Parker met Rabbit plasma met fibrinogeen (BP + RPF) rechtstreeks.

Aan deze BP-voedingsbodems wordt voorkeur gegeven boven het alternatieve Chapman mannitol medium.

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van water voor menselijke consumptie, zwembadwater, recreatiewater, en water gebruikt bestemd voor de zorgsector.

De bepaling van de parameter coagulase positieve stafylokokken in water is conform XP T 90-412.

Een aangewende analysemethode dient conform deze normmethode te zijn. Het meetprincipe mag niet anders zijn, en het isolatiemedium dient BP of BP + RPF te zijn. Afwijkingen mogen niet kritisch zijn en geen invloed hebben op het resultaat. Extra stappen zijn aanvaardbaar, zolang ze het resultaat enkel meer ondersteunen.

2 PRINCIPE

Stafylokokken behoren tot de familie Micrococcaceae. *Staphylococcus* spp. zijn Gram-positieve facultatief anaërobe kokken, katalase positief en glucose-fermentatie positief.

Deze procedure beschrijft de kwantitatieve bepaling van de coagulase-positieve stafylokokken waaronder de enterotoxinogene stammen horen.

Deze groep bestaat voornamelijk uit *Staphylococcus aureus*, maar ook een aantal andere zoals *Staphylococcus intermedius* en sommige stammen van *Staphylococcus hyicus*.

De beoogde organismen uit een watermonster worden geïsoleerd op een membraanfilter en op een Baird Parker ¹ (± RPF) agarplaat aangebracht dat wordt geïncubeerd gedurende 24 uur en 48 uur bij 36°C.

Het principe van het BP medium steunt op de eigenschappen van coagulase positieve stafylokokken om:

- telluriet te reduceren met vorming van zwarte kolonies
- de splitsing van het lipide-gedeelte lipovetelline en mogelijk ook de proteolyse van eigeel te veroorzaken met het opaak worden van de proteolysezone. Binnen deze heldere zone kan soms een opalescerende zone ontstaan door een andere vorm van lipolyse (lipase activiteit).

Lithiumchloride en kaliumtelluriet in het medium inhiberen de groei van andere bacteriën.

Sulfamethazine kan worden toegevoegd aan het medium wanneer een hoge *Proteus* spp. contaminatie verwacht wordt.

¹ Het Baird Parker medium bestaat uit een basismedium, kaliumtelluriet, eigeel-emulsie en sulfamethazine.

De eigenschappen eidooier-aantasting en plasma-coagulatie zijn zwak gekorreleerd met enteroxine-productie. Het aantonen van de coagulase-positieve stafylokokken fungeert dus als potentieel aanwezigheid van enterotoxine-positieve stammen.

Isolatie van coagulase positieve stafylokokken op **BP** wordt vervolgd door een bevestigingstest gebaseerd op een coagulase-positieve reactie van verdachte kolonies door ze over te enten:

- in BHI medium en ze nadien te testen op coagulatie met een rabbit plasma reagens of met een stafylokokken agglutinatie latex test
- of op BP + RPF agar platen

Of coagulase positieve stafylokokken worden rechtstreeks geïsoleerd op **BP+RPF**.

Het aantal kve coagulase positieve stafylokokken wordt per 100 ml bepaald.

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

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 (4.1.9) en nadien met 70% ethanol (4.1.10).

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 REAGENTIE EN OPLOSSINGEN

4.1 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- 4.1.1 Baird Parker agarplaten (BP)
- 4.1.2 Baird Parker agarplaten met Rabbit plasma met fibrinogeen (BP + RPF)
- 4.1.3 Brain-heart Infusion bouillon (BHI)
- 4.1.4 Gelyofiliseerd Rabbit plasma coagulase reagens
- 4.1.5 Stafylokokken agglutinatie latex test
- 4.1.6 Ringer 1/40 oplossing
- 4.1.7 Referentiestam coagulase-positieve *Staphylococcus*
- 4.1.8 Steriel ultra puur water
- 4.1.9 Umonium³⁸ 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 4.1.10 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)

6.4.3 BEVESTIGINGSTEST MET STAFYLOKOKKEN AGGLUTINATIE LATEX TEST

Op elke te bevestigen zuivere kolonie wordt de agglutinatietest (4.1.5) uitgevoerd voor de detectie van de aanwezigheid van *Staphylococcus*-antigenen. De test wordt uitgevoerd volgens de richtlijnen van de producent. De agglutinatie wordt vergeleken met een positieve (4.1.7) en negatieve controle. Bevestiging via de latex test (eventueel aangevuld met DNase test) genereren minder vals negatieve resultaten dan bevestiging via de coagulasereactie in tube.

6.5 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE OP BAIRD PARKER AGARPLATEN MET RABBIT PLASMA MET FIBRINOGEEN (BP + RPF) (AANBEVOLEN METHODE VOOR MONSTERS MET VEEL ACHTERGRONDFLORA)

De filters worden aan de hand van een steriele pincet (5.1.12) telkens aangebracht op een BP ± RPF agar (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden) (4.1.1), en geïncubeerd op 36±2°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 de BP + RPF platen die zwart / grijs, glanzend, convex (bol) zijn, met een troebel neerslaghof, zijn de typische coagulase-positieve stafylokokken kolonies. Deze worden geteld met behulp van een kolonietelapparaat (5.1.6). Bij twijfel kan een extra bevestiging van 2 kolonies (per type) uitgevoerd worden door uitstrijking op een BP+RPF agarplaat (4.1.2).

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

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

7 RAPPORTERING

Bereken het aantal coagulase-positieve stafylokokken rekening houdend met het aantal:

- vanuit BP agarplaat de bevestigde typische en atypische kolonies ten opzichte van het totaal aantal typische en atypische kolonies op een plaat.
- vanuit BP + RPF agarplaat de typische kolonies op een plaat.

Finaal wordt het aantal coagulase-positieve stafylokokken in het geanalyseerd volume watermonster genoteerd.

Bij verdunningen wordt het aantal getelde kolonies vermenigvuldigd met de overeenstemmende verdunningsfactor.

Indien geen kolonies aanwezig zijn op de agarplaten geïncubeerd met een onverdund monster, wordt het resultaat vermeld als <1 kve / 100 ml of als 0 kve / 100 ml.

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 ·10^x kve/gefilt. volume).

7.1 RAPPORT

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monsternamen (veldregistraties)

- de verwijzing van de gebruikte methode bvb. de betreffende WAC methode
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen die mogelijks invloed hebben op het resultaat

8 REFERENTIES

- XP T 90-412 (2006) Qualité de l'eau Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes Méthode par filtration sur membrane
- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.
- ISO 6888-1 (1999) Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase -positive staphylococci (staphylococcus aureus and other species) Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.
- ISO 6888-2 (1999) Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase -positive staphylococci (staphylococcus aureus and other species) Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.
- WAC/I/A/002 ogenblikkelijke monsternamen m.b.t. de bacteriologische parameters
- 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
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.