



*Verwerkte mest – Detectie van Clostridium  
Perfringens*



## 1 WERKWIJZE

Detectie van *Clostridium perfringens* gebeurt door:

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

## 2 MEDIA EN MATERIAAL

- a. Gebufferd pepton water BPW
- b. (T)SC agar
- c. Voor de bevestigingstest:
  1. Fluid Thioglycolaat Medium TGM
  2. Lactose sulfiet medium LS (met Durham buisje) of een commerciële biochemische kit
- d. Autoclaf; incubator van  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , waterbad op  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , waterbad op  $46^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  geschikt glaswerk, pipetten, pH-meter, petrischalen, entnaald, anaërobe jar en reagentia
- e. Stomacher toestel of gelijkwaardige homogenisator

## 3 PROCEDURE

### 3.1 Initieel suspenderen van een monster in gebufferd pepton water

- a. aan 10 g homogeen afgewogen monster in een stomacherzak 90 ml gebufferd pepton water aseptisch toevoegen (1/10 massa/volume verhouding)
- b. Als het monster fragmenten bevat die de stomacherzak kunnen beschadigen, wordt het geheel gehuld in een extra (stomacher-) zak, vóór het homogenisatieproces.
- c. homogenisatie in de homogenisator gedurende 2 minuten
- d. uit de stomacherzak wordt van de gebufferd pepton suspensie in tienvoud  $1 \text{ ml}^{10}$  van het te analyseren monsterextract overgebracht in tien lege en steriele petrischalen (10 ml suspensie is representatief voor 1 gram monster). De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het gieten van SC moet zo kort mogelijk worden gehouden en mag de 15 minuten niet overschrijden
- e. petrischalen vullen met  $\pm 15 \text{ ml}$  vloeibaar SC agar medium bewaard bij  $44 - 47^{\circ}\text{C}$  in een waterbad
- f. entmateriaal en medium mengen door draaiende bewegingen met de schalen
- g. agar laten stollen en nadien overgieten met een tweede laag vloeibaar medium ( $\pm 10 \text{ ml}$ )
- h. agar laten stollen en drogen in laminaire flow en geïnverteerd anaëroob incuberen bij  $37^{\circ}\text{C}$  gedurende 20 uur  $\pm 2$  uur

---

<sup>10</sup> Vijf maal 2ml gebufferd pepton suspensie analyseren is eveneens uitvoerbaar. Het grote nadeel bij het analyseren van 2ml porties van een natte mestmatrix is dat de donkere suspensie de transparantie van de agarlaag heel sterk beperkt, zodat telling van presumptieve kolonies kan gehinderd worden.

### 3.2 Telling en selectie van kolonies voor bevestiging

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

### 3.3 Biochemische bevestigingstest

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 wordt de volgende methode gebruikt.

### 3.4 Inoculatie en incubatie

- a. inoculeer elk van de geselecteerde kolonies met een entnaald in vloeibaar TGM
- b. anaërobe incubatie bij 37°C gedurende 18 uur - 24 uur
- c. pipetteer na incubatie 5 druppels TGM cultuur in LS medium
- d. incubatie in een waterbad van 46°C gedurende 18 uur - 24 uur

### 3.5 Interpretatie

- a. 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.
- b. bij twijfel, als 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.
- c. incubatie in een waterbad van 46°C gedurende 18 uur - 24 uur
- d. onderzoek die tube(s) zoals hierboven vermeld.

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.

### 3.6 Berekening van het resultaat (zie ISO 7218: Amd. 1)

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

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

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

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

## 4 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

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

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

Indien afwezig zijn wordt <1 kve/g monster gerapporteerd.

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

## 5 KWALITEITSCONTROLE

Inzetten van een blanco controle bij de selectieve media bij elke meetreeks.

Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia.

Validatie van de analysemethode op verschillende matrices (natte en ingedroogde mest): herhaalbaarheid testen. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een referentie-*Clostridium perfringens*-stam en behandeld als elk ander onbekend monster.

De juistheid afleiden uit ringtestresultaten.

## 6 REFERENTIES

- a. ISO 7218:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General rules for microbiological examinations
- b. ISO 7218:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General rules for microbiological examinations Amendment 1
- c. ISO 7937:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* -- Colony-count technique