



Interne microbiologische analyse

Code: GB.P19.1

Revisie: 5

Versiedatum: 05-11-2024

1. Doel

Bepalen van de microbiologische kwaliteit.

2. Verantwoordelijk

Procesoperator

QA manager

3. Referenties

GB.F3.2-Beoordelingsformulier microbiologische analyses

GB.W40.0-Werkinstructie Intern laboratorium

GB.W41.0-Laboratorium beheer

Archivering resultaten petrifilms (foto's): L:\Greenblend Handboek\GB HANDBOEK Analyses lab\Greenblend
Interne laboratorium\foto's microbiologische analyses

Beoordelingshandleiding petrifilms

4. Werkwijze

4.1 Hygiëne

Draag een geschikte laboratoriumjas en was de handen grondig. Wanneer er gewerkt wordt met monsters, media en tijdens het inoculeren mag er niet gesproken en gehoest worden.

4.2 Werkplek

Zorg ervoor dat de werkplek opgeruimd en gedesinfecteerd is. Leg benodigdheden klaar op de werkplek om onnodig heen en weer lopen te voorkomen. De verdunningsvloeistoffen en Petrifilms moeten op kamertemperatuur komen. Voer 'schone' en 'vieze' activiteiten apart uit. In het geval van morsen moet dit direct worden opgeruimd en het gebied moet gedesinfecteerd worden. Aan het einde van de analyse moet de werkplek gedesinfecteerd worden.

4.3 Monstervoorbereiding

Verpakte producten moeten aseptisch geopend worden om een monster te kunnen nemen.

Desinfecteer de buitenkant van de verpakking en het materiaal dat gebruikt wordt om de verpakking te openen en het monster te nemen.

Neem een monster van 10 g uit de verpakking en voeg dit toe aan 90 ml steriele BPW. Homogeniseer het mengsel door 30x krachtig te schudden. Dit is de primaire verdunning, 10 keer verdund (-1).

4.4 Verdunningsreeks (Indien nodig)

De verdunningsreeks moet binnen 30 minuten na de primaire verdunning gemaakt worden. Markeer op elke buis de verdunningsfactor, -2 en/of -3. Voeg met behulp van een steriele pipetpunt 1 ml van de primaire verdunning toe aan de -2 verdunning (100 keer verdund). Homogeniseer dit mengsel door te schudden. Voeg met behulp van een steriele pipetpunt 1 ml van de -2 verdunning toe aan de -3 verdunning (1000 keer verdund).

4.5 Inzetten

De periode tussen het maken van de primaire verdunning en het moment dat het medium geïnoculeerd wordt mag niet groter zijn dan 45 minuten. Markeer op elk Petrifilm het monsternummer (= batch code), de verdunning en de datum.



Interne microbiologische analyse

Code: GB.P19.1

Revisie: 5

Versiedatum: 05-11-2024

Homogeniseer de te inoculeren verdunning door te schudden. Voeg met behulp van een steriele pipetpunt 1 ml van de te inoculeren verdunning toe op het Petrifilm door het bovenste folie omhoog te houden. Laat het folie omlaag vallen en verdeel het monster gelijkmatig met behulp van de speciale Petrifilm spreider behorend bij het Petrifilm (voor elke Petrifilm is een andere spreider nodig!). Laat de Petrifilm 1 minuut liggen om de gel te laten stollen. Herhaal deze stappen voor elke te inoculeren verdunning en op elke soort Petrifilm. Wanneer er gewerkt wordt van de hoogste verdunning naar de laagste verdunning kan dezelfde pipetpunt gebruikt worden.

Incubeer de Petrifilms volgens onderstaand schema:

Petrifilm	Temperatuur (°C)	Tijd (h)
Totaal kiemgetal	30	48
Gisten en schimmels	20-25	120 (5 dagen)
Melkzuurbacteriën	28-37	48

4.6 Beoordelen

Petrifilms moeten na incubatietijd binnen 1 uur beoordeeld worden. Wanneer dat niet mogelijk is moeten de Petrifilm in een afsluitbare container worden ingevroren. De Petrifilms moeten dan binnen 1 week beoordeeld worden. Desinfecteer de werkplek waarop de Petrifilms beoordeeld worden na afloop.

Beoordeel de Petrifilms volgens onderstaand schema:

Petrifilm	Te tellen kolonies	Telbaar tot
Totaal kiemgetal	Rode kolonies	300
Gisten en schimmels	Gist: Klein, scherpe randen, geel-bruin tot blauw-groen, gelijkmatige kleur, verhoogde kolonies	150
	Schimmel: Groot, vage randen, variabele kleur, donkere kern, vlakke kolonies	
Melkzuurbacteriën	Zwarte kolonies	150 met gas 300 zonder gas

Wanneer de Petrifilms niet te tellen zijn of voor verdere informatie over de beoordeling raadpleeg de beoordelingshandleiding van de Petrifilms.

Een hogere verdunning kan nooit meer kolonies bevatten dan een lagere verdunning. Dan is de verdunningsreeks niet goed uitgevoerd en zijn de resultaten niet betrouwbaar.

Wanneer er geen kolonies aanwezig zijn moet er als volgt worden gerapporteerd: minder dan d per ml of g (d = verdunningsfactor van de primaire verdunning of de eerste decimale verdunning die is ingezet). Bijvoorbeeld geen kolonies en de laagst ingezette verdunning is $10^1 = 10$ dus < 10 kve/g.



Interne microbiologische analyse

Code: GB.P19.1

Revisie: 5

Versiedatum: 05-11-2024

Wanneer de Petrifilm niet te beoordelen is wordt dit aangegeven als NTT (niet te tellen). Dit kan komen door overgroei, beschadiging of te grote aantallen kolonies. In dit laatste geval wanneer er bijvoorbeeld onvoldoende is door verdund kan er gekeken worden naar de range van de verdunning.

Een resultaat is bruikbaar wanneer er op een petrifilm minimaal 10 kolonies zijn geteld. Het aantal kolonievormende eenheden per gram product (kve/g) kan worden berekend met behulp van de volgende formule:

$$N = k \times f \div V$$

Waarin:

N staat voor het aantal kolonievormende eenheden per gram (kve/g)

k staat voor de som van het aantal getelde kolonies van 1 verdunning

f staat voor de verdunningsfactor, $10^{-1} = 10$, $10^{-2} = 100$, $10^{-3} = 1000$

V staat voor het totaal geïnoculeerde volume in ml van 1 verdunning (2ml bij duplo)

Het berekende resultaat moet worden afgerond tot twee significante cijfers en wordt weergegeven in kve per gram product.

Wanneer er geen groei is moet er gerapporteerd worden volgens onderstaande tabel. Dit kan ook gebruikt worden als een snellere manier om de Petrifilms te beoordelen zonder het aantal kolonies te tellen en/of de berekeningen uit te voeren (alleen als er meerdere verdunningen zijn ingezet).

-1	-2	-3	Kve/g
-	-	-	< 10
+	-	-	< 100
+	+	-	< 1000
+	+	+	> 1000

+ = groei, - = geen groei

5. Rapporteren

Rapporteer op het beoordelingsformulier microbiologische analyses.

Fotografeer de resultaten van de petrifilms en archiveer deze digitaal op de L-schijf: L:\Greenblend Handboek\GB HANDBOEK Analyses lab\Greenblend Interne laboratorium\foto's microbiologische analyses.

Bij resultaten die niet acceptabel zijn moeten de *QA manager* en manager Greenblend direct op de hoogte gesteld worden.