

MICROBIOLOGISCHE ANALYSES VAN EINDPRODUCTEN BIJ DE VERWERKING VAN DIERLIJK AFVAL

1 TOEPASSINGSGEBIED

De microbiologische analyses van de eindproducten bij de verwerking van dierlijk afval (laag- en hoogrisicomateriaal) omvatten de volgende procedures: monstername, monstervoorbereiding, bepaling van het aantal *Enterobacteriaceae*, detectie van *Salmonella* (aan- of afwezigheid in 25 gram dierlijk afval) en detectie van *Clostridium perfringens* (aan- of afwezigheid in 1 gram dierlijk afval). De microbiële analyses van deze eindproducten hebben tot doel na te gaan of de verwerking/hittebehandeling afdoende is uitgevoerd.

2 PRINCIPE

De hygiëne-eisen voor de eindproducten van eindproducten van dierlijk afval worden beschreven in art. 5.2.2.10.11 van Vlarem II.

De voormelde eisen van laag- en hoogrisicomateriaal worden met de hierna beschreven procedures gecontroleerd:

Laagrisicomateriaal (LRM) door middel van monstername, monstervoorbereiding, *Enterobacteriaceae* en *Salmonella*;

Hoogrisicomateriaal zie LRM + *Clostridium perfringens*.

3 MONSTERNAME (ISO 3100-1)

3.1 Materiaal

De glazen of plastic containers waarin de monsters worden aangebracht:

- zijn water- en vetproof, onoplosbaar, bestand tegen hoge temperatuur en niet-absorberend,
- hebben de gepaste afmetingen om telkens ± 200 g meel/droog materiaal of ± 200 ml vloeibare (vet) fractie te bevatten,
- hebben een veilige afsluiting.

Het volgend aantal containers moet voorzien worden:

- voor *Enterobacteriaceae* en *Salmonella*: 5 voor analyses + 5 voor tegenexpertise
- voor *Clostridium perfringens*: 1 voor analyses + 1 voor tegenexpertise
- een extra aantal containers als veiligheidsmarge.

De uitrusting (lepels, scheppen ed.) en containers zijn rein en steriel. Ze zijn steriel aangekocht of gesteriliseerd door

- natte sterilisatie 121°C, 20 min
- droge sterilisatie 180°C, 2 h
- met 96% ethanol te flamberen.

Al het nodige materiaal om hygiënisch te werken (handschoenen, reinigungsdoeken ed.) evenals het verzegelmateriaal en labels moeten voorhanden zijn.

Een koelbox is nodig voor het transport indien de monsters op voorhand werden genomen en in tussentijd koel werden bewaard.

3.2 Procedure

3.2.1 monsternemer

- de monsternemer is getraind voor de juiste uitvoering van de techniek
- er is geen interferentie van derden, wel assistentie onder eigen verantwoordelijkheid
- voorzorgen worden genomen om contaminatie te vermijden zowel bij de monsterneming (handen wassen) als bij de verzending.

3.2.2 monsternameverslag, verzegeling en labels

Bij de monstername wordt een monsternameverslag opgesteld en worden de monsters verzegeld en voorzien van de nodig labels.

Vermeldingen in het monsternameverslag:

- naam van de monsternemer
- naam van de betrokken partijen
- plaats, datum, punt en tijd van monstername
- aard en oorsprong van het lot
- hoeveelheid en aantal monsters van het lot
- lotkenmerk en -nummer
- transportwijze
- manier van monstername
- aanduiding van verzegeling van de monsters
- plaats waarheen de monsters moeten worden verstuurd
- relevante omstandigheden die de monstername hebben beïnvloed:
colli, omgevingsomstandigheden, specifieke informatie betreffende de materiaalstromen waarvan monsters worden genomen.

Labels en verzegeling:

Elk labomonster is verzegeld en voorzien van een label met de volgende vermeldingen:

- aard en oorsprong van het lot
- hoeveelheid en aantal eenheden van het lot
- plaats en datum van de monstername
- nummer en kenmerk van de loten waarvan monsters zijn genomen.

3.2.3 aantal monsters

Op laagrisicomateriaal worden *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* geanalyseerd en op hoogrisicomateriaal worden *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* en *Clostridium perfringens* bepalingen uitgevoerd.

De hoeveelheid monster dient voldoende groot te zijn om de vereiste analyses minstens twee maal te kunnen doen, alsook om nog een tegenanalyse uit te kunnen voeren.

Om de evaluatie van de voorwaarden opgesteld in Vlarem II mogelijk te maken, wordt van elke stroom geproduceerde eindproducten dierlijk afval het volgende aantal monsters genomen:

- voor de *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* analyses twee reeksen monsters van:
 - vijf deelmonsters van ± 200 g. Indien het mogelijk en relevant is om op verschillende plaatsen monsters te nemen (bvb. bij een bulkvoorraad) wordt dit gedaan.
 - Indien het om een afvalstroom gaat komende uit één punt, mogen vijf deelmonsters van ± 200 g van of één monster van ± 1000 g genomen worden; deze laatste wordt dan in het laboratorium ingedeeld in vijf deelmonsters.

- voor de *Clostridium perfringens* analyses twee reeksen monsters van: één monster van ± 200 g/200 ml aan de afvoer van de warmtebehandeling.

3.2.4 transport, ontvangst en stockage

Het transport gebeurt:

- zo snel mogelijk na de monstername
- met behoud van bewaartemperatuur (gekoelde monsters bewaren bij 4°C in het geval monsters reeds op voorhand werden genomen en koel gestockeerd; transport in een koelbox)
- van zonlicht beschermd.

Bij aankomst moeten de monsters onbeschadigd en verzegeld zijn.

Eisen bij ontvangst en stockage:

- monsternameverslag en label moeten aanwezig zijn
- noteren van:
 - datum van ontvangst
 - hoedanigheid en temperatuur
 - soort analyses
 - monster bestaande uit deelmonsters
- een vers monster wordt gestockeerd bij 2 - 8°C indien de analyses binnen de 24 h plaatsvinden. Indien het monster niet binnen de 24 h wordt geanalyseerd: onmiddellijk stockeren bij -20°C (duur van vriesstockage noteren)
- een monster in een beschadigde verpakking wordt overgebracht in een andere onbeschadigde steriele verpakking voor stockage
- elk monster na analyse in de diepvriezer bewaren gedurende 3 maanden.

4 MONSTERVOORBEREIDING (ISO 3100-2)

4.1 Materiaal en uitrusting

- Er wordt gewerkt in een propere en tochtvrije werkruimte bestemd voor bacteriologisch onderzoek. De werktafel wordt voor en na gebruik ontsmet. Een laminaire flow kast moet voorhanden zijn.
- 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°C , 20 min
 - droge sterilisatie 180°C, 2 h
 - met 96% ethanol te flamberen.
- Een weegtoestel is aanwezig en laat toe om monsters aseptisch af te wegen.
- Er is een monsterhomogenisator (een "Stomacher" of een blender). Het homogeniseren gebeurt in plastic zakken of andere steriele recipiënten. De recipiënten moeten een zodanige capaciteit hebben dat het monster met het vereiste volume dilutievloeistof behoorlijk kan vermengd worden (doorgaans een inhoud van 400 ml).

4.2 Procedure

- Na het openen van de verpakking worden de deelmonsters aseptisch afgewogen; hierbij wordt maximale homogeniteit nagestreefd.
- In het recipiënt waarin de homogenisatie gebeurt worden in functie van de microbiologische analyse de volgende hoeveelheid afgewogen:
 - voor *Enterobacteriaceae* 5 maal 10 g materiaal
 - voor *Salmonella* 5 maal 25 g materiaal
 - voor *Clostridium perfringens* in duplo 1 g (grensreactie) of 10 g.
- De analyses worden zo veel mogelijk zonder onderbrekingen uitgevoerd; zoniet worden de monsters steeds gestockeerd in de koelkast.

5 ANALYSE VAN ENTEROBACTERIACEAE (ISO 7402)

5.1 Directe telling in een selectief medium via de gietplaatmethode ("colony count"-methode)

5.1.1 media en uitrusting

- Stomacher
- Violet Red Bile Dextrose/Glucose VRBD(G) agar
- fysiologisch peptoon (gebufferd peptoon) water of gelijkwaardig medium
- oxidase reagens
- glucose medium.

5.1.2 werkwijze voor 5 deelmonsters

- aan 10 g homogeen afgewogen deelmonster dierlijk afval in een stomacherzak 90 ml gebufferd peptoon water aseptisch toevoegen
- indien de monsters scherpe fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-) zak, vóór het homogenisatieproces
- homogenisatie in de homogenisator gedurende 1 - 2 min.
- in tienvoud : 1 ml van het te analyseren monsterextract (eventueel de eerste decimale verdunning) overbrengen in een lege en steriele petriplaat
- petrischalen vullen met ± 15 ml vloeibaar agar medium bewaard bij 47 - 48°C

- entmateriaal en medium mengen door de petriplaten een achttal maal te schudden d.m.v. het uitvoeren van een achtvormige beweging
- platen overgieten met een tweede laagje vloeibaar medium
- platen laten stollen en drogen in laminaire flow en incuberen bij 37°C gedurende 24 h
- de dieprode tot kleurloze, soms slijmerige kolonies (met of zonder dieprode halo-precipitatie) zijn presumptieve *Enterobacteriaceae* en worden geteld.

5.2 Selectie en biochemische bevestiging

5.2.1 werkwijze

- subkultuur starten, uitgaande van een vijftal geselecteerde kolonies (presumptieve *Enterobacteriaceae*) op een selectief medium zoals VRBG of glucose agar
- elke subkultuur bevestigen aan de hand van :
 - oxidase reactie (cytochrom) → *Enterobacteriaceae* : afwezigheid van oxidase
 - bij twijfelgevallen fermentatietest van glucose in een glucose medium testen
→ *Enterobacteriaceae* : glucose-fermentatie positief met verkleuring van het medium naar geel en meestal gasvorming

5.2.2 berekening resultaten

Bereken de % verhouding van het aantal getelde presumptieve kolonies per verdunning aan de hand van de geconfirmeerde tellingen (# / 5).

5.3 Rapportering

Voor elk van de vijf deelmonsters het aantal *Enterobacteriaceae* per g monster uitdrukken als:

- een getal tussen 1,0 en $9,9 \times 10^x$, met confidentie-intervallen bij waarden < 15
- <10 micro-org./g, indien micro-organismen afwezig zijn

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

5.4 Kwaliteitscontrole

- Analyses regelmatig in duplo uitvoeren.
- Vergelijkende analyses laten uitvoeren door verschillende personen.
- Gebruik van blancomonsters en van een referentiestam voor de kwaliteitscontrole van de media. Hierbij wordt een intern controlemonster bereid met een referentiestam en behandeld als elk ander onbekend monster.
- Deelname aan derdelijnscontrole.

6 DETECTIE VAN *SALMONELLA* (NEN-EN 12824)

6.1 Pre-aanrijking van *Salmonella* in niet selectief vloeibaar medium

6.1.1 media en uitrusting

- Stomacher
- Voor de analyse van melen: fysiologisch peptoon (gebufferd peptoon) water of gelijkwaardig medium
- Voor de analyse van vetten: fysiologisch peptoon (gebufferd peptoon) water + 5 g sorbitol monoleate zoals Tween 80®.

6.1.2 werkwijze voor 5 deelmonsters

- aan 25 g homogeen afgewogen meelmonster in een stomacherzak 225 ml gebufferd peptoon water aseptisch toevoegen (1/10 massa/volume verhouding)
- aan 25 g homogeen afgewogen vetmonster in een stomacherzak 225 ml gebufferd peptoon water + 5 g Tween 80® aseptisch toevoegen (1/10 massa/volume verhouding)
- indien monsters van melen scherpe fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-) zak, vóór het homogenisatieproces
- homogenisatie in de homogenisator gedurende 1 - 2 min
- het monster wordt afgesloten met een clips of tape
- de zak wordt geïncubeerd bij 37°C gedurende 16 - 20 h.

6.2 Aanrijking van *Salmonella* in twee selectieve media na de pre-aanrijking

6.2.1 media

- Rappaport-Vassiliadis bouillon of gelijkwaardig
- Selenite (Cystine) (F) (enrichment) bouillon of gelijkwaardig

6.2.2 werkwijze (met de media Rappaport-Vassiliadis bouillon en Selenite cystine bouillon)

Uit de stomacherzak wordt van de bovenstaande gebufferd peptoon suspensie :

- 0,1 ml in 10 ml Rappaport-Vassiliadis medium geïnculeerd (incubatie bij 42°C gedurende 18 - 24 h)
- 10 ml in 100 ml selenite cystine medium geïnculeerd (incubatie bij 37°C gedurende 24 h en indien nodig een supplementaire 24 h).

6.3 Isolatie van presumptieve *Salmonella* na selectieve aanrijking

6.3.1 media

Om zo volledig mogelijk alle stammen van het geslacht *Salmonella* te kunnen selecteren moeten minstens twee selectieve '*Salmonella*-media' gebruikt worden. De twee (of drie) media moeten gekozen worden in functie van de mogelijk 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.

Mogelijk media:

- Brilliant green (phenol red lactose sucrose) agar/BPLS
- Xylose lysine desoxycholaat XLD of XLT4 of gelijkwaardig
- Bismuth sulfite agar/ Wilson Blair
- Lysine iron agar
- Salmonella agar
- Diassalm ® of MSRV medium of gelijkwaardig
- Rambach ® agar of SMID ® agar of gelijkwaardig
- Salmonella chromogenic agar
- Compass salmonella medium
- Hektoen Enteric agar
- Mannitol lysine crystalviolet briljantgroen MLCB agar
- Desoxycholate citrate lactose sucrose agar
- gelijkwaardig medium

6.3.2 werkwijze (met de media BPLS, XLD, chromogeen medium)

- Indien mogelijk worden extra grote schalen geënt. Zoniet worden twee gewone schalen achtereenvolgens geënt door gebruik te maken van eenzelfde entnaald. Tussen het enten van de eerste en de tweede schaal wordt de entnaald niet geflambeerd.
- met een platinumnaald vanuit de vloeibare cultuur in Rappaport-Vassiliadis en Selenite cystine bouillon - waar groei waarneembaar is - (zowel na 24 h als na 48 h indien uitgevoerd) telkens één extra grote schaal of twee gewone petrischalen van de selectieve media BPLS, XLD en chromogeen medium enten.
- incubatie van de schalen bij 37°C gedurende 48 h met controle na 20-24 h op de aanwezigheid van typische *Salmonella* kolonies:
 - op BPLS: roze kolonies op een rood verkleurd medium
 - op XLD: kolonies hebben dezelfde kleur als het medium, meestal met een zwart centrum
 - op chromogeen medium: typisch gekleurde kolonies (afhankelijk van het merk)
- op de presumptieve *Salmonella* worden confirmatietesten uitgevoerd.

6.4 Confirmatietesten en identificatie

6.4.1 voorbereiding bevestigingstesten: zuivering

6.4.1.1. media

- nutriënt agar

6.4.1.2. werkwijze

- voor de bevestigingstesten worden uit de selectieve media een vijftal typische of verdachte kolonies opgepikt en gestreken op een nutriënt agar plaat
- incubatie bij 37°C gedurende 18-24 h.

6.4.2 biochemische confirmatietest

6.4.2.1. media en werkwijze

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

- Triple Sugar Iron agar TSI (glucose + zuur + gas positief, zwavelwaterstofvorming positief, lactose negatief 99 % en saccharose negatief)
- Voges-Proskauer VP reactie (negatief)
- Lysine-decarboxylatie medium (positief 95 %; *S. paratyphi* negatief)
- Ureum agar (urease negatief)
- ONPG reactie/ β -galactosidase (negatief 98,5 %)
- indoltest (negatief)
- oxydase (negatief)

Deze biochemische testen kunnen eveneens uitgevoerd worden met een kit zoals API, Rapidec, Enterotube, Minitex, Pathotec, Micro-ID, BBL Crystal of gelijkaardig, en eventueel met de hierboven vernoemde testen aangevuld worden.

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

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

6.4.3 serologische confirmatietest

6.4.3.1. media

- Polyvalent H,O,Vi antisera voor *Salmonella* of *Salmonella* Latex Agglutinatie Test
- gelijkwaardige test

6.4.3.2. werkwijze

- Op elk te onderzoeken zuivere kolonie wordt de agglutinatie test uitgevoerd voor de detectie van de aanwezigheid van *Salmonella* O-, en/of Vi- en/of H-antigenen. De agglutinatie wordt vergeleken met een positieve en negatieve controle.
- Agglutinatie wordt positief gerapporteerd.

6.5 Rapportering

Voor elk van de vijf deelmonsters wordt in functie van de resultaten en interpretatie de aanwezigheid of afwezigheid van *Salmonella* uitgedrukt in 25 g monster.

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

6.6. Kwaliteitscontrole

- Analyses regelmatig in duplo uitvoeren.
- Vergelijkende analyses laten uitvoeren door verschillende personen.

- Gebruik van blacomonsters en van een referentiestam voor de kwaliteitscontrole van de media. Hierbij wordt een intern controlemonster bereid met een referentie-*Salmonella*-stam en behandeld als elk ander onbekend monster.
- Deelname aan derdelijnscontrole.

7. DETECTIE VAN *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* (NBN EN 13401)

Belangrijke opmerking: voorafgaand aan de analyse van *Clostridium perfringens* wordt geen pasteurisatiestap uitgevoerd.

De analyse van *C. perfringens* wordt aangewend als controle op het sterilisatieproces. Opdat dit sterilisatieproces effectief zou zijn moet het de aanwezige *C. perfringens* sporen volledig afdoden. De aanwezigheid van *C. perfringens* in monsters genomen direct na de hitte-inactivatie kan dus als een indicatie voor een mislukte sterilisatie beschouwd worden. Gezien de herkomst van de monsters en het doel van de analyse is een pasteurisatiestap voorafgaande aan de bacteriologische analyse niet aangewezen (vegetatieve cellen van *C. perfringens* komen normaal niet voor in dierlijk afval).

Er kunnen twee analysemethoden gebruikt worden: de grensreactie of de gietplaatmethode. Deze laatste methode laat ook kwantitatieve meting toe.

7.1. Aanrijking en isolatie volgens methode 1: grensreactie

7.1.1. aanrijking

7.1.1.1. media en uitrusting

systeem voor anaërobe incubatie (anaërobe jar of zakjes) en één van de volgende media:

- (Fluid) Thioglycollaat medium (enriched) (USP)
- (Differential) Reinforced Clostridial medium
- Cooked Meat medium
- ophopingsmedium volgens Mossel
- gelijkwaardig medium
- het antibioticum D-cycloserine wordt dikwijls toegevoegd om de groei van vrijwel alle facultatief anaërobe bacteriën en D-streptokokken te beletten.

7.1.1.2. werkwijze

- in duplo 1 g homogeen dierlijk afval aseptisch afwegen en aanrijken in 10 ml van een ophopingsmedium
- anaëroob incuberen bij 37 of 46 °C gedurende 24 tot 48 uur (temperatuur van de incubatie in functie van het medium).

Indien -afhankelijk van het gebruikte medium- na incubatie zwarting ontstaat (FeS) of groei met gasvorming gaat men over tot isolatie via gietplaat met een selectief *Clostridium perfringens* medium.

7.1.2. isolatiestap vanuit het ophopingsmedium

7.1.2.1. media en uitrusting

- Stomacher
- fysiologisch peptoon (gebufferd peptoon) water of gelijkwaardig medium
- systeem voor anaërobe incubatie (anaërobe jar of zakjes) en één van de volgende media:
 - Sulfiet cycloserine agar
 - Perfringens (Selective) agar (base)/SPS agar
 - TSN agar
 - SFP agar base + supplementen
 - (Reinforced) (Differential) Clostridial agar
 - Tryptose Sulfiet Cycloserine (basis) agar (TSC) met eventueel Fluorocult TSC supplement
 - gelijkwaardig medium
- eventueel gesupplementeerd met eierdooier, cycloserine,...

7.1.2.2. werkwijze

- breng het volume van 1 ml en indien nodig decimale verdunningen van het ophopingsmedium in een lege petrischaal
- kies de decimale verdunning zodanig dat geïsoleerde kolonies worden verkregen
- petrischalen vullen met 10 - 15ml vloeibaar medium
- entmateriaal en medium mengen door de petriplaten een achttal maal te schudden d.m.v. het uitvoeren van een achtvormige beweging
- platen laten stollen en met een bijkomende 10 ml vloeibaar medium overgieten
- platen laten drogen (laminaire flow) en incuberen in een anaërobe container bij 37/46°C gedurende ± 24 h. (temperatuur van de incubatie in functie van het medium).
- waarnemen van zwarte kolonies (presumptieve *C. perfringens*).

De zwarting ontstaat in aanwezigheid van de ijzer(III)ammoniumcitraat indicator bij de sulfietreductie. Bij gebruik van Fluorocult TSC agar wijst de fluorescentie bij UV op alkalisch en zure fosfatase. De zure fosfatase is een heel specifieke indicator voor *C. perfringens*.

De presumptieve *C. perfringens* worden verder geanalyseerd door bevestigingstesten beschreven in punt 7.3.

7.2 Isolatie volgens methode 2: gietplaatmethode

7.2.1. media en uitrusting

- Stomacher
- fysiologisch peptoon (gebufferd peptoon) water of gelijkwaardig medium
- systeem voor anaërobe incubatie (anaërobe jar of zakjes) en één van de volgende media:
 - Sulfiet cycloserine agar
 - Perfringens (Selective) agar (base)/SPS agar
 - TSN agar
 - SFP agar base + supplementen
 - (Reinforced) (Differential) Clostridial agar
 - Tryptose Sulfiet Cycloserine (basis) agar (TSC) met eventueel Fluorocult TSC supplement

- gelijkwaardig medium
- eventueel gesupplementeerd met eierdooier, cycloserine,...

7.2.2. werkwijze

- aan 10 g homogeen afgewogen deelmonster dierlijk afval in een stomacherzak 90 ml gebufferd peptoon water aseptisch toevoegen (1/10 massa/volume verhouding)
- indien de monsters scherpe fragmenten bevatten die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-) zak, vóór het homogenisatieproces
- homogenisatie in de homogenisator gedurende 1 - 2 min
- tien maal 1 ml van het monsterextract overbrengen in lege en steriele petrischalen
- indien nodig maak een decimale verdunning zodanig dat het aantal kolonies beneden de 150 ligt
- petrischalen vullen met 10 - 15ml vloeibaar medium
- entmateriaal en medium mengen door de petriplaten een achttal maal te schudden d.m.v. het uitvoeren van een achtvormige beweging
- platen laten stollen en met een bijkomende 10 ml vloeibaar medium overgieten
- platen laten stollen en drogen (laminaire flow) en incuberen in een anäerobe container bij 37°C gedurende ±24 h
- tellen van het aantal zwarte kolonies (presumptieve *C. perfringens*).

De zwarting ontstaat in aanwezigheid van de ijzer(III)ammoniumcitraat indicator bij de sulfietreductie. Bij gebruik van Fluorocult TSC agar wijst de fluorescentie bij UV op alkalisch en zure fosfatase. De zure fosfatase is een heel specifieke indicator voor *C. perfringens*.

De presumptieve *C. perfringens* worden verder geanalyseerd door bevestigingstesten beschreven in punt 7.3.

7.3. Bevestiging methode 1 en 2

Vijf presumptieve *C. perfringens* op selectieve plaat vanuit de grensreactie of vanuit de gietplaatmethode worden onderworpen aan bevestigingstesten.

7.3.1. voorbereiding bevestigingstesten

7.3.1.1. media en werkwijze

- systeem voor anaërobe incubatie (anaërobe jar of zakjes) en één van de volgende media:
 - Anaerobic (Blood) agar (base)
 - Schaedler bloed agar
 - Sulfiet cycloserine agar
 - TSC agar

Vijf (of indien minder alle) goed geïsoleerde karakteristieke kolonies worden gezuiverd op een selectieve bloed – of SC plaat (incubatie in een anaërobe container gedurende 18 - 24 h bij 37°C) die nodig zijn voor de biochemische identificatie. De zuivering kan herhaald worden tot men goed geïsoleerde karakteristieke kolonies heeft verkregen.

Vertrekkend van zuivere kolonies worden de bevestigingstesten uitgevoerd.

7.3.2. bevestigingstesten

7.3.2.1. media en werkwijze

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

- beweeglijkheid (negatief voor *Clostridium perfringens*)
- reductie van nitraat tot nitriet (positief voor *Clostridium perfringens*)
→ in beweeglijkheids (motility)-en nitraat medium
- lactosedissimilatie met vorming van zuur en gas (positief voor *Clostridium perfringens*)
- vervloeiing van gelatine binnen 48 h (positief voor *Clostridium perfringens*)
→ in gelatine-en lactose-(aantasting) medium
- groei in SC medium (vorming van zwarte kolonies voor *Clostridium perfringens*)

De bevestiging van *Clostridium perfringens* kan eveneens uitgevoerd worden met een API 20A of met een gelijkwaardige kit. De API 20A-kit bundelt onder andere de bovenvermelde bevestigingsreacties; hierbij dient een microscopisch onderzoek uitgevoerd te worden op de koloniesuspensie (morfologie -staaf-, gramkleuring en beweeglijkheid). De interpretatie van de resultaten van een identificatiekit gebeurt volgens de daarbijhorende handleiding.

7.4. Rapportering

De aan- of afwezigheid van *Clostridium perfringens* wordt uitgedrukt per gram monster. In het rapport wordt eveneens de gebruikte methode vermeld of er wordt ernaar verwezen.

7.5. Kwaliteitscontrole

- Analyses regelmatig in duplo uitvoeren.
- Vergelijkende analyses laten uitvoeren door verschillende personen.
- Gebruik van blancomonsters en van een referentiestam voor de kwaliteitscontrole van de media.

8. REFERENTIES

- Mikrobiologisch Onderzoek van Levensmiddelen, prof. dr. D.A.A. Mossel, Mw. ir. W.F. Jacobs-Reitsma. Uitgeverij P.C. Noordervliet B.V. Zeist; 3^e uitgave 1990.
- ISO 3100-1, 1991; Meat and meat products - sampling and preparation of test samples part 1: sampling
- ISO 3100-2, 1988; Meat and meat products - sampling and preparation of test samples part 2: preparation of test samples for microbiological examination
- [ISO 6887-1, 1999](#); Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
- ISO 7218, 1996; Microbiology of food and animal feeding stuffs -- general rules for microbiological examinations
- ISO 7402, 1993; Microbiology - general guidance for the enumeration of *Enterobacteriaceae* without resuscitation- MPN technique and

- ISO 8523, 1991; Microbiology - general guidance for the detection of *Enterobacteriaceae* with pre-enrichment
- NEN-EN 12824, 1997; Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the detection of *Salmonella* (ISO 6579, 1993 modified)
- NBN EN 13401, 1999; Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for enumeration of *Clostridium perfringens* – colony count technique (ISO 7937: 1997 modified).