Bepaling van coagulase positieve stafylokokken

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021

http://www.emis.vito.be

emis

INHOUD

1 TOEPASSINGSGEBIED 3

2 PRINCIPE 3

3 OPMERKINGEN 4

4 REAGENTIE EN OPLOSSINGEN 4

4.1 Reagentia en oplossingen 4

5 APPARATUUR 5

6 PROCEDURE 5

6.1 Monstervoorbereiding 5

6.2 Membraanfiltratie 5

6.3 Analyse via de membraanfiltratie op BP agarplaten 5

6.4 Bevestigingstesten van kolonies op een BP agarplaat 6

6.4.1 Bevestiging met coagulasereactie in tube 6

6.4.2 Bevestiging coagulasereactie op een BP + RPF agarplaat 6

6.4.3 Bevestigingstest met stafylokokken agglutinatie latex test 7

6.5 Analyse via de membraanfiltratie op Baird Parker agarplaten met Rabbit plasma met fibrinogeen (BP + RPF) (aanbevolen methode voor monsters met veel achtergrondflora) 7

6.6 Identificatie van stafylokokken door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY) 7

7 RAPPORTERING 7

7.1 Rapport 7

8 REFERENTIES 8

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021

http://www.emis.vito.be

emis

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021

http://www.emis.vito.be

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.

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021

De eigenschappen eidooier-aantasting en plasma-coagulatie zijn zwak gekorreleerd met enteroxine-produktie. 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 bevestigingtest 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% Umonium[38] (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 **R**abbit **p**lasma met **f**ibrinogeen (BP + **RPF**)
4.1.3 Brain-heart Infusion bouillon (BHI)
4.1.4 Gelyofiliseerd Rabbit plasma coagulase reagens
4.1.5 Stafylokokken aglutinatie latex test
4.1.6 Ringer 1/40 oplossing
4.1.7 Referentiestam coagulase-postieve *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)

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021

http://www.emis.vito.be

5 APPARATUUR

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

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 bvb. 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 de monsters dienen dusdanig gekozen te worden dat het aantal te tellen kolonies op een membraan standaard tussen 15 en 80 ligt. De voorkeur wordt gegeven aan de verdunning met een resultaat in deze range.

6.2 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 100 ml monster wordt gefiltreerd.

6.3 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE OP BP AGARPLATEN

De filters worden aan de hand van een steriele pincet (5.1.12) telkens aangebracht op een BP 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 het membraan worden geteld met behulp van een kolonietelapparaat (5.1.6).

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021

Met alle kolonies op de BP platen wordt rekening gehouden voor verder onderzoek, behalve grote slijmerige kolonies die niet in aanmerking komen. Typische kolonies: zwart / grijs, glanzend, convex (bol) 1/1,5 mm na 24 uur en 1,5 / 2,5 mm na 48 uur en begrensd met een heldere hof. Na 24 uur incubatie is er een opalescerende ring te zien in het helder hof. Maar ook de atypische (niet-karakteristieke) kolonies kunnen tot de coagulase-positieve stafylokokken behoren en worden verder onderzocht. Atypische kolonies: zwart glanzend kolonies met of zonder een smalle witte rand; het heldere hof en / of de opalescerende ring zijn nauwelijks te zien of afwezig; atypische kolonies kunnen ook grijs zijn en vrij van een helder hof.
De kolonies worden geteld met behulp van een kolonietelapparaat (5.1.6).
De typische en atypische kolonies worden aangeduid. De verdunning met maximum en 80-tal kolonies en de daaropvolgende verdunningen worden behouden. De aantallen getelde aantal typische en / of atypische kolonies worden genoteerd.

Voor de bevestiging worden van alle aantallen verschillende soorten atypische en van de typische presumptieve kolonies, met n_i het aantal presumptieve kolonies van type i geteld op het membraan:

- indien $1 \leq n_i \leq 2$, bevestig alle kolonies van dit type i aanwezig op het membraan;
- indien $n_i > 2$, bevestig minimum 2 kolonies van dit type i aanwezig op het membraan.

6.4 BEVESTIGINGSTESTEN VAN KOLONIES OP EEN BP AGARPLAAT

6.4.1 BEVESTIGING MET COAGULASEREACTIE IN TUBE

Elk te onderzoeken kolonie wordt a.d.h. van een steriele entnaald (5.1.13) in 10 ml BHI medium (4.1.3) geënt en geïncubeerd bij 36±2°C gedurende 22±2 uur.
In de aanbevolen volume in de bijsluiter van het in steriel water opgelost gelyofiliseerd plasma coagulase reagens wordt in een steriele dunne tube gemengd met aanbevolen volume vloeibare BHI cultuur. Incubatie bij 36±2°C.
Vanaf de nodige incubatieduur (volgens bijsluiter) wordt elke tube-inhoud met een opgegeven frequentie op coagulatie gecontroleerd door de tube voorzichtig te inclineren (zeker niet schudden).
De coagulase-test wordt positief beschouwd indien meer dan de helft van de inhoud grote klontervorming vertoont.
Indien na 4-6 uur de test negatief is, wordt verder geïncubeerd gedurende 24 uur voor een eindoordeel te maken.
Als negatieve controle wordt per batch Rabbit plasma het nodige volume steriele BHI en het nodige volume coagulase reagens geïncubeerd gedurende een aantal uren. Voor een geldige test mag er geen klontervorming voorkomen. Als positieve controle wordt een positieve coagulasetest uitgevoerd op een coagulase positieve *Staphylococcus* (bvb. *Staphylococcus aureus*) (4.1.7).

6.4.2 BEVESTIGING COAGULASEREACTIE OP EEN BP + RPF AGARPLAAT

De volledige filter wordt a.d.h. van een steriele pincet (5.1.12) van een BP agarplaat op een BP + RPF agarplaat (4.1.2) geënt en geïncubeerd bij 36±2°C gedurende 22±2 uur.
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).

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021

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 geïnoculeerde 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 monstername (veldregistraties)

http://www.emis.vito.be

- de verwijzing naar 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 8199:2018 Water quality - General requirements and guidance for microbiological examinations 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 monstername 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.

Ministerieel besluit van 22 januari 2021 --- Belgisch Staatsblad van 03 februari 2021
http://www.emis.vito.be
emis