

| | |
|-------------------------------|---|
| Stofnaam | Antibacteriële stoffen |
| Type methode | remmingstest |
| Te onderzoeken in | diervoeders, diervoedergrondstoffen, vlees, organen en vloeistoffen |
| Minimum bepaalbaarheids grens | zie bijlage 1 |
| Herhaalbaarheid | |
| Reproduceerbaarheid | |
| Categorie | D |
| Titel | Bepaling van antibacteriële activiteit met behulp van een 5-platen bioautografisch systeem. CCL, Veghel: SOP.nr. MB003, uitgiftedatum 22-02-1993. N.B. de genoemde werk- en mediumbladen zijn bijgevoegd |

1. Toepassing

Dit voorschrift beschrijft een methode, die algemeen bruikbaar is voor het aantonen en/of bepalen van antibacteriële activiteit in agrarische grondstoffen, mengvoeders, vlees, organen en vloeistoffen. Voor bacterieel sterk verontreinigde monsters is deze methode niet bruikbaar.

Aantoonbaarheidsgrenzen zijn genoemd in bijlage 1.

2. Definitie

Onder antibacteriële activiteit (uitgedrukt in mm remzone/remrand), wordt verstaan de aanwezigheid van een stof of stoffen in een monster, die in staat is (zijn) de groei van minstens één testorganisme te remmen.

3. Beginsel van de bepaling

Het monster wordt rechtstreeks of na bereiden van een geschikte oplossing geplaatst op de 5-platen van het bioautografisch systeem. De platen worden bij geschikte temperaturen resp. 30 en 37°C bebroed gedurende 18-24 uur. Bij aanwezigheid van antibacteriële activiteit worden remzones zichtbaar op één of meerdere platen.

Het patroon van remzones kan een eerste indicatie geven voor de identiteit van de aanwezige antibacteriële stof (zie bijlage 2).

4. Precisie

Niet van toepassing

5. Veiligheid

De mogelijkheid bestaat dat vanuit de monsters pathogene micro-organismen gekweekt worden. De werkvoorschriften voor FIN 1 dienen daarom in acht genomen te worden (zie "Aanbevelingen voor veilig microbiologisch werk", 2e druk, 1987).

6. Voedingsbodems, oplossingen

6.1 pepton fysiologische zoutoplossing (pfz); zie mediumblad 001

6.2 gebufferd peptonwater (BPW), zie mediumblad 005, afgevuld in porties van 9 ml.

6.3 plate count agar (PCA), Merck Art.nr. 5437, zie mediumblad 002

6.4 Standard II Nahragar (StIIN), Merck Art. nr. 7883, zie mediumblad 010

6.5 trimethoprim oplossing (TMP 50 µg/ml), Sigma T7883.

Los 5 mg trimethoprim op in 5 ml ethanol in een maatkolf van 100 ml en vul met water aan tot de maatstreep. Concentratie is 50 µg TMP/ml. Deze oplossing is gedurende maximaal 1 maand houdbaar bij 0-4°C.

- 6.6 natriumhydroxide oplossing (NaOH), 1 mol/liter
- 6.7 zoutzuuroplossing (HCl), 1 mol/liter.
- 6.8 Bacillus subtilis BGA sporensuspensie, zie werkblad 001
- 6.9 Micrococcus luteus ATCC 9341, 48 uur BPW cultuur, zie werkblad 002.
- 6.10 Tylosine stockoplossing (100 µg/ml). Los 10,0 mg tylosine (Tylosine base van Ely Lilly Research) op in 5 ml methanol in een maatkolf van 100 ml en vul met methanol/water opl. (1+1) aan tot de maatstreep. Concentratie is 100 µg/ml. Deze stockoplossing is gedurende maximaal 1 maand houdbaar bij 0-4°C.
- 6.10.1 Tylosine controleoplossing. Bereid de controleoplossing door vanuit de stockoplossing zoveel in een maatkolf van 100 ml te pipetteren dat na aanvullen met methanol/water (30+70) tot 100 ml een oplossing van $5,0 \pm 0,2$ µg/ml, gecorrigeerd voor de activiteit van de standaard, wordt verkregen.
- 6.11 Natriumsulfadimidine stockoplossing (100 µg/ml). Los 10,0 mg natriumsulfadimidine (van ACF) op in een maatkolf van 100 ml met methanol/water (1+1) en vul aan tot de maatstreep. Deze stockoplossing is gedurende maximaal 1 maand houdbaar bij 0-4°C.
- 6.11.1 Natriumsulfadimidine controle-oplossing. Bereid de controle-oplossing door vanuit de stockoplossing zoveel in een maatkolf van 100 ml te pipetteren dat na aanvullen met methanol/water (30+70) tot 100 ml een oplossing van $5,0 \pm 0,2$ µg/ml, gecorrigeerd voor de activiteit van de standaard, wordt verkregen.

De bovengenoemde media kunnen vervangen worden door artikelen van een andere leverancier, mits is aangetoond dat deze van dezelfde of betere kwaliteit zijn. Voor de bereiding wordt verwezen naar de betreffende voorschriftbladen.

7. Apparatuur en hulpmiddelen

- 7.1 nivelleertafel b.v. 3-poots Desaga Heidelberg.
- 7.2 waterpas.
- 7.3 schuifmaat met schaalverdeling op 0,1 mm of kleiner.
- 7.4 glasplaten 350 x 350 x 5 mm (l x b x d)*.
- 7.5 metalen raamwerk van r.v.s. 300 x 300 x 1 x 10 mm (l x b x d x h)*.
- 7.6 gaas van verzinkt metaal 330 x 330 x 1 mm (l x b x d) maaswijdte 5 mm*.
- 7.7 vochtabsorberend papier.

* Deze maten zijn niet bindend. Afhankelijk van het aantal monsters kunnen grotere of kleinere platen of b.v. petrischalen met vlakke bodem gebruikt worden. De dikte van de voedingsbodem moet 2,0 mm zijn na gieten van de platen.

7.8 broedstoven 30 en 37°C (nauwkeurigheid beter dan 1°C).

7.9 centrifuge, tafelmodel, b.v. Jouan CR312.

7.10 kurkboor, 9 mm doorsnede.

8. Voorbehandeling van de monsters

8.1 Mengvoeder/grondstoffen voor mengvoer.

Na malen (1 mm zeef) wordt een 10% suspensie gemaakt in methanol/water (1+1) door middel van 30 min. schudden. Bij direct onderzoek van 10% suspensie is een methanol/wateroplossing (3+7) i.p.v. (1+1) aan te bevelen. Doorverdunnen met methanol/water oplossing (3+7), afhankelijk van de verwachte concentratie.

8.2 Vloeibare producten.

Indien de vloeistoffen een pH hebben <6 of >8, dan moet deze bijgesteld worden met natriumhydroxide (6.6) of zoutzuuroplossing (6.7) tot pH >6 of <8. Daarna worden de oplossingen gecentrifugeerd (10 min. bij 3000 toeren/min/2000 g).

8.3 Vlees en organen

Vries de monsters in tot -20°C en laat voor de monstername, afhankelijk van de grootte van het stuk materiaal, het gedurende 1 à 2 uur liggen bij kamertemperatuur. Pons met een steriele kurkboor (doorsnede 9 mm) een cilinder uit het nog bevroren materiaal en snij met een steriel scalpelmes plakjes van ± 2 mm dikte af (Gartside techniek).

Indien de monsters vers aangeboden en direct onderzocht dienen te worden, dan kunnen meteen kleine stukjes uit het monster worden gesneden met een steriel mes. De stukjes dienen niet groter te zijn dan ca. 9 mm doorsnede.

9. Werkwijze (lit. 3, 5)

9.1 Bereiding diffusieagarplaten

9.1.1 Voorbewerking bereiding diffusieagarplaten.

Plaats een glasplaat (7.4) op een waterpas gestelde nivelleertafel (7.1). Leg vervolgens het metalen raamwerk (7.5) op de glasplaat. Veeg de bovenkant van de glasplaat inclusief raamwerk schoon met een katoenen swab gedrenkt in ethanol 96%. Flambeer nu de glasplaat. Na afkoelen van het metalen raamwerk wordt met behulp van een steriele pasteurpipet wat StINN agar (mediumblad 010) tussen het metalen raamwerk en de glasplaat gebracht. Laat stollen en controleer (visueel) op afdoende afsluiting.

9.1.2 Bacillus subtilis BGA plaat - pH6.

Stel de pH van tot ± 50°C afgekoelde Standard II Nähragar (StINN, mediumblad 010, 180 ml) zodanig in dat deze $6,0 \pm 0,1$ is. Voeg aseptisch 0,5 ml B.subtilis BGA sporensuspensie (werkblad 001) toe en meng.

Concentratie 10^4 - 10^5 sporen per ml voedingsbodem. Na enten en mengen wordt zo snel mogelijk uitgegoten. Voor het uitgieten van de beënte agar wordt de glasplaat vluchtig opgewarmd met een gasbrander, waarna de geënte agar gelijkmatig uitgegoten kan worden. Indien nodig kan de agar met behulp van

een steriele drigalskispatel verder over de glasplaat verdeeld worden.

- 9.1.3 *Bacillus subtilis* BGA plaat - pH8.
Stel de pH van tot $\pm 50^{\circ}\text{C}$ afgekoelde StIIN zodanig in dat deze $8,0 \pm 0,1$ is.
Voeg aseptisch een 0,5 ml *B.subtilis* BGA sporensuspensie toe en meng.
Concentratie $10^4 - 10^5$ sporen per ml voedingsbodem, zie verder conform 9.1.2.
- 9.1.4 *Bacillus subtilis* BGA plaat - pH7,2 met trimethoprim (lit. 4, 6, 7).
Stel de pH van tot $\pm 50^{\circ}\text{C}$ afgekoelde StIIN zodanig in dat deze $7,2 \pm 0,1$ is.
Voeg aseptisch een 0,5 ml *B.subtilis* BGA sporensuspensie en een 0,5 ml trimethoprim oplossing (6.5) toe en meng. Concentratie $10^4 - 10^5$ sporen en $0,14 \mu\text{g}$ TMP per ml voedingsbodem, zie verder conform 9.1.2.
- 9.1.5 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 plaat - pH6.
Stel de pH van tot $\pm 50^{\circ}\text{C}$ afgekoelde StIIN zodanig in dat deze $8,0 \pm 0,1$ is.
Voeg 1,0 ml *M.luteus* entsuspensie toe en meng. Concentratie $10^5 - 10^6$ cellen per ml voedingsbodem. Zie verder conform 9.1.2.
- 9.1.6 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 plaat pH8.
Stel de pH van tot $\pm 50^{\circ}\text{C}$ afgekoelde StIIN zodanig in dat deze $8,0 \pm 0,1$ is.
Voeg 1,0 ml *M.luteus* entsuspensie toe en meng. Concentratie $10^5 - 10^6$ cellen per ml voedingsbodem. Zie verder conform 9.1.2.

9.2 Inzetten van de 5-platentest.

- 9.2.1 Opbrengschema
De betreffende monsters worden volgens een bepaald schema op de agarplaat geplaatst. B.v. in totaal op 1 plaat 8 rijen van 8 monsterplaatsen, zodat de monsters ruim 3 cm van elkaar liggen. Bij duplobepalingen worden de betreffende monsterstukjes diagonaalsgewijs op dezelfde plaat geplaatst.
- 9.2.2 Suspensies, verdunningen en/of vloeibare producten worden in ponsgaatjes (9 mm doorsnede)* gepipetteerd met behulp van een 100 μl pipet op elk van de 5 diffusieagarplaten.
- 9.2.3 Vlees en orgaan stukjes genomen met kurkboor (zie 8.3) worden met een steriel pincet met de vlakke zijde op elk van de 5 diffusieagarplaten geplaatst.

In plaats van ponsgaatjes kunnen ook papierschijfjes gebruikt worden mits meteen na plaatsing op ieder schijfje het monster gepipetteerd wordt.

9.3 Bebroeding van de diffusieagarplaten

- 9.3.1 Na het afdekken van de afzonderlijk platen met het gaas, vochtabsorberend papier en een schone glasplaat, worden de *B.subtilis* BGA platen gedurende 18 tot 24 uur bij 30°C bebroed en de *M.luteus* platen worden 18 tot 24 uur bij 37°C bebroed.

9.4 Aflezen van de 5-platentest

- 9.4.1 Na de bebroeding worden de remzones of -randen met een nauwkeurigheid van 0,1 mm opgemeten.

- onder remzone wordt bij ponsraten verstaan de diameter van rand tot overliggende rand van de heldere zone om het ponsgat.

- onder remrand wordt bij stukjes vlees of orgaan verstaan de kortste afstand van de rand van het monster tot aan de rand van de heldere zone.

Een remzone of -rand, veroorzaakt door bacteriegroeiremmende stoffen geproduceerd door bacteriekolonies, die vanuit het monster op de plaat zijn gegroeid en meestal gekenmerkt is door een onregelmatige vorm, kan niet worden beoordeeld.

Vooraf niermonsters kunnen vals-positieve resultaten (lit. 8, 9, 15) geven. De specifieke remzones zouden veroorzaakt kunnen worden door a) hoog moleculaire eiwitten, b) melkzuur en/of andere organische zuren, c) lysozymen, d) dooieffecten van bevroren niet. Door een geschikt dialysemembraan, met een moleculaire cutoff van 1000 b.v. cellulose dialysis tubing nr. 132638 van Spectrum Medical Industries, tussen het monster en de gevoeligste agarplaat te plaatsen, worden de specifieke stoffen tegengehouden. Antibiotica hebben over het algemeen een lagere mol. gewicht dan 1000. Het monster kan evt. half over het membraan gelegd worden.

9.5 Kwaliteitscontrole

9.5.1 Om de kwaliteit van de testplaten te controleren worden een blanco (100 µl methanol/water; 30+70) en controle-oplossingen tylosine en natriumsulfadimidine meegenomen.

9.6 Voorlopige identificatie van de antibacteriële stof (lit. 1, 3, 22).

De remzones of -randen op de verschillende platen van dezelfde monsters vormen een bepaald patroon. Deze remzonepatronen kunnen vergeleken worden met de patronen van bekende antibacteriële stoffen, zie bijlage 2. Penicillinasegevoelige penicillines kunnen aangetoond worden door een papierschijfje met penicillinase te plaatsen naast het monster voor het bebroeden van de plaat. Indien bovengenoemde penicillines aanwezig zijn zal de remzone of -rand onderbroken zijn.

10 Weergave van de resultaten

De analyse moet worden herhaald indien de blanco een remzone geeft (≥ 11 mm \varnothing) op een van de platen of de voor de controleoplossingen gevonden remzone valt buiten het gebied, gevormd door de gemiddelde remzone $\pm 3x$ de standaarddeviatie voor de betreffende controleoplossing en plaat. Als analyseresultaat wordt vastgelegd de remrand of remzone (in mm) per plaat per monster. In de rapportage kan volstaan worden met een beoordeling per monster waarbij voor positieve monsters de diameter en plaat met de grootste remzone vermeld wordt. Twee voorbeelden van beoordeling zijn gegeven in 10.1 en 10.2.

10.1 Vlees en organen

De specifieke remrand (zie opmerking 9.4.1) wordt beoordeeld volgens onderstaande richtlijn (vgl. Duitse remstoffest, lit. 2, 7, 15)

| Waarneming | uitslag |
|--------------------------|---------------|
| remrand \leq 1 mm | negatief |
| remrand tussen 1 en 2 mm | twijfelachtig |
| remrand \geq 2 mm | positief |

- 10.2 Mengvoedergrondstoffen en vloeibare producten (bijproducten)
De remzone wordt beoordeeld volgens onderstaande richtlijn (lit. 11, 13, 15).

| Waarneming bij putje 9 mm | uitslag |
|---------------------------|----------|
| remzone < 15 mm | negatief |
| remzone \geq 15 mm | positief |

11. Literatuur

1. M. v. Schothorst en G. Peelen-Knol. Detectie van enkele antibiotica in slachtdieren. Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 95. afl. 8, 1970.
2. J.M.F. Nouws en A.H.J.W. Smulders. Een evaluerend onderzoek van de B.subtilis BGA sneltest. Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 99, afl 22, 1974.
3. Het vier-platensysteem. RIV-rapport 1976.
4. De trimethoprimplaat voor het aantonen van sulfonamide residuen in vers vlees, organen of vloeistoffen. RIV-rapport 10-10-1978.
5. M. v. Schothorst, F.M. v. Leusden, H. Mol, R.W.A.W. Mulder en A.C. Voeten. Residuen van antibiotica in slachtkuikens. RIV-rapport nr. 206/79 Zoön.
6. N. Sittrop en G. v.d. Bosch. Invloed van trimethoprim op de remming van B.subtilis BGA bij verschillende antibiotica, CCL-Med. 81.008.
7. H. Korkeala, O. Sorvettula, O. Mäki-Petays en J. Hirn. Comparison of Different Agar Diffusion Methods for the Detection of Antimicrobial Residues in Slaughter Animals. Acta. Vet. Scand. **23**, 307-415, 1982.
8. E. Forschner, W. Glende. Die Schweinenieren als problemorgan beim biologischen Hemmstofftest. Die Flieschwirtschaft 56, nr. 2, 226-228, 1976.
9. K. Koenen-Dierick, L. de Zutter en J. v. Hoof. Schreening Method for Identifying antibiotic Residues in Slaughter Animals. Archif für Lebensmittelhygiene, **38**, 121-148 (5), 1989.
10. Advies inzake antibiotica in levensmiddelen. Commissie van de Gezondheidsraad nr. 1980/5.
11. J.F.M. Nouws, M. v. Schothorst. A critical evaluation of several microbiological test methods for residues of antimicrobial drugs in ruminants. Archif für Lebensmittelhygiene, **30**, 4-8, 1979.
12. J.F.M. Nouws. Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. Archif für Lebensmittelhygiene, **32**, 103-110, 1981.
13. J.F.M. Nouws, N.H.G. Broex, J.M.P. den Hartog. De nieuwe Nederlandse niertest. Tijdschrift Diergeneeskunde, deel 113, afl. 5, 1988.
14. R. Reiner. Antibiotica und ausgewählte Chemoterapeutica, Stuttgart Georg Thieme Verlag, 1974.
15. L. Dedeken. Vergelijkend onderzoek van enkele microbiologische methodes voor het opsporen van kiemremmende stoffen bij slachtdieren. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift jaargang 44, nr. 9-10, 297-308, 1975.

16. Avotan Technical Manual, Cyanamid 1976 (productinformatie).
17. Tylan, Eli Lilly 1966 (productinformatie)
18. Stafac Virginiamycine, Lohmann Cuxhaven 1976 (productinformatie).
19. Flavomycine, Hoechst 1992 (productinformatie).
20. The Nitrofurans, Fabbrica Italiana Sintetici S.P.A. 1974 (productinformatie).
21. G. Hildebrant, R. Meiter, O. Dornheim, H. Schnüll en D. Kusch. Antibiotica und Sulfonamidnachweis mit dem biologischen Hemmstofftest. Fleischwirtschaft, 64 (7), 846-852, 1989.
22. Tabel J.F.M. Nouws 1978 (persoonlijke mededeling).

Bijlage 1

Molecuulgewichten, testplaat en remmende concentratie (MIC) van enkele antibiotica en chemotherapeutica.

| antibiotica afgeleid van | type | molecuulgewicht | gevoeligste plaat test-organisme | pH | MIC µg/ml | toevoegingen en hun effect op de activiteit | | | | literatuur | |
|--------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------------|----------|-----------|---|-----|---------|-------------------------------------|------------|------|
| | | | | | | penicillina- nase | TMP | 1% NaCl | 0,2%KH ₂ PO ₄ | | |
| aminozuren | mono | chlooramfenicol | 445,2/540-847 | M.luteus | 6 | 4-5 | | + | | | 14/8 |
| | di | penicilline G | 334,4/356 | M.luteus | 6 | 0,01 | - | + | | | 14/8 |
| | | ampicilline | 349,4 | M.luteus | 6 | 0,06 | | + | | | 14 |
| | poly | bacitracine | 1422,7 | M.luteus | 6 | 0,6 | | - | | | 14 |
| | | polymyxine | 1203,5 | M.luteus | 6 | | | | | | 14 |
| virginiamycine | | 525,6-823,9 | M.luteus | 6 | 0,1-0,2 | | - | | | 18 | |
| aminoglycosiden | streptomycine | 581,6 | B.subtilis BGA | 8 | 0,2 | | | - | - | 14 | |
| | avoparcine | 1500 | B.subtilis BGA | 6 | 0,2 | | + | - | - | 16 | |
| | neomycine | 322,4/616 | B.subtilis BGA | 8 | 0,1 | | | - | - | 14/8 | |
| | kanamycine | 484,5/600 | B.subtilis BGA | 8 | 0,9 | | | - | - | 14/8 | |
| | gentamycine | 477,6 | | | | | | - | - | 14 | |
| | spectinomycine | 332,4 | B.subtilis BGA | 8 | 30 | | - | - | - | 14 | |
| | flavomycine | 1592 | M.luteus | 8 | 0,4 | | - | - | - | 19 | |
| | lincomycine | 406,5 | M.luteus | 8 | 0,3 | | + | - | - | 14 | |
| macroliden | tylosine | 904 | M.luteus | 8 | 0,2 | | + | + | | 17 | |
| | spiramycine | 843, 1/800-900 | M.luteus | 8 | 0,4 | | | + | | 17/8 | |
| | oleanomycine | 687,9 | M.luteus | 8 | 0,05 | | | + | | 14 | |
| | erytromycine | 733,9/733 | M.luteus | 8 | 0,05 | | | + | | 14/8 | |
| tetracyclinen | tetracycline | 444,4/444 | B.subtilis BGA | 6 | 0,5 | | - | | | 14/8 | |
| | chloortetracycline | 478,9 | B.subtilis BGA | 6 | 0,06 | | | | | 14 | |
| | oxytetracycline | 460,4 | B.subtilis BGA | 6 | 0,1 | | - | | | 14 | |
| nitrofuranen | nitro furazolidone | 225 | B.subtilis BGA | 6 | 0,4 | | + | | | 20 | |

| | | | | | | | | |
|--------------|---------------|---------|---|----------|-----------|----|---|---|
| sulfonamides | sulfadimidine | 172-588 | B.subtilis BGA B.subtilis BGA + TMP | 6 7,2 | 40 0,3 | ++ | - | 8 |
|--------------|---------------|---------|---|----------|-----------|----|---|---|

* + remzone wordt groter

- remzone wordt kleiner of verdwijnt geheel (penicillinase)

MS188

Bijlage 2. Rempatronen van enkele antibacteriële stoffen.

| | Conc. µg/ml | remzone in mm (doorsnede) | | | | |
|-----------------|----------------|---------------------------|------|------|----------|------|
| | | B.subtilis BGA | | | M.luteus | |
| | | pH6 | pH8 | +TMP | pH6 | pH8 |
| virginiamycine | 5,0 | 20 | 15 | 28 | 34 | 31 |
| tylosine | 5,2 | 19 | 28 | 32 | 23 | 30 |
| oxytetracycline | 4,8 | 39 | 25 | 33 | 27 | 18 |
| nasulfadimidine | 5,2 | n.a. | n.a. | 31 | n.a. | n.a. |
| avoparcine | 4,9 | 25 | 18 | 26 | 19 | 15 |
| penicilline G | 5,0 | 47 | 38 | 39 | 46 | 42 |
| neomycine | 1,0 | 24 | 31 | - | 16 | 16 |
| streptomycine | 2,5 | 25 | 37 | - | - | 31 |
| spiramycine | 2,0 | n.a. | 16,5 | - | n.a. | 25 |
| oleandomycine | 2,0 | n.a. | 23 | - | n.a. | 26 |
| lincomycine HCl | 2,0 | n.a. | n.a. | n.a. | 26 | 30 |
| flavomycine | 5,0 | 28 | 17 | - | n.a. | n.a. |
| colistine | 10,0 | 16 | 16 | 15 | n.a. | 14 |
| salinomycine | 2,0 | 22 | n.a. | n.a. | 19 | n.a. |
| tiamulin | 10,0 | n.a. | n.a. | 17 | 18 | 34 |
| Zn-bacitracine | 5,0 | n.a. | n.a. | n.a. | 20 | 16 |

MS187

n.a. = niet aantoonbaar

- = niet bepaald

voedingsbodem
Standard II Nahragar
Merck Art.nr. 7883

Mediumblad: 001

001. (Gebufferd) Pepton Fysiologische Zoutoplossing (pfz + bpfz).

001.1 Toepassing: verdunningsvloeistof voor de bereiding en verdunning van monster(suspensies), reinkultures e.d. bpfz wordt gebruikt voor monsters met een lag pH (<4,5-5).

001.2 Medium:

Ingrediënten pfz (m/v):

| | |
|-------------------|---------|
| pepton uit vlees | 1,0 g |
| keukenzout (NaCl) | 8,5 g |
| demiwater | 1000 ml |

Ingrediënten bpfz (m/v):

| | |
|--|---------|
| pepton uit vlees | 1,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | 59,8 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4,6 g |
| demiwater | 1000 ml |

001.3 Bereiding: Weeg de ingrediënten voor de gewenste hoeveelheid af en los op door roeren. Vul potten (b.v. 90 ml) of buizen (b.v. 9 ml) met de gewenste hoeveelheden en steriliseer 20 min. bij 121°C (6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur), pH 7,0± 0,1.

001.4 Chemicaliën:

| | |
|--|----------------------|
| pepton uit vlees | Merck, art.nr. 7214 |
| keukenzout (NaCl) | Merck, art.nr. 6404 |
| Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | Merck, art.nr. 6579 |
| KH ₂ PO ₄ | Merck, art. nr. 4873 |

Mediumblad: 002

002. Plate Count agar (PCA resp. PCA + 3,5% NaCl).

002.1 Toepassing: niet selectieve agar voor het tellen van bacteriën.
Voor gezoute bacon en pekewater wordt extra 3,5% NaCl toegevoegd.

002.2 Medium: Plate Count Agar, Oxoid art.nr. CM463.

Ingrediënten (m/v):

| | |
|--------------------|------------------------------|
| pepton uit caseïne | 5,0 g |
| gistextract | 2,5 g |
| glucose, D(+) | 1,0 g |
| agar agar | 15,0 g |
| NaCl | 35,0 g indien van toepassing |
| demiwater | 1000 ml |

002.3 Bereiding: Meng de inhoud van de pot en weeg 23,5/58,5 g per liter demiwater af en los op door roeren en verwarmen. Verdeel na oplossen in porties van ca. 200 ml in infuusflessen. Steriliseer gedurende 15 min. bij 121°C en laat het medium afkoelen (6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur). De pH hoeft bij dit medium niet gesteld te worden, pH 7,0 ± 0,2 bij 25°C.

Voor het maken van telplaten wordt het medium opgesmolten, daarna gekoeld tot ca. 50°C en uitgegoten in 9 cm petrischalen (ca. 15 ml per plaat). Laat de platen stollen en droog deze voor gebruik bij kamertemperatuur, met de bodem omhoog. Gegoten platen zijn maximaal 3 weken houdbaar bij kamertemperatuur.

Wanneer 3,5% NaCl aan de PCA is toegevoegd wordt dit vermeld op de flessen en de gegoten petrischalen.

002.4 Chemicaliën:
Niet van toepassing.

Mediumblad: 005

005. Gebufferd Pepton Water (BPW).

005.1 Toepassing: niet selectief ophopingsmedium (resuscitatie).

005.2 Medium: Pepton Wasser (gepuffert), Oxold art.nr. CM509.

Ingrediënten (m/v):

| | |
|--|--------|
| pepton | 10 g |
| natriumchloride (NaCl) | 5 g |
| kaliumdiwaterstoffosfaat (KH ₂ PO ₄) | 1,5 g |
| dinatriumwaterstoffosfaat (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O) | 3,5 g |
| demiwater | 100 ml |

005.3 Bereiding: Meng de inhoud van de pot en weeg 20,0 g per liter demiwater af en los op door roeren. De pH hoeft bij dit medium niet gesteld te worden. pH 7,2 ± 0,2 bij 25°C. Vul af, b.v. 225 ml in 350 ml schroefdekselpotten of 9 ml in buizen (∅ 17/18 mm, lengte 160 mm) en steriliseer gedurende 15 min. bij 121°C (6 maanden houdbaar).

005.4 Chemicaliën:

Niet van toepassing.

Mediumblad: 010

Bereiding Standard II Nähragar (StIIIN).

1. Toepassing: Diffusieagar voor het bepalen van antibacteriële stoffen.

2. Medium: Standard II Nähragar Merck Art. nr. 7883.

Ingrediënten (m/v):

| | |
|------------------------|---------|
| pepton uit vlees | 3,45 g |
| pepton uit caseïne | 3,45 g |
| natriumchloride (NaCl) | 5,1 g |
| agar | 13,0 g |
| demi-water | 1000 ml |

3. Bereiding:

Meng de inhoud van de pot en weeg 25,0 g per liter demiwater af en breng het geheel onder voortdurend roeren aan de kook. De pH hoeft nu nog niet gesteld te worden. Vul af in porties van 180,0 ml in afsluitbare infuusflessen (250-300 ml). Markeer het vloeistofniveau. Steriliseer gedurende 15 minuten bij 121°C.

Bij gebruik wordt na opsmelten en voor pH instelling van het medium het verdampte water aangevuld tot de markering met gesteriliseerd, gedemineraliseerd water.

4. Chemicaliën:

Niet van toepassing.

Opmerking:

Er wordt geen 0,2% KH_2PO_4 toegevoegd. Dit beïnvloedt de gevoeligheid van de diffusie-agarplaten nadelig, m.n. voor de makroliden en sulfonamides. Het fosfaat zou ook de aspecifieke remzones bevorderen (Lit. 2, 12, 15, 21).

Werkblad: W001

Bereiding Bacillus subtilis BGA sporensuspensie.

Toepassing: Entsuspenzie voor diffusieagar.

1. Reinkweek B. subtilis BGA.
Breng een entoog B.subtilis BGA (kultuur of sporensuspensie) op een PCA-plaat (mediumblad 002) op een zodanige wijze dat losliggende reine kolonies worden verkregen. Bebroed de plaat gedurende 24 uur bij 30°C.
2. Entkultuur B. subtilis BGA.
Breng met een entoog van één reine kolonie, materiaal over in een buis met 9 ml kweekmedium (BPW, mediumblad 005). Bebroed deze buis gedurende 18-24 uur bij 30°C.
3. Bereiding en enting sporulatieplaat.
Koel een fles PCA af tot $\pm 45^{\circ}\text{C}$. Giet 20 ml van de agar in petrischalen (DOORSNEDE 9 CM) en laat stollen. Breng vervolgens 1 ml entkultuur (zie 2) op de agarplaten en spreid deze cultuur met een steriele drigalskispatel gelijkmatig over de platen. Bebroed de platen gedurende 10 dagen bij 30°C.
4. Bereiding sporensuspensie.
Breng met behulp van een steriel pipet 5 ml pepton fysiologisch zout (pfz, mediumblad 001) op iedere bebroede sporulatieplaat. Suspendeer het bacteriemateriaal met behulp van een drigalskispatel in het pfz. Verzamel de suspensie van de platen en pipetteer deze over in een steriele centrifugebuis. Centrifugeer vervolgens gedurende 10 minuten bij 3000 toeren per minuut. Pipetteer of giet bovenstaande vloeistof af en suspendeer het sediment weer in 10 ml pfz. Centrifugeer weer gedurende 10 minuten bij 3000 toeren per minuut. Pipetteer of giet bovenstaande vloeistof af en suspendeer wederom in pfz. De verkregen suspensie wordt bij 70°C, 30 minuten lang verhit.
5. Sporentelling.
Maak van de verkregen sporensuspensie een decimale verdunningsreeks in pfz-buizen. Breng in duplo 1 ml van deze verdunningsreeks in steriele petrischalen. Voeg vervolgens ca. 15 ml tot 45°C afgekoelde plate count agar (PCA) toe, meng goed en laat stollen. De platen worden 18-24 uur bebroed bij 30°C. Tel vervolgens het aantal kolonies van die duploplaten met de laagste verdunning, die 30 tot 300 kolonies bevatten. Bereken het sporen kve/ml van de suspensie door het gemiddelde van het aantal kolonies op de twee platen te vermenigvuldigen met de verdunningsfaktor.
6. Instelling sporensuspensie.
Verdun met steriele pfz de onder 4. verkregen sporensuspensie aan de hand van de onder 5. verkregen waarde zodanig dat $1 \cdot 10^7$ - $4 \cdot 10^7$ kve per ml worden verkregen. Deze sporensuspensie kan in een steriele afsluitbare fles bij $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$ gedurende 6 maanden worden bewaard.

Werkblad: W002

Bereiding *Micrococcus luteus* ATCC 9341 entsuspensie.

Toepassing: entsuspensie voor diffusieagar.

1. Reinkweek *Micrococcus luteus* ATCC 9341.
Breng met een entoog *M. luteus* op een PCA-plaat (mediumblad 002) op een zodanige wijze dat losliggende reine kolonies worden verkregen. Bebroed de plaat gedurende 24 uur bij 37°C.
2. Entkultuur *micrococcus luteus* ATCC9341.
Breng met een entoog van een reine kolonie, materiaal over in een buis met kweekmedium (BPW, mediumblad 005). Bebroed deze buis gedurende 24-48 uur bij 37°C.
3. Kiemtelling entkultuur.
Maak van de verkregen entkultuur een decimale verdunningsreeks in pzf-buizen (mediumblad 001). Breng in duplo 1 ml van deze verdunningsreeks in steriele petrischalen. Voeg vervolgens ca. 15 ml tot 45°C afgekoelde plate count agar (PCA) toe, meng goed en laat stollen. De platen worden 18-24 uur bebroed bij 37°C. Tel vervolgens de kolonies van de bebroede duploplaten van de laagste verdunning, die 30 tot 300 kolonies bevatten. Bereken het aantal kve/ml van de suspensie door het gemiddelde van het aantal kolonies op de twee platen te vermenigvuldigen met de verdunningsfaktor.
4. Instelling entsuspensie.
Verdun met steriele pzf de onder 2. verkregen entkultuur aan de hand van de onder 3. verkregen waarde zodanig dat $5 \cdot 10^7$ - 10^8 kve per ml worden verkregen. Deze entsuspensie kan bij $4 \pm 3^\circ\text{C}$ gedurende 1 week worden bewaard.