

Bacteriologische analyses van eindproducten bij de verwerking van dierlijke bijproducten

INHOUD

1	TOEPASSINGSGBIED	4
2	MONSTERVEROBEREIDING (NBN EN ISO 7218:2007/Amd 1:2013 / ISO 6887-1:2017 / ISO 6887-2:2017 / ISO 6887-4:2017)	4
2.1	<i>Materiaal en uitrusting</i>	4
2.2	<i>Principe</i>	4
3	DETECTIE VAN ENTEROBACTERIACEAE (ISO 21528-2:2017)	5
3.1	<i>Werkwijze</i>	5
3.2	<i>Apparatuur en materiaal</i>	6
3.3	<i>Reagentia</i>	6
3.4	<i>Procedure</i>	6
3.4.1	Initieel suspenderen van een monster in gebufferd pepton water	6
3.4.2	Telling en selectie van kolonies voor bevestiging	7
3.4.3	Subcultuur van de geselecteerde kolonies	7
3.4.4	Biochemische bevestigingstesten	7
3.4.5	Berekening van het resultaat (zie ISO 7218:2007/Amd. 1:2013) vanuit VRBG	7
3.4.6	Bepaal van het resultaat vanuit chromogeen Enterobacteriaceae agar	7
3.5	<i>Weergave van de resultaten</i>	7
4	DETECTIE VAN SALMONELLA (ISO 6579-1:2017)	8
4.1	<i>Werkwijze</i>	8
4.2	<i>Apparatuur en materiaal</i>	8
4.3	<i>Reagentia</i>	8
4.4	<i>Procedure</i>	9
4.4.1	Initieel suspenderen van monster en pre-aanrijking in een niet selectief vloeibaar medium (gebufferd pepton water)	9
4.4.2	Aanrijking van Salmonella in twee selectieve media	9
4.4.3	Uitplating en identificatie	9
4.5	<i>Biochemische en serologische bevestigingstesten</i>	10
4.5.1	Selectie van kolonies voor de bevestigingstesten	10
4.5.2	Biochemische bevestigingstesten	10
4.5.3	Serologische bevestigingstest	11
4.5.4	Species identificatie	11
4.6	<i>Weergave van de resultaten</i>	11
5	DETECTIE VAN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (ISO 7937:2004)	11
5.1	<i>Werkwijze</i>	11
5.2	<i>Apparatuur en materiaal</i>	11
5.3	<i>Reagentia</i>	12
5.4	<i>Procedure</i>	12

5.4.1	Initieel suspenderen van een monster in gebufferd pepton water _____	12
5.4.2	Telling en selectie van kolonies voor bevestiging _____	12
5.4.3	Biochemische bevestigingstest(en) _____	13
5.4.4	Berekening van het resultaat (zie ISO 7218:2007/Amd. 1:2013) _____	14
5.5	<i>Weergave van de resultaten</i>	14
5.6	<i>Identificatie van Enterobacteriaceae, Salmonella, Clostridium perfringens door middel van maldi-tof ms (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry)</i>	14
6	REFERENTIES _____	15

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt CMA/4/A van september 2017.

De bacteriologische analyses van afgeleide producten die vrijkomen bij verwerkers van dierlijke bijproducten: vaste fracties (beendermeel, verenmeel, bloedmeel,) en vloeibare fracties (vet) omvatten de volgende procedures: de bepaling van het aantal *Enterobacteriaceae*, de detectie van *Salmonella* en de bepaling van *Clostridium perfringens*.

De procedure CMA/1/A.21 omvat de monsternamen van de voormelde afgeleide producten die vrijkomen bij verwerkers van dierlijke bijproducten.

Voor de monsterbewaring wordt verwezen naar CMA/1/B Monsterconservering en -bewaring.

Voor de uit te voeren kwaliteitscontrole wordt verwezen naar de procedure CMA/6/D Kwaliteitseisen voor de analysemethoden.

2 MONSTERVEROORBEREIDING (NBN EN ISO 7218:2007/AMD 1:2013 - ISO 6887-1:2017 - ISO 6887-4:2017)

2.1 MATERIAAL EN UITRUSTING

Er wordt gewerkt in een propere en tochtvrije werkruimte bestemd voor bacteriologisch onderzoek. Een laminaire flow kast moet voorhanden zijn. De werktafel wordt voor en na gebruik ontsmet.

Het nodige steriel materiaal voor de verpakking te openen en voor het scheppen van de monsters moet aanwezig zijn (steriele lepels, schaar, pincet).

De sterilisatie van de uitrusting gebeurt door:

- natte sterilisatie $121 \pm 3^\circ\text{C}$, 15 min;
- droge sterilisatie $160\text{-}180^\circ\text{C}$ (30 min bij 180°C of 120 minuten bij 160°C)
- met ethanol te flamberen.

Een weegtoestel is aanwezig en laat toe om monsters aseptisch af te wegen.

Het homogeniseren in een homogenisator gebeurt in steriele plastic zakken. De zakken moeten een zodanige capaciteit hebben dat het monster met het vereiste volume dilutie vloeistof behoorlijk kan vermengd worden (doorgaans een inhoud van 400 ml).

2.2 PRINCIPE

Na het openen van de verpakking worden de deelmonsters rechtstreeks in steriele plastic zakken aseptisch afgewogen; hierbij wordt niet gehomogeniseerd. De af te wegen analyseportie wordt uit het binnenste van de pot /zak geschept. Het scheppen van de buitenste laag van het materiaal uit de pot/zak wordt vermeden.

In functie van de bacteriologische analyse worden de volgende hoeveelheden afgewogen:

- voor *Enterobacteriaceae* 5 maal 10 g materiaal;
- voor *Salmonella* 5 maal 25 g materiaal;

- voor *Clostridium perfringens* 1 maal 10 g materiaal.

De analyses worden zo veel mogelijk zonder onderbrekingen uitgevoerd, zo niet worden de monsters steeds gestockeerd in de koelkast.

Van het te analyseren eindproduct van dierlijke bijproducten wordt een initiële suspensie in gebufferd pepton water gemaakt om een zo uniform mogelijke verdeling van micro-organismen vanuit het monster te bekomen.

Voor de *Salmonella* analyse dient deze stap als vooraanrijking.

Voor de bepaling van *Enterobacteriaceae* en *Clostridium perfringens* dient het volume van de initiële suspensie, dat respectievelijk representatief is voor 0,5 of 1 gram monster, te worden getest. Van deze suspensie dienen geen decimale verdunningen te worden uitgevoerd. Een monster voldoet aan de bacteriologische normen beschreven de Verordening voor dierlijke bijproducten wanneer voor:

- a) Materiaalmonsters die onmiddellijk na de **warmte**behandeling worden genomen:

Clostridium perfringens: geen in 1 g.

- b) Materiaalmonsters **die tijdens de opslag of bij de uitslag (vrijgave) van de producten worden genomen:**

Salmonella spp.: geen in 25 g: $n = 5, c = 0, m = 0, M = 0$

Enterobacteriaceae: $n = 5, c = 2, m = 10, M = 300$ in 1 g

waarbij

n = aantal te testen (punt)monsters;

m = drempelwaarde voor het aantal bacteriën; het resultaat wordt als bevredigend beschouwd als het aantal bacteriën in geen enkel monster groter is dan m ;

M = maximumwaarde voor het aantal bacteriën; het resultaat wordt als onbevredigend beschouwd als het aantal bacteriën in één of meer monsters gelijk is aan of hoger ligt dan M ; en

c = aantal (punt)monsters waarvoor de bacterietelling een resultaat tussen m en M te zien mag geven en waarbij het monster nog als aanvaardbaar wordt beschouwd als het resultaat van de bacterietelling voor de overige monsters niet hoger is dan m .

Indien zuiver vet als eindproduct dient getest te worden, wordt 10g/l polyoxyethyleen sorbitan monooleaat (Tween 80 of polysorbaat 80) toegevoegd aan het gebufferd pepton water, dit om het emulsiefiëren te verbeteren.

3 DETECTIE VAN ENTEROBACTERIACEAE (ISO 21528-2:2017)

3.1 WERKWIJZE

Detectie van *Enterobacteriaceae* gebeurt door:

- isolatie en telling van presumptieve *Enterobacteriaceae* door analyse van de initiële suspensie met het selectief medium Violet Red Bile Glucose agar of een chromogeen *Enterobacteriaceae* agar via de gietplaatmethode;
- vanuit VRBG agar uitstrijken van kolonies presumptieve *Enterobacteriaceae* op een niet selectief medium en bevestiging van glucose fermentatie en negatieve oxidase reactie;
- berekenen van het aantal *Enterobacteriaceae* per gram monster aan de hand van het aantal bevestigde typische kolonies.

3.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 3.2.1 Steriele plastic (stomacher)zakken
- 3.2.2 Stomacher[®] of Pulsifier[®] of gelijkwaardige peristaltische homogenisator
- 3.2.3 automatische en/of gegradueerde pipetten
- 3.2.4 petrischalen
- 3.2.5 waterbad van 45±1°C
- 3.2.6 laminaire flowkast
- 3.2.7 incubator van 36±2°C
- 3.2.8 entnaald

3.3 REAGENTIA

- 3.3.1 gebufferd pepton water (BPW)
- 3.3.2 Violet Red Bile Glucose (VRBG-agar) of een chromogeen *Enterobacteriaceae* agar
- 3.3.3 nutriënt agar of gelijkaardig niet- selectieve agar
- 3.3.4 oxidasetest
- 3.3.5 glucose OF agar (in tubes)
- 3.3.6 steriele minerale olie

3.4 PROCEDURE

Alle manipulaties – behalve de homogenisatie – worden uitgevoerd in een laminaire flowkast .

3.4.1 INITIEEL SUSPENDEREN VAN EEN MONSTER IN GEBUFFERD PEPTOON WATER

- aan 10 g¹ afgewogen homogeen monster in een steriele plastic zak 90 ml² gebufferd pepton water³ (BPW op kamertemperatuur) aseptisch toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding). Indien de monsters fragmenten bevatten die de steriele plastic zak kunnen beschadigen, gebruik zakken in dubbel- of drievoud om perforatie en lekkage te voorkomen.
- homogenisatie in de homogenisator gedurende 2 minuten
- onmiddellijk wordt uit de steriele plastic zak van de gebufferd pepton suspensie met pipet in vijfvoud 1 ml van het te analyseren monsterextract overgebracht in vijf lege steriele petrischalen (5 ml suspensie is representatief voor 0,5 gram monster). Vermijd hierbij stukjes monster of vet te pipetteren. De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het gieten van VRBG of chromogeen *Enterobacteriaceae* -agar moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 15 min niet overschrijden
- petrischalen vullen met ±15 ml vloeibaar VRBG of chromogeen *Enterobacteriaceae* -agar bewaard bij 44-46°C in een waterbad
- entmateriaal en medium mengen door het uitvoeren van horizontale bewegingen
- na volledig stollen van het mengsel, een deklaag van ongeveer 5 - 10 ml vloeibaar VRBG agar toevoegen, om verspreide groei te voorkomen en om semi-anaerobe omstandigheden te bereiken
- agar laten stollen en drogen in laminaire flow en geïnverteerd incuberen bij 36°C gedurende 24±2 u

¹ Tolerantie: ±5 %

² Tolerantie ±2 %

³ Voor de analyse van vet: voorverwarm het gebufferd pepton water in een waterbad van 45°C

3.4.2 TELLING EN SELECTIE VAN KOLONIES VOOR BEVESTIGING

- de roze, rode kolonies of purperen kolonies met of zonder dieprode halo-precipitatie op VRBG zijn presumptieve *Enterobacteriaceae* en worden geteld. Op de chromogeen *Enterobacteriaceae*-agar zijn de roze-rode kolonies bevestigd als *Enterobacteriaceae*.
- enkel vanuit VRBG selecteer willekeurig vijf presumptieve kolonies uit de vijf petrischalen voor biochemische bevestiging. Indien geen karakteristieke kolonies aanwezig zijn, kies dan vijf witachtige kolonies.

3.4.3 SUBCULTUUR VAN DE GESELECTEERDE KOLONIES

- strijk de vijf geselecteerde kolonies met een entnaald op nutriënt agar schalen voor bevestiging
- incubatie bij 36°C gedurende 24±2 u
- selecteer welgeïsoleerde kolonies uit elk van de geïncubeerde schalen

3.4.4 BIOCHEMISCHE BEVESTIGINGSTESTEN

Oxidase reactie

- voer de oxidasetest uit volgens de richtlijnen van de producent met een deel van een gekozen kolonie, en dit uit de vijf verschillende schalen

Fermentatietest

- ent dezelfde kolonies via steekenting telkens in één tube glucose OF agar
- bedek het oppervlak van het medium met minimale 1 cm steriele minerale olie
- incubatie van de tubes bij 36°C gedurende 24±2 u
- indien een gele kleur voorkomt doorheen de inhoud van de tube is de reactie positief

Interpretatie van de biochemische testen

- oxidase-negatieve en glucose-positieve kolonies zijn bevestigd als *Enterobacteriaceae*.

3.4.5 BEREKENING VAN HET RESULTAAT (ZIE ISO 7218:2007/AMD. 1:2013) VANUIT VRBG

Sommeer de aantallen presumptieve kolonies van de vijf petrischalen (= C).

Bereken het aantal *Enterobacteriaceae* a in 1 gram monster:

$$a = b/A \times 2 \times C$$

met b het aantal geconfirmeerde kolonies

en A het aantal geïnoculeerde kolonies ter bevestiging (=5).

3.4.6 BEPAAL VAN HET RESULTAAT VANUIT CHROMOGEEN ENTEROBACTERIACEAE AGAR

Sommeer de aantallen kolonies van de vijf petrischalen (= C).

Bereken het aantal *Enterobacteriaceae* a in 1 gram monster:

$$a = 2 \times C$$

3.5 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Het aantal *Enterobacteriaceae* wordt uitgedrukt als aantal kve in 1 g monster.

Indien telkens per plaat meer dan 150 kve *Enterobacteriaceae* zijn bepaald wordt het aantal *Enterobacteriaceae* gerapporteerd als > 1500 kve/g monster.

Indien *Enterobacteriaceae* afwezig zijn wordt <2 kve/g monster gerapporteerd.
In het rapport wordt eveneens de gebruikte methode vermeld of wordt ernaar verwezen.
De datum en uur van monsternamen en datum en startuur van analyse dienen op het analyseverslag vermeld te worden.

4 DETECTIE VAN SALMONELLA (ISO 6579-1:2017)

4.1 WERKWIJZE

De detectie van *Salmonella* omvat de opeenvolgende stadia:

- pre-aanrijking in een niet selectief vloeibaar medium;
- aanrijking van *Salmonella* in twee selectieve media na de pre-aanrijking;
- uitplating en identificatie;
- biochemische en serologische bevestigingstesten.

4.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 4.2.1 Steriele plastic (stomacher)zakken
- 4.2.2 Stomacher[®] of Pulsifier[®] of gelijkwaardige homogenisator
- 4.2.3 automatische en/of ge graduateerde pipetten
- 4.2.4 90mm en 140mm petrischalen
- 4.2.5 incubator van 36±2°C
- 4.2.6 incubator van 41,5±1°C
- 4.2.7 entnaald
- 4.2.8 laminaire flowkast
- 4.2.9 koelkast van 5±3°C

4.3 REAGENTIA

- 4.3.1 gebufferd pepton water (BPW)
- 4.3.2 Rappaport-Vassiliadis medium met soya RVS
- 4.3.3 Muller-Kauffmann tetrathionaat novobiocine bouillon (MKTTn bouillon)
- 4.3.4 xylose lysine deoxycholaat agar (XLD)
- 4.3.5 tweede agar medium naar keuze en oordeel van het laboratorium: *Salmonella* chromogenic agar of gelijkwaardig medium. Om zo volledig mogelijk alle stammen van het geslacht *Salmonella* te kunnen selecteren moeten minstens twee selectieve '*Salmonella*-media' gebruikt worden. XLD is vastgelegd in de norm en een tweede medium moet gekozen worden in functie van de mogelijke groei uit het spectrum van *Salmonella*. Een combinatie van de media kan bepaald worden uit de specificaties in de handleidingen van de media bij de verschillende merken. Zie ook Annex E tabel E.1 ISO 6579-1:2017
- 4.3.6 nutriënt agar of gelijkaardig niet- selectief agar

Voor de bevestigingstesten:

- 4.3.7 triple sugar iron agar (TSI)
- 4.3.8 urea agar Christensen
- 4.3.9 L-lysine decarboxylation medium
- 4.3.10 reagens voor detectie van β-galactosidase

- 4.3.11 reagens voor indol reactie
- 4.3.12 of een commerciële biochemische kit
- 4.3.13 fysiologische zoutoplossing (0,85 % NaCl)
- 4.3.14 monovalent of polyvalent anti H,O,Vi sera voor *Salmonella* of *Salmonella* Latex Agglutinatie Test of gelijkwaardige test
- 4.3.15 transport agar slant

4.4 PROCEDURE

Alle manipulaties – behalve de homogenisatie – worden uitgevoerd in een laminaire flowkast.

4.4.1 INITIEEL SUSPENDEREN VAN MONSTER EN PRE-AANRIJING IN EEN NIET SELECTIEF VLOEIBAAR MEDIUM (GEBUFFERD PEPTOON WATER)

- aan 25 g¹ afgewogen homogeen monster in een steriele plastic zak 225 ml² gebufferd pepton water³ (BPW op kamertemperatuur) aseptisch toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding). Indien de monsters fragmenten bevatten die de steriele plastic zak kunnen beschadigen, gebruik zakken in dubbel- of drievoud om perforatie en lekkage te voorkomen
- homogenisatie in de homogenisator gedurende 2 minuten
- de zak wordt afgesloten met een clips of tape
- de steriele plastic zak wordt geïncubeerd bij 36°C gedurende 18±2 u

Het is mogelijk om het pre-aangerijkte monster op te slaan na incubatie bij 5°C gedurende maximaal 72 uur.

4.4.2 AANRIJING VAN SALMONELLA IN TWEE SELECTIEVE MEDIA

De RVS en MKTTn bouillon op kamertemperatuur brengen.

Uit de steriele plastic zak wordt van de gebufferd pepton suspensie:

- 0,1 ml in 10 ml RVS bouillon getransfereerd: incubatie bij 41,5± 1°C (aandacht om 42,5°C zeker niet te overschrijden) gedurende 24±3u
- 1 ml met pipet in 10 ml MKTTn bouillon overgebracht: incubatie bij 36°C gedurende 24±3u.

Vermijd hierbij stukjes monster of vet te pipetteren.

Belangrijke opmerking: het is aangewezen om de RVS en MKTTn steeds verder gedurende 24±3u te incuberen, specifiek om traag groeiende *Salmonella* te detecteren. Indien er geen typische *Salmonella* kolonies bij punt 4.4.3 waargenomen worden, kan na de verdere incubatie opnieuw uitgeplaat worden op de selectieve agarmedia.

Het is mogelijk om de selectieve aangerijkte monsters op te slaan na incubatie bij 5°C gedurende maximaal 72 uur.

4.4.3 UITPLATING EN IDENTIFICATIE

Voor de uitplating worden - optioneel- extra grote schalen (±140 mm) geënt. Laat de XLD-agarplaten en het tweede selectief medium op kamertemperatuur komen indien ze bij een lagere temperatuur worden opgeslagen. Droog indien nodig het oppervlak van de platen voor gebruik.

Na incubatie van 24±3 u:

- met een platinumnaald wordt vanuit de vloeibare cultuur van zowel RVS als MKTTn bouillons telkens een petrischaal van het selectief medium XLD en het bijkomend medium geënt;

- incubatie van de XLD schalen (agarbodem aan de bovenzijde) bij 36°C gedurende 24±3u. Het tweede medium wordt geïncubeerd volgens instructies van de leverancier. Na incubatie wordt de aanwezigheid van typische en mogelijke *Salmonella* kolonies gecontroleerd.
- op XLD:
 - typische *Salmonella* kolonies hebben een zwart centrum en een licht transparante roodachtige kleur door kleurverandering van de indicator;
 - H₂S negatieve varianten van *Salmonella* vertonen een roze kleur en een donkerroos centrum;
 - lactosepositieve *Salmonella* geven gele kolonies met of zonder zwarting;
- op het tweede medium: controle van presumptieve *Salmonella* kolonies volgens de karakteristieken van het aangewend medium.
- Indien de platen negatief zijn na 24 u incubatie, nogmaals 24±3u incuberen.

4.5 BIOCHEMISCHE EN SEROLOGISCHE BEVESTIGINGSTESTEN

De combinatie van biochemische en serologische testresultaten geeft aan of een isolaat hoort bij het geslacht *Salmonella* spp.

4.5.1 SELECTIE VAN KOLONIES VOOR DE BEVESTIGINGSTESTEN

- voor de bevestigingstesten worden uit beide selectieve media indien mogelijk een vijftal typische of verdachte kolonies met een entnaald opgepikt en uitgestreken op een nutriënt agar plaat, zodanig dat goed geïsoleerde kolonies worden verkregen
- incubatie van de schalen bij 36°C gedurende 24 ±3u
- gebruik zuivere culturen voor de bevestigingstesten

Eén isolaat wordt getest. Wanneer deze negatief blijkt worden de vier andere isolaten onderworpen aan de bevestigingstesten. Voor epidemiologische studies worden minstens vijf isolaten getest.

Het is toegestaan om de biochemische bevestiging direct uit te voeren op een verdachte, goed geïsoleerde kolonie uit een selectief medium. De cultuurstep op het niet-selectief agarmedium kan dan in parallel worden uitgevoerd met de biochemische tests, dit voor de zuiverheidscontrole van de kolonie die uit het selectief agarmedium is genomen.

4.5.2 BIOCHEMISCHE BEVESTIGINGSTESTEN

Op een te onderzoeken zuivere kolonie wordt een biochemische identificatie uitgevoerd met de media en testen:

- TSI (glucose + zuur + gas positief, zwavelwaterstofvorming positief 92-97% *S. Paratyphi* 10%, lactose negatief 99 % *S. Paratyphi* positief en sucrose negatief 99%);
- ureum hydrolyse (99% negatief);
- lysine-decarboxylatie (95 % positief; *S. Paratyphi* negatief; *S. Typhi* 98% positief)
- β-galactosidase reactie (negatief 98 %) optioneel;
- Indol productie (99% negatief) optioneel.

Deze testen kunnen eveneens uitgevoerd worden met een commerciële biochemische kit, en indien nodig met de hierboven vernoemde testen aangevuld worden.

De interpretatie van de resultaten van een identificatiekit gebeurt volgens de daarbij horende handleiding.

Indien *Salmonella* spp. stammen worden geïdentificeerd wordt een serologische confirmatie uitgevoerd.

4.5.3 SEROLOGISCHE BEVESTIGINGSTEST

Elimineren van autoagglutinerende stammen:

Breng op een onderlaag een druppel zoutoplossing en los hierin aan de hand van een entnaald een deel van een verdachte kolonie.

Door ronddraaiende beweging gedurende 30-60 s wordt de autoagglutinatatie nagegaan. Indien deze positief is wordt er verder geen serologische test gedaan.

Op elke (niet auto-agglutinerende) zuivere kolonie wordt de agglutinatietest uitgevoerd voor de detectie van de aanwezigheid van *Salmonella* O-,en/of Vi- en/of H-antigenen. De test wordt uitgevoerd volgens de richtlijnen van de producent. De agglutinatatie wordt vergeleken met een positieve en negatieve controle.

Indien agglutinatatie optreedt wordt de reactie positief gerapporteerd.

4.5.4 SPECIES IDENTIFICATIE

Indien de noodzaak er is voor species identificatie, wordt een isolaat hiervoor geënt in transport agar slant. De tubes worden verstuurd naar een erkend instituut waar de definitieve typering kan gebeuren.

4.6 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

In functie van de resultaten en interpretatie wordt de aan - of afwezigheid van *Salmonella* spp. uitgedrukt in 25 g monster.

In het rapport wordt eveneens de gebruikte methode vermeld of wordt ernaar verwezen.

De datum en uur van monsternamen en datum en startuur van analyse dienen op het analyseverslag vermeld te worden.

5 DETECTIE VAN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (ISO 7937:2004)

5.1 WERKWIJZE

Detectie van *Clostridium perfringens* gebeurt door:

- isolatie en telling van karakteristieke kolonies door analyse van de initiële suspensie met het selectief medium SC agar via de gietplaatmethode;
- bevestigen van karakteristieke kolonies;
- berekenen van het aantal *Clostridium perfringens* per gram monster aan de hand van het aantal bevestigde kolonies.

5.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.2.1 Steriele plastic (stomacher)zakken
- 5.2.2 Stomacher[®] of Pulsifier[®] of gelijkwaardige homogenisator
- 5.2.3 automatische en/of gegraduateerde pipetten
- 5.2.4 petrischalen
- 5.2.5 waterbad op 45±1°C
- 5.2.6 laminaire flow
- 5.2.7 incubator van 36±2°C
- 5.2.8 waterbad op 46±0,5°C
- 5.2.9 entnaald met oog

- 5.2.10 anaërobe jar
- 5.2.11 waterbad op $99\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.2.12 steekentnaald
- 5.2.13 koelkast van $5\pm 3^{\circ}\text{C}$

5.3 REAGENTIA

- 5.3.1 gebufferd pepton water BPW
- 5.3.2 (T)SC agar
- 5.3.3 reagentia voor anaërobie

Voor de bevestigingstesten:

- 5.3.4 fluid Thioglycolaat Medium TGM
- 5.3.5 lactose sulfiet medium LS (met Durham buisje)
- 5.3.6 nitraat motiliteitsmedium NMM
- 5.3.7 lactose gelatine medium LGM
- 5.3.8 5-amino-2-naphthaleensulfonzuur oplossing NIT A
- 5.3.9 sulfanilic zuur oplossing NIT B
- 5.3.10 zink poeder

of een commerciële biochemische kit

5.4 PROCEDURE

Alle manipulaties - behalve de homogenisatie - worden uitgevoerd in een laminaire flowkast.

5.4.1 INITIEEL SUSPENDEREN VAN EEN MONSTER IN GEBUFFERD PEPTOON WATER

- aan 10 g^{-1} afgewogen homogeen monster in een steriele plastic zak 90 ml^{-2} gebufferd pepton water ³ (BPW op kamertemperatuur) aseptisch toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding). Indien de monsters fragmenten bevatten die de steriele plastic zak kunnen beschadigen, gebruik zakken in dubbel- of drievoud om perforatie en lekkage te voorkomen
- homogenisatie in de homogenisator gedurende 2 minuten
- onmiddellijk wordt uit de steriele plastic zak van de gebufferd pepton suspensie met pipet in vijfvoud 2 ml van het te analyseren monsterextract overgebracht in vijf lege en steriele schalen (10 ml suspensie is representatief voor 1 gram monster). Vermijd hierbij stukjes monster of vet te pipetteren. De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het gieten van SC moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 15 min niet overschrijden
- petrischalen vullen met $\pm 15\text{ ml}$ vloeibaar SC agar medium bewaard bij $44\text{-}46^{\circ}\text{C}$ in een waterbad
- entmateriaal en medium mengen door draaiende bewegingen met de schalen
- agar laten stollen en nadien overgieten met een tweede laag ($\pm 10\text{ ml}$) vloeibaar SC medium
- agar laten stollen en drogen in laminaire flow en geïnverteerd anaëroob incuberen bij 36°C gedurende $20\pm 2\text{ u}$

5.4.2 TELLING EN SELECTIE VAN KOLONIES VOOR BEVESTIGING

- van alle schalen worden de zwarte presumptieve *Clostridium perfringens* geteld
- selecteer vijf karakteristieke kolonies uit de vijf schalen voor biochemische bevestiging

5.4.3 BIOCHEMISCHE BEVESTIGINGSTEST(EN)

Voor de identificatie kan een commerciële biochemische kit worden gebruikt. De interpretatie van de resultaten van een identificatiekit gebeurt volgens de daarbij horende handleiding. Zoniet worden één van de volgende methodes gebruikt.

5.4.3.1 BEVESTIGINGSTECHNIEK MET HET LS MEDIUM

Inoculatie en incubatie

- inoculeer elk van de geselecteerde kolonies met een entnaald in vloeibaar TGM
- anaërobe incubatie bij 36°C gedurende 18-24u
- pipetteer na incubatie 5 druppels TGM cultuur in LS medium
- incubatie in een waterbad van 46°C gedurende 18-24u

Interpretatie

- onderzoek elke tube LS medium op gasproductie en een op zwarte verkleuring van het medium door ijzersulfiet precipitatie. Tubes met Durham buisjes die meer dan ¼ met gas gevuld zijn en waarin een zwart precipitaat voorkomt, worden als positief beschouwd
- bij twijfel, indien in een zwarte LS tube een Durham buisje met minder dan ¼ gevuld is, pipetteer onmiddellijk 5 druppels LS cultuur in een nieuwe LS tube
- incubatie in een waterbad van 46°C gedurende 18-24u
- onderzoek deze tube(s) zoals hierboven vermeld

Besluit

Bacteriën die zwarte kolonies geeft op SC medium en die een positieve bevestiging geven in LS medium worden als *Clostridium perfringens* beschouwd. In elk andere geval is het resultaat negatief.

5.4.3.2 BEVESTIGINGSTECHNIEK MET DE LGM EN NMM MEDIA

Deze bevestigingstechniek vereist goed geïsoleerde kolonies. Is dit niet het geval :

- inoculeer 5 geselecteerde kolonies met een entnaald in vloeibaar TGM
- anaërobe incubatie bij 36°C gedurende 18-24u
- strijk de kolonies op petrischalen SC agar medium
- agar overgieten met een tweede laag (± 10ml) vloeibaar SC medium
- anaërobe incubatie bij 36°C gedurende 18-24u

Juist vóór het gebruik van NMM en LGM de tubes in een kokend waterbad brengen gedurende 15 min en snel afkoelen.

Inoculatie en aflezen van NMM

- ent 5 tubes NMM via steekenting met lange rechte entnaald
- anaërobe incubatie bij 36°C gedurende 18-24u
- interpreteer: voor motiliteit moet diffuse of geen diffuse groei langs de entlijn geëvalueerd worden (negatief voor *Clostridium perfringens*).
- pipetteer en meng de nodige en gelijke volumes NIT A en NIT B juist voor de test
- voeg 0,5 ml van het mengsel aan elke NMM tube
- interpreteer de rode kleur als nitriet vorming door reductie van nitraat (positief voor *Clostridium perfringens*).
- indien geen rode kleurvorming binnen 15 min: voeg een kleine hoeveelheid zink poeder toe en laat staan gedurende 10 min

- indien wel rode kleurvorming betekent dat nitraat niet gereduceerd is en de test is negatief.

Inoculatie en aflezen van LGM

- ent 5 tubes LGM via enting met entnaald
- anaërobe incubatie bij 36°C gedurende 18-24u
- Interpreteer de kleur van het medium: indien het medium geel is en er gasvorming is betekent dit vorming van zuur door lactosefermentatie (positief voor *Clostridium perfringens*)
- koel de tubes af gedurende 1 uur in een koelkast en controleer op gelatine vervloeiing (positief voor *Clostridium perfringens*).
- indien negatief: incubeer overnacht in de koelkast en controleer opnieuw op gelatine vervloeiing

Besluit

Zwarte kolonies op SC medium, niet motiel, met reductie van nitraat tot nitriet, productie van zuur en gas uit lactose en vervloeiing van gelatine binnen 48 uur zijn *Clostridium perfringens*. Kulturen die slecht een lichte roze reactie van nitriet geven moeten geëlimineerd worden, daar *Clostridium perfringens* altijd een intense en onmiddellijke reactie geeft.

5.4.4 BEREKENING VAN HET RESULTAAT (ZIE ISO 7218:2007/AMD. 1:2013)

Sommeer de aantallen presumptieve kolonies van de vijf petrischalen (= C).

Bereken het aantal *Clostridium perfringens* a in 1 gram monster:

$$a = b/A \times 2 \times C$$

met b het aantal geconfirmeerde kolonies
en A het aantal geïnoculeerde kolonies ter bevestiging (=5).

5.5 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Het aantal *Clostridium perfringens* wordt uitgedrukt als aantal kve in 1 g monster.

Indien telkens per plaat meer dan 150 kve als *Clostridium perfringens* zijn bevestigd, wordt het aantal *Clostridium perfringens* gerapporteerd >750 kve/g monster.

Indien *Clostridium perfringens* afwezig is, wordt <1 kve/g monster gerapporteerd.

In het analyseverslag wordt eveneens de gebruikte methode vermeld of wordt ernaar verwezen.

De datum en uur van monsternamen en datum en startuur van analyse dienen op het analyseverslag vermeld te worden.

5.6 IDENTIFICATIE VAN *ENTEROBACTERIACEAE*, *SALMONELLA*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. of *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 die door VITO dient goedgekeurd te worden.

6 REFERENTIES

- NBN EN ISO 7218:2007/Amd 1:2013 (Corrected version 2014-04-15) Bacteriology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for bacteriological examinations
- ISO 6887-1:2017 Bacteriology of the food chain -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for bacteriological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
- ISO 6887-4:2017 Bacteriology of the food chain -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for bacteriological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products
- ISO 21528-2:2017 Bacteriology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* -- Part 2: Colony-count technique
- ISO 6579-1:2017 Bacteriology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- Ter informatie: ISO/CD 15213-2 (under development) Bacteriology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. -- Part 2: Enumeration of *Clostridium perfringens* by colony-count technique
- ISO 7937:2004 Bacteriology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* -- Colony-count technique.