

Bepaling van *Clostridium perfringens*

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Opmerkingen	4
4	Reagentia en oplosmiddelen	4
5	Apparatuur en materiaal	5
6	Werkwijze	5
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Analyse via de membraanfiltratie</i>	5
6.3	<i>Gietplaat waarbij de filter wordt overgoten met TSC</i>	6
6.4	<i>Gietplaat waarbij de filter wordt aangebracht op een TSC plaat</i>	6
6.5	<i>Incubatie</i>	6
6.6	<i>Telling en selectie van kolonies</i>	6
6.7	<i>Biochemische bevestiging</i>	6
6.8	<i>Biochemische bevestiging met kit</i>	7
6.9	<i>Identificatie van <i>Clostridium perfringens</i> door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	7
7	Rapportering	7
7.1	<i>Rapport</i>	7
8	Referenties	7

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft een methode voor het kwantificeren van de parameter *Clostridium perfringens* in water via membraanfiltratie op selectieve media.

De procedure is van toepassing bij het onderzoek van water bestemd voor menselijke consumptie enerzijds en oa. oppervlaktewater, recreatiewater anderzijds.

De methode is conform de werkwijze beschreven in de norm ISO 14189 Water quality - Detection and enumeration of *Clostridium perfringens* - Method using membrane filtration.

Afwijkingen van de referentiemethode:

Indien twijfels bestaan bij de interpretatie van de bevestigingstesten wordt een identificatie aan de hand van een biochemische kit uitgevoerd.

2 PRINCIPE

C. perfringens speelt een secundaire rol in wateranalyses. Dit organisme vormt sporen, is warmte bestendig in vergelijking met vegetatieve cellen, wat een voordeel biedt bij de detectie van clostridia in water. *C. perfringens* is de meest belangrijkste van de sulfiet reducerende clostridia en is doorgaans aanwezig in humane en dierlijke faeces. Clostridiasporen overleven langer dan coliformen, *Escherichia coli* of enterococcen en worden hierdoor als een indicator van postfecale besmetting beschouwd. De sporen worden niet altijd gedesactiveerd door het chloreren van water, maar vormen geen gezondheidsrisico in drinkwater. Alhoewel de resistentie van sporen *C. perfringens* vergelijkbaar is met deze van *Cryptosporidium* en *Giardia*, zijn ze geen betrouwbaar indicator voor de aanwezigheid van deze parasieten in drink- of recreatiewaters. Sporen *C. perfringens* werden gebruikt bij het uittesten van de efficiëntie van filtratieprocessen, maar gezien ze in aantal minder voorkomen dan aërobe sporendragers, zijn ze hierdoor minder relevant.

De bepaling van *Clostridium perfringens* in drinkwater omvat zowel de vegetatieve cellen als de sporen. Bij drinkwateranalyses dient er dus geen voorafgaande warmtebehandeling aan het watermonster te worden gegeven¹.

Een vast volume of een verdunning van het monster wordt gefilterd door een membraan van 0,45µm, voldoende om cellen en sporen tegen te houden. Het membraan wordt anaëroob geïncubeerd bij 44°C op tryptose-sulfiet-cycloserine agar gedurende 21±3 uur. Incubatie bij 44±1°C verhoogt de selectiviteit voor *Clostridium perfringens*, en de cycloserine inhibeert *Bacillus* species.

Clostridium perfringens vormt over het algemeen zwart grijze tot geel bruine kolonies door de reductie van sulfiet tot sulfide welke een reactie geeft met ijzerzouten in het medium. In tegenstelling tot kolonies die rechtstreeks groeien op TSC agar, geven *Clostridium perfringens* kolonies op een membraan niet altijd een duidelijke zwarting, en dus dienen deze lichtere kolonies ook als presumptieve *Clostridia* beschouwd te worden.

Karakteristieke kolonies worden geteld en bevestigingstesten worden uitgevoerd.

Het aantal kve *Clostridium perfringens* wordt per 100 ml bepaald.

¹ Indien niet drinkbaar water met hoge achtergrondflora dient geanalyseerd te worden dan wordt een watermonster eerst 15 ±1min verwarmd tot 60±2°C, waardoor enkel het aantal sporen wordt bepaald. De tijd nodig om deze temperatuur te bereiken kan worden bepaald met een recipiënt gevuld met eenzelfde volume water en een thermometer.

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.

De volgende definities zijn van toepassing:

Presumptieve *Clostridium perfringens*

bacteriën die zwart of grijze tot geel bruine kolonies produceren op tryptose-sulfiet-cycloserine agar na anaerobe incubatie bij 44 °C gedurende 24 h.

Bevestiging naar *Clostridium perfringens*

bacteriën die karakteristieke kolonies op tryptose-sulfiet-cycloserine agar vormen en het zuur phosphatase bezitten.

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 (5.1.11).

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 (5.1.12).

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 (5.1.11) 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 OPLOSMIDDELEN

- 4.1.1 Tryptose-sulfiet-cycloserine TSC agar gietklaar met selectief supplement (D-cylcoserine)
- 4.1.2 Zuur Fosfatase Reagens
- 4.1.3 Columbia agar base of Nutrient agar of Tryptone Soya agar of Blood agar platen
- 4.1.4 TGM-USP medium
- 4.1.5 Reagentia voor anaërobe incubatie
- 4.1.6 Ringer 1/40 oplossing²
- 4.1.7 Rapid™ ANA II System of gelijkwaardige kit
- 4.1.8 Umonium³⁸ 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 4.1.9 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 4.1.10 Referentiestam *Clostridium perfringens*
- 4.1.11 Ultrapuur water

² 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

5 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.1.1 Schudtoestel
- 5.1.2 Vortex
- 5.1.3 Pipetus akku
- 5.1.4 Filtratietoestel met pomp
- 5.1.5 Membraandispenser met steriele cellulose ester 0,45 µm filters
- 5.1.6 Incubator 36 ± 2°C
- 5.1.7 Incubator 44 ± 1°C
- 5.1.8 Warmwaterbad op 45 ± 1°C
- 5.1.9 Warmwaterbad op 99°C ± 1°C
- 5.1.10 Kolonietelapparaat
- 5.1.11 Veiligheidskabinet
- 5.1.12 Autoclaaf 121± 3°C
- 5.1.13 Wegwerppipetten
- 5.1.14 Steriele flessen
- 5.1.15 Automatische pipetten en wegwerptips
- 5.1.16 Pincet
- 5.1.17 Petriplaten van 90mm of 50 mm
- 5.1.18 Entnaald met Pt-öse
- 5.1.19 Pt-steekentnaald
- 5.1.20 Anaërobe jar

6 WERKWIJZE

6.1 MONSTERVEROEBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (5.1.1) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden. Uit voorkennis van een monster wordt indien nodig een verdunning gemaakt. Van een te verdunnen watermonster wordt aan de hand van wegwerppipetten (5.1.13) bediend door de pipetus (5.1.3) een verdunning uitgevoerd van een factor 10:

- In een fles (5.1.14) gevuld met 225 ml steriele Ringer 1/40 (4.1.6) 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.
- De verdunningen van een monster dient 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 *Clostridium perfringens* doorgaans grote zwarte/grijze/bruine kolonies vormen, zal in de praktijk de hoogste telbare waarde op een filter lager liggen.

6.2 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie uitvoeren met een filtratietoestel met pomp (5.1.4). De steriele filtratiekokers worden of zijn voorzien van steriele 0,45µm membraanfilters (5.1.5). Filtratie van 100 ml monster.

6.3 GIETPLAAT WAARBIJ DE FILTER WORDT OVERGOTEN MET TSC

- Maak de TSC gebruiksklaar: kant en klare gestolde agarflesjes opkoken in een kokend warmwaterbad van $99^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (5.1.9) en minstens 45 min afkoelen in een warmwaterbad op $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (5.1.8)
- De filter aan de hand van een steriele pincet (5.1.16) telkens in een benoemde lege petrisplaat (5.1.17) aanbrengen
- 15-20 of 10 ml vloeibare (4.1.1) TSC agar heel voorzichtig in de plaat met filter gieten (naargelang petriplaten (5.1.17) van 90mm of 50mm worden gebruikt)

6.4 GIETPLAAT WAARBIJ DE FILTER WORDT AANGEBRACHT OP EEN TSC PLAAT

- Maak de TSC gebruiksklaar: kant en klare gestolde agarflesjes opkoken in een kokend warmwaterbad van $99^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (5.1.9) en minstens 45 min afkoelen in een warmwaterbad op $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (5.1.8)
- 15-20 of 10 ml vloeibare (4.1.1) TSC agar gieten (naargelang petriplaten (5.1.17) van 90mm of 50mm worden gebruikt)
- De filters worden aan de hand van een steriele pincet (5.1.16) telkens aangebracht op een TSC agar (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden).

6.5 INCUBATIE

- De plaat gedurende 20 min met open deksel drogen in een veiligheidskabinet (5.1.11).
- Na het stollen de platen in een anaërobe container (4.1.5 en 5.1.20) incuberen bij $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (5.1.7) gedurende 21 ± 3 uur. De tijd tussen het gieten van TSC en de anaërobe incubatie in een jar moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 2 uren niet overschrijden.

6.6 TELLING EN SELECTIE VAN KOLONIES

- Tel na de incubatie het aantal zwarte of grijze/beige-geelachtige/bruine presumptieve *Clostridium perfringens* kolonies ($>2\text{mm}$) met behulp van een kolonietelapparaat (5.1.10).
- Tel de kolonies van de platen en hou de platen met minder dan 100 kolonies en hun respectievelijke verdunningen.
- Selecteer 10 (of indien minder alle) karakteristieke kolonies van elke plaat en voer een bevestiging uit.
- Indien geen typische kolonies aanwezig zijn, zijn er geen *Clostridia* in het monster aanwezig.

Opmerkingen:

- De zwarting ontstaat door de ijzerammoniumcitraat indicator bij de sulfietreductie van natriummetabisulfiet.
- *Serratia marcescens*, *Streptococcus lactis* en *Salmonellae* zijn facultatieve anaëroben die op TSC kunnen groeien. Zij geven kleinere kolonies.

6.7 BIOCHEMISCHE BEVESTIGING

- Strijk aan de hand van een Pt-naald (5.1.18) de geselecteerde 10 (of allen indien er minder aanwezig zijn) karakteristieke kolonies op Tryptone Soya agar of Columbia agar base of Nutrient agar platen (4.1.3)
- 21 ± 3 uur anaërobe incubatie (4.1.5 en 5.1.20) bij $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (5.1.6). Controleer op zuiverheid.

- Spreid kolonies op een filtreerpapier en voeg 2-3 druppels van de zuur fosfatase reagens, en een paarse verkleuring binnen 3 minuten wordt beschouwd als een positieve reactie.
Clostridium perfringens produceert zwarte of grijze tot geel bruine kolonies op TSC agar en bezit het zuur fosfatase.

6.8 BIOCHEMISCHE BEVESTIGING MET KIT

Indien twijfel bestaat bij de interpretatie van de bevestigingsmedia, of als alternatief voor de bevestigingstesten selecteer één of meerdere karakteristieke kolonies en ent in een tube TGM USP (4.1.4), 21 ± 3 uur anaërobe incubatie (4.1.5 en 5.1.20) bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

Voer de biochemische identificatie uit aan de hand van een kit (4.1.7) voor anaërobe organismen volgens de werkwijze omschreven in de bijsluiter.

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

7 RAPPORTERING

- Bepaal het aantal kve *Clostridium perfringens* per 100ml watermonster, rekening houdend met de verhouding uitgevoerde bevestigingstesten.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde *Clostridium perfringens* (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 ml of als 0 kve / 100 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 betreffende WAC methode
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

8 REFERENTIES

- ISO 8199:2018 Water quality - General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- [...]

- ISO 14189:2013 Water quality - Detection and enumeration of *Clostridium perfringens* - Method using membrane filtration.
- 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.