



## Stanovení *Clostridium perfringens*

Stanovení *Clostridium perfringens* (včetně spor) dle Vyhlášky MZ ČR č. 252/2004 Sb. a Council Directive 98/83/EC z 3.11.1998

Tento příspěvek je určen pro laboratoře hygienické služby, vyšetřující pitnou vodu v rámci monitoringu, BHD či jiného šetření. Je třeba, aby měly k dispozici v předstihu novou metodu na stanovení *C. perfringens*, požadavky na přístroje, zařízení, média a chemikálie a ev. mohly si i metodu předem zaběhnout v laboratoři.

Specifikace jednotlivých stanovení pro mikrobiologické ukazatele jakosti pitné vody je dána Směrnicí rady 98/83/EC a bude promítnuta do Vyhlášky MZ ČR, kterou se stanoví požadavky na jakost pitné vody a limity mikrobiologických, biologických, fyzikálních a chemických ukazatelů.

Pro stanovení *Clostridium perfringens* (včetně spor) je určena metoda s m-CP agarem. Ta je principiálně odlišná od metody stanovení spor siřičitany redukujících anaerobů (klostridií) dle ČSN EN 26461-2. Tato metoda stanoví jen spóry, ne vegetativní buňky, protože je v metodice zařazen krok inaktivace při 75°C 15 min. a dále je použito jiné selektivní médium.

### Princip stanovení:

*Clostridium perfringens* stanovíme technikou membránové filtrace na selektivním médiu (m-CP agar) bez inaktivace vzorku při 75°C, t.j. stanoví se vegetativní buňky i spóry. Pro potvrzení charakteristických kolonií je zařazen konfirmační test pro důkaz pozitivní kyselé fosfatázy.

### Kultivační média a chemikálie:

#### 1. selektivní médium m-CP agar:

složení:

základní médium:

tryptoza	30 g
kvasničný extrakt	20 g
sacharoza	5 g
L-cystein hydrochlorid	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
bromkresolový purpur	40 mg
agar	15 g
voda (destilovaná)	1000 ml

příprava:

Rozpustíme složky základního média, upravíme pH na 7,6 a pak sterilizujeme při 121°C po dobu 15 min., necháme vychladnout a přidáme následující složky:

D - cycloserin 400 mg



Polymyxin-B-sulfát	25 mg
Indoxyl- $\beta$ -D-dlucoside	60 mg (předem rozpuštěný v 8 ml sterilní vody)
filtrací sterilizovaný 0,5% fenolftalein	
difosforečnanový roztok	20 ml
filtrací sterilizovaný 4,5% FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2 ml

**2. chemikálie pro konfirmační test:**

amoniak - vodný roztok, koncentrovaný (cca 24-28 %)

**Přístroje, zařízení:**

zařízení pro membránovou filtraci inkubátor na 44+/-1°C anaerostat (zařízení na udržování anaerobní atmosféry) membránové filtry s póry 0,2 mm sklo (Petriho misky, baňky, pipety 10 ml dělené po 0,1; odměrné válce) exikátor nebo hermeticky uzavíratelný box

**Postup stanovení:**

Membránovou filtrací s použitím filtrů 0,2 um filtrujeme daný objem vody, inkubaci provádíme na selektivním m-CP agaru v inkubátoru při 44+/-1°C po dobu 21+/-3 hod. za anaerobních podmínek.

Počítáme matné, neprůhledné žluté kolonie, které potvrdíme konfirmačním testem. Charakteristické kolonie (žluté) vystavíme parám amoniaku po dobu 20-30 sec. Ty, které změní barvu do růžova nebo červena jsou potvrzené kolonie.

**Poznámka:**

1. Konfirmační test na průkaz *C. perfringens* na m-CP agaru je pro mikrobiologická pracoviště poněkud netradiční. Aby se vyloučil vliv plynného amoniaku na operátory je třeba použít hermeticky uzavřený box nebo exikátor, do něhož vložíme kádinku s roztokem amoniaku a s tímto manipulujeme v digestoři nebo laminárním boxu.
2. Kompletní médium m-CP agar lze v současné době již obdržet distributory bakteriologických médií.

**Kontrolní kmeny:**

Kontrolní kmeny pro testování bakteriologických půd viz "Doporučené kontrolní kmeny pro testování médií" - Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Brno, Tvrdého 14, 602 00 Brno.

**m-CP agar:**

pozitivní kontrola - CCM 4435 *Clostridium perfringens*  
negativní kontrola - CCM 1999 *Bacillus subtilis*

publikováno v březnu 2001 - revidováno v květnu 2004