

Bestämning och identifiering av bakterien *Clostridium perfringens*. Koloniräkningsteknik.

1 Metodreferenser och avvikelser

ISO 7937:2004

(SC 37 °C/20 h ingjutning, nitrat-motilitet-agar 37 °C/24 h och laktos-gelatin-agar 37 °C/48 h eller API 20A/API Rapid ID 32A)

- 1) Av typiska kolonier odlas alltid renodlingar på blodagar för konfirmeringstester.
- 2) Rör med laktos-gelatin-agar avläses inte efter 24 h inkubering, utan endast efter 48 h inkubering.
- 3) Konfirmeringstesterna kan ersättas med Maldi-TOF identifiering.
- 4) Bestämningsgränsen räknas med en större odlingsvolym för bland annat prover av köttbenmjöl.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

För livsmedel, foder och organiska gödsel­fabrikat.

3 Definition(er)

Clostridium perfringens är en allmän matförgiftningsbakterie. *C. perfringens* förekommer allmänt i jordmånen och i tarmkanalen hos människor och djur.

C. perfringens är en orörlig, grampositiv, anaerob, sporbildande 4 – 6 µm lång stavbakterie. Bakterien växer i rätt stora (1 – 4 mm efter 24 timmars inkubering), runda, regelbundet formade och jämna kolonier. *C. perfringens* är i allmänhet hemolytiska, hydrolyserar gelatin, reducerar nitrat och producerar syra och gas av laktos.

4 Princip

Provet odlas med ingjutningsmetoden på SC-agar. På plattorna gjuts ännu ett ytskikt av samma agar. Plattorna inkuberas anaerobt vid 37 °C / 20 ± 2 h. De typiska kolonierna räknas och konfirmeras biokemiskt.

Bestämning och identifiering av bakterien Clostridium perfringens. Koloniräkningsteknik.

5 Eventuella felkällor

Det blir svårare att räkna antalet kolonier om kolonierna sprider sig på SC-agar och agaren därför svartnar.

Ett prov som ska analyseras får inte frysas, eftersom vegetativa *C. perfringens* bakterieceller inte klarar nerfrysning bra. Dock anländer av praktiska skäl en del prover av foder- och gödselindustri nedfrysta till laboratoriet.

Provet ska odlas utan dröjsmål eftersom *C. perfringens* är en anaerob bakterie och känslig för syre.

6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 223. Gramfärgning, tillsättning av reagenserna för testserien API Rapid 32A och avläsning av remsorna samt test av nitratreduktion görs i dragskåp/laminarskåp.

7 Utrustning och redskap

1. Mikrobiologisk basutrustning
2. Stomacher homogenisator och sterila Stomacher-400 påsar
3. Anaeroba kärl, gasgeneratorer och anaeroba indikatorer
4. Värmeskåp 37 ± 1 °C
5. Mikroskop
6. Dragskåp eller laminarskåp
7. Maldi-TOF instrument

8 Substrat och reagenser

1. Tryptos-sulfit-cykloserin-agar base (SFP), t.ex. à 200 ml
2. Perfringens selective supplement (TSC)
3. Peptonsaltlösning, pepton 0,1 %, salt 0,85 % (PEPSU), om inget annat föreskrivs i verksamhetsbeskrivning LAB 728
4. Nöt- eller fårblodagar på knotttriga plattor
5. Rör med nitrat-motilitet-agar
6. Rör med laktos-gelatin-agar
7. D-cykloserinlösning
8. 0,4 % sulfanilsyra i 15 % ättiksyra (NIT A-reagens)
9. 5-amino-2-naftalensulfonsyra (5-2-ANSA) i 15 % ättiksyra (NIT B-reagens)
10. Zinkpulver
11. Gram-färger
12. API 20A eller API Rapid ID 32A samt de reagenser som behövs (BioMérieux)
13. HCCA (cyano-4-hydroxikanelnsyra), portionsförpackad, Bruker Daltonik = Maldi-TOF matris

9 Kontrollstammar

1. *Clostridium perfringens* EELA 3
2. *Clostridium sordellii* EELA 422

10 Förbehandling av prov

Förbehandla vid behov provet i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 702.

11 Utförande

Provmängden är 10 g om inte annat överenskommes. Gör lämpliga spädningar i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 728.

Odlade parallella plattor av spädningarna. Pipettera 1 ml spädningar på plattorna. Pipettera vid behov 10^{-1} av lösningen, totalt 10 ml på fem tomma plattor i exempelvis 2 ml satser (pipetteringsvolymen kan vara 1 – 2,5 ml, plattornas antal väljs enligt pipetteringsvolymen). Sätt D-cykloserinlösning i tempererat SC-agar, slutkoncentration 40 mg/100 ml (dvs. 2 ml Oxoidin [100 mg/ml] supplement i 500 ml). Häll 10 – 15 ml SC-agar på plattorna. Blanda väl och låt stelna. Häll sedan på plattorna ett cirka 10 ml yt-skikt av samma agar och låt stelna.

Inkubera plattorna anaerobt vid 37 ± 1 °C / 20 ± 2 h.

Räkna antalet typiska, svarta kolonier på plattor där det växer högst 150 kolonier. De typiska kolonierna konfirmeras.

12 Konfirmeringstester (Maldi-TOF *ELLER* rörprover *ELLER* gramfärgning och API-testserie)

12.1 Val av kolonier

Konfirmera 5 kolonier på varje platta som du har räknat. Om mindre än 5 typiska kolonier växer på plattan, konfirmera alla kolonier.

Gör renodlingar på nöt- eller fårblodsagar av kolonierna för konfirmeringstester. Inkubera vid 37 ± 1 °C / 20 ± 2 h anaerobt.

MÄRK! Gör konfirmeringarna *ANTINGEN* enligt punkt 12.2, punkt 12.3 eller punkt 12.4.

12.2 Maldi-TOF identifiering

Konfirmera kolonierna genom en Maldi-tof körning med direkt ympning i enlighet med arbetsbeskrivning LAB 7085 som tre parallella provpunkter.

Bestämning och identifiering av bakterien Clostridium perfringens. Koloniräkningsteknik.

Om resultatet på stammens **alla** provpunkter visar "**no peaks found**", och körningen inte identifierar en enda provpunkt, ska du köra en ny direkt ympning eller göra en snabb extraktion av stammen på Maldi-plattans provpunkter: bakteriemassa + 1 ul 70 % FA -> torkning + 1 ul matris

Maldi-tof körningen kan också ge resultatet "**not reliable identification**". Score-värdet blir då lågt, mellan 0,000–1,699 och identifieringen lyckas inte. Det kan finnas två orsaker till det. Spektrumet är läsbart, men det finns ingen tillräcklig motsvarighet i biblioteket. Den andra möjligheten är att provpunkten är av dålig teknisk kvalitet. Om resultatet för alla provpunkter visar "**not reliable identification**" och körningen inte identifierar en enda provpunkt, ska du köra en ny direkt ympning eller göra en snabbextraktion av stammen: på provpunkten bakteriemassa + 1 ul 70 % FA -> torkning + 1 ul matris

Om resultaten efter snabbextraktionerna fortfarande visar "no peaks found" eller "not reliable identification", är stammen inte *Cl. perfringens*. Stammarna kan ytterligare konfirmeras i enlighet med punkterna 12.3 eller 12.4 beroende på den ansvariga forskarens bedömning.

ELLER:**12.3 Gramfärgning och API-testserie**

Gör gramfärgningar av odlingar som har växt hemolytiskt på blodskålar. Konfirmera grampositiva, sporbildande stavar med API 20 A eller API Rapid ID 32A test.

ELLER:**12.4 Rörtest**

Om substraten som används till konfirmeringstester inte har tillverkats samma dag, ska agarrören hettas upp i kokande vatten i cirka 15 minuter för att avlägsna syret. Kyl snabbt ner till inkuberingsstemperatur.

Inokulera teströren med renodlingar. Odlä en positiv (*C. perfringens* EELA 3) och negativ kontroll (icke inokulerat rör) för varje typ av konfirmeringstest/odlingssubstrat. Odlä dessutom *C. sordellii* EELA 422 som kontroll i nitrat-motilitet-agar.

12.4.1 Nitrat-motilitet-agar

Ympa med en ögla en koloni som stickodling på botten av röret. Använd som kontrollstammar *C. perfringens* EELA 3 och *C. sordellii* EELA 422.

Inkubera anaerobt vid 37 ± 1 °C / 24 h.

Tolkning av nitrat-motilitet-agar

Motilitet:

Bestämning och identifiering av bakterien Clostridium perfringens. Koloniräkningsteknik.

Rörlighet/orörlighet påvisas genom att man granskar tillväxten. Om tillväxt förekommer endast kring sticket, är stammen orörlig. Om stammen är rörlig, breder tillväxten ut sig jämnt över hela substratet.

Reduktion av nitratet:

Detta skede ska utföras i dragskåp eller laminarskåp!

Kombinera NIT A- och NIT B-reagens i ett skilt rör 1:1 (t.ex. 1 ml + 1 ml). Tillsätt i röret med nitrat motilitet-agar 0,2 – 0,5 ml kombinerad reagens. Röd färg inom 15 minuter påvisar ett positivt resultat. *C. perfringens* reducerar kraftigt nitrat till nitrit (i allmänhet en omedelbar reaktion, kraftigt röd). Odlingar som ger en svag reaktion (ljus röd) är inte *C. perfringens*-bakterier.

Om färgen inte har blivit röd inom 15 minuter, tillsätt en spateludd zinkpulver i röret och låt det stå i ytterligare 10 minuter. Om röd färg bildas efter det, har bakterien inte reducerat nitrat till nitrit och resultatet är negativt. Om färgen i röret är oförändrad, har bakterien reducerat nitrat till kvävgas och resultatet är positivt.

C. perfringens reducerar nitrat och är inte rörlig.

C. sordellii EELA 422 reducerar inte nitrat och är rörlig.

12.4.2 Laktos-gelatin-agar

Ympa med en ögla en koloni som stickodling på botten av röret.

Inkubera anaerobt vid 37 ± 1 °C / 48 h.

Tolkning av laktos-gelatin-agar

Laktos:

Fermentering av laktos ändrar substratets rödbruna färg till gul och åstadkommer gasbildning. Den positiva kontrollen ska vara tydligt gul och där ska finnas gas. Den negativa kontrollen ska vara oförändrad, det vill säga rödbrun utan gasbildning.

Gelatin:

Nedbrytning av gelatin konstateras genom att röret är 1 h i kylskåp (5 ± 3 °C) och där efter kontrollerar man hur substratet har stelnat. Om substratet förblir lösligt och inte stelnar, har gelatinet sönderdelats. En positiv kontroll ska vara tydligt flytande och en negativ ska vara stelad.

C. perfringens fermenterar laktos och löser upp gelatin.

12.5 Sammandrag av konfirmeringstesterna

Maldi-TOF resultat

Cl. perfringens

Bestämning och identifiering av bakterien *Clostridium perfringens*. Koloniräkningsteknik.

ELLER

Grampositiv och en profil typisk för bakterien *C. perfringens* i API 20 A eller API Rapid ID 32A tester.

ELLER

Konfirmeringstest	<i>C. perfringens</i>	<i>C. sordellii</i>
Motilitet	inte rörlig	rörlig
Nitratreduktion	+	-
Fermentering av laktos	+	
Sönderdelning av gelatin	+	

13 Resultat**13.1 Uträkning av resultaten**

Resultatet räknas enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703 på basis av procentandelen konfirmerade kolonier.

13.2 Rapportering av resultaten

Resultatet anges som antalet *C. perfringens*-bakterier per cfu/g eller cfu/ml prov enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703.

14 Validering av metoden

Resultaten av valideringarna av metoden (Schulten etc. 2001) presenteras i referensmetoden.

15 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input type="checkbox"/>
Officiell metod	<input type="checkbox"/>
Referensmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

16 Metoder för kvalitetssäkring

Jämförande undersökningar mellan laboratorierna	<input checked="" type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input checked="" type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar i konfirmeringstester i provrör	<input checked="" type="checkbox"/>
Ympade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>

17 Referenser

*)ISO7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony count technique.

Schulten, S.M., Benschop, E., Nagelkerke, N.J.D., Mooijman, K.A. Validation of Microbiological Methods. Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937 (second edition, 1997). RIVM report 286555 002, Bilthoven, the Netherlands, 2001.

*)Bilaga till den ursprungliga metodbeskrivningen i rum B214.

18 Ändringar sedan föregående version

20.12.2017: Evira 3412/5 Till stycket om arbetssäkerhet har som alternativ till Maldi-TOF konfirmeringstester (anläggningar, reagenser, konfirmeringstester) lagts till testet av nitratreduktion i dragskåp/laminarskåp. Punkt 8 har kompletterats med supplement som läggs till bassubstratet. Punkten om konfirmeringstester har strukturerats. Bilaga 1, flödesschema för metoden har lagts till.
Anvisningen uppdaterades av: Satu Hakola

20.12.2017. Vid övergången till IMS verksamhetssystem började numreringen av versionerna om från början (v1). Teknisk uppdatering

22.5.2018 Vid övergången till IMS system börjar versionerna från början (v1). Teknisk uppdatering.