

Projectnr. 313.0052

Niveaucontrole op de laboratoria van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne.

Projectleider: A.H. Roos

Rapport 93.06

juli 1993

IDENTIFICATIE VAN BACTERIEGROEIEMMENE STOFFEN
IN RAUWE MELK MET DE CHARM II TEST

ir M.A.A.M. Naber

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telefax 08370-17717

Copyright 1993, DLO-Rijkskwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

A.H. Roos, projectleider

Afd. hfd afdeling Microbiologie en Biotechniek

Afd. hfd afdeling Kwaliteitsbewaking en Kwaliteitssystemen

Afd. hfd afdeling Instrumentele Analyse

Afd. hfd afdeling Levensmiddelen- en Milieuchemie

Afd. hfd afdeling Risicoanalyse en Toxicologie

Afd. Microbiologie en Biotechniek (2x)

pr en secretariaat (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Directie Veehouderij en Zuivel (ir J.J. Bakker)

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Stichting Melkcontrolestation "Noord-Oost" Nederland (4x)

Stichting Melkcontrolestation "West-Nederland" (2x)

Coöperatieve Vereniging voor Melkonderzoek "Zuid-Nederland" (2x)

COKZ Leusden (L. Krijgsman) (1x)

Dr. ir. J. Stadhouders

ABSTRACT

Identificatie van bacteriegroeiremmende stoffen in rauwe melk met de Charm II test

Identification of inhibitory substances in raw milk with the Charm II test (in Dutch)

Report 93.06

July 1993

M.A.A.M. Naber

DLO-State Institute for Quality Control of Agricultural Products (Rikilt-DLO)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

11 tables, 18 figures, 10 references, 30 pages

The Charm II test is a microbiological or immunological competitive receptor assay, used to detect residues of 7 antibiotic groups. It was shown that the detection limits of the tested antibiotics with the Charm II test are lower than the detection limits in the screening method (tube diffusion test). This makes the test applicable as confirmation test for samples which are positive in the screening method. Only part (61%) of the tanker herd milk samples, which were positive in the screening method, could be used for the detection of antibiotics in the Charm II test. These samples showed all positive for the presence of one or a few of the following antibiotics: aminoglycosides, tetracyclines, macrolides, novobiocine or chloramphenicol. The other 39% of the tanker herd milk samples did not fulfil the requirements to identify antibiotics with the Charm II test, possibly as a result of freeze-thawing procedures.

Keywords: Charm II test, antibiotics, raw milk

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODE	10
2.1 Monstermateriaal	10
2.1.1 Melk vrij van antimicrobiële stoffen	10
2.1.2 Steriele melk	10
2.1.3 Melkpoeder	10
2.1.4 Charm-reagentia	10
2.1.5 Scintillatie vloeistof	11
2.1.6 Positieve standaarden	11
2.1.7 Monsters melk met bacteriegroeiremmende stoffen	11
2.2 Methoden van onderzoek	11
2.2.1 Charm II test	11
2.2.2 HPLC	12
2.2.3 Hoogspanningselectroforese	12
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	13
3.1 Charm Zero Milk Powders en steriele volle en magere melk als blanco	13
3.2 Detectiegrenzen van diverse antibiotica	14
3.3 Praktijkmonsters antibiotica-vrije melk	14
3.4 Praktijkmonsters melk met bacteriegroeiremmende stoffen	15
4 CONCLUSIES	18
LITERATUUR	19
FIGUUR 3 t/m 18	20 e.v.
BIJLAGE	
AANTONEN VAN MELKVREEMDE BACTERIEGROEIREMMENDE STOFFEN	31

SAMENVATTING

De Charm II test is een microbiologische of immunologische competitieve receptor assay, waarmee residuen van 7 verschillende antibioticagroepen kunnen worden gedetecteerd. Gebleken is dat zowel Charm Zero Milk Powders als steriele volle/magere melk kunnen dienen als blanco voor de Charm II test.

De detectiegrenzen van de geteste antibiotica liggen lager dan de detectiegrenzen van de screeningsmethode. De test is toepasbaar in het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk bij de bevestiging van de aanwezigheid van andere bacteriegroeiremmende stoffen dan sulfonamiden en β -lactam antibiotica. Gebleken is dat in 28 van de 46 monsters melk die met de screeningsmethode (buismethode) positief waren, aminoglycosiden, macroliden, tetracyclines, novobiocine of chlooramfenicol konden worden aangetoond. De overige monsters (39%) die positief bevonden werden in de screening, bleken, mogelijk door herhaaldelijk invriezen en ontdooien van de monsters, niet meer bruikbaar voor de Charm II test.

1 INLEIDING

Aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen in melk is een belangrijk probleem in de zuivelindustrie omdat er technologische problemen kunnen ontstaan bij de verwerking van de melk. Startercultures voor yoghurt en kaas kunnen geremd worden door de aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen. De zuurproductie kan geremd worden door aanwezigheid van 0,01 - 0,02 IE penicilline/ml en 0,03 - 0,05 IE/ml geeft een complete remming. Een andere reden om bacteriegroeiremmende stoffen in melk te reduceren is het gezondheidsrisico als gevolg van resistentie van micro-organismen tegen antibiotica. Antibiotica worden in de veehouderij ondermeer toegepast als groeibevorderaar. Bij bacteriën kan daardoor resistentie ontstaan en bij consumptie door de mens van dierlijk materiaal kunnen ernstige infecties optreden. Ook zijn er gevallen gerapporteerd van allergie; het betrof hier meestal een secundaire reactie. Allergische reacties kunnen vaker voorkomen maar worden meestal niet opgemerkt omdat men de oorzaak niet kan achterhalen of doordat er een cumulatief effect is met voedselallergie. Daarnaast kunnen toxische effecten optreden hoewel dit zeer onwaarschijnlijk is doordat er zeer kleine hoeveelheden antibiotica aangetroffen worden in voedingsmiddelen [1, 2]. Mede aan de hand van de "Acceptable Daily Intake" (ADI) heeft de EG "Maximum Residue Limits" (MRL) opgesteld [3]. In Tabel 1 staan enkele MRL's voor rauwe melk weergegeven.

Tabel 1: Maximum Residue Limits ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Groep	Antibioticum	MRL
β -Lactam antibiotica	Penicilline G	4
	Ampicilline	4
	Amoxicilline	4
	Oxacilline	30
	Cloxacilline	30
	Dicloxacilline	30
Sulfonamiden	Sulfamethazine	100 ¹
	Dapsone	25
Macroliden	Spiramycine	150
Aminoglycosiden	Streptomycine	200 ²
	Dihydrostreptomycine	200 ²
	Gentamycine	200 ²
	Neomycine	200 ²
	Novobiocine	3
	Chlooramfenicol	0 ⁴

¹ Totaal aan Sulfonamiden

² Voorgestelde MRL

³ Geen MRL

⁴ Geen toelating in melkveehouderij

In Nederland is het aantonen van de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen in boerderijmelk onderdeel van het kwaliteitsonderzoek. Als screeningsmethode wordt de

buismethode (pH 8,0) toegepast met *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* als testorganisme [4]. In Tabel 2 staan de detectiegrenzen van de verschillende antibiotica en sulfonamiden voor deze buismethode weergegeven. De buismethode kan bij verschillende pH's uitgevoerd worden [5].

Tabel 2: Detectiegrenzen ($\mu\text{g/l}$) van antibiotica en sulfonamiden, bepaald met de buismethode bij verschillende pH-waarden.

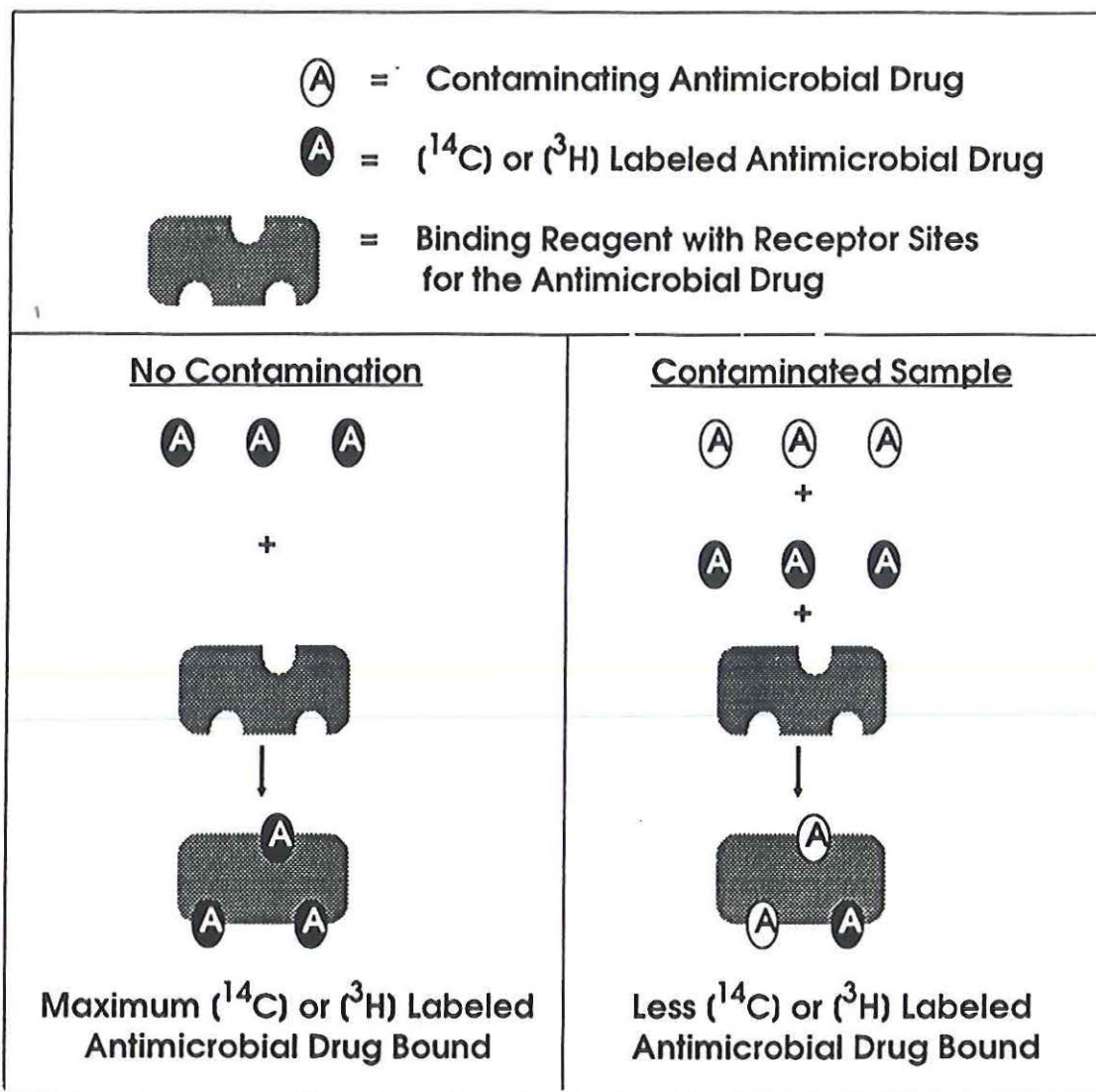
antibioticum	pH 7	pH 8	pH 8,3
Benzylpenicilline ¹	2	3	5
Ampicilline	1	2	12
Cloxacilline	20	20	40
Oxytetracycline	200	400	800
Streptomycine	1400	300	600
Neomycine	4000	30	60
Kanamycine	1000	2300	-
Spiramycine	2200	500	30
Erythromycine	100	10	-
Cephalosporine C	1000	1000	-
Dapsone	20	2	0,2
Sulfamethazine	1000	400	200

¹ In Internationale Eenheden (IE/ml)

Voor de bevestiging van de aanwezigheid van andere bacteriegroeiremmende stoffen dan sulfonamiden is steeds gebruik gemaakt van de plaatmethode met *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* als testorganisme [4]. Behalve voor de β -lactam antibiotica is deze methode te ongevoelig in vergelijking met de screeningsmethode (buismethode). Nagegaan is of de Charm II test wel als bevestigingsmethode kan worden gebruikt.

Voor de detectie van antimicrobiële stoffen ontwikkelde Charm eind jaren zeventig een snelle microbiologische test; de zogenaamde Charm test [6-9]. De Charm test bestaat uit een microbiële of immunologische receptor en een tracer (een radio-actief (^{14}C of ^3H) gelabeld antibioticum). Tijdens de test treedt er een competitie op tussen de tracer en de eventuele aanwezige bacteriegroeiremmende stof in de te onderzoeken melk voor binding aan de receptor. Is er geen bacteriegroeiremmende stof aanwezig dan zal dientengevolge 100% binding van de tracer aan de receptor optreden. Is er wel een bacteriegroeiremmende stof aanwezig dan zal er minder tracer gebonden zijn aan de receptor. De mate van binding van een bacteriegroeiremmende stof aan de tracer wordt met een scintillatieteller (Charm-analyzer) gemeten (in counts per minute (cpm)). Het aantal counts bepaalt of een monster al dan niet positief is (Figuur 1).

De binding van de tracer aan de receptor is irreversibel en specifiek aan een bepaalde plaats in de cel waardoor het metabolisme onderbroken wordt. β -Lactam antibiotica binden aan een enzym in de celwand, tetracyclinen en aminoglycosiden binden aan de ribosomen.



Figuur 1: Schematische voorstelling Charm II test

In dit onderzoek is nagegaan of monsters melk die positief waren met de screeningsmethode positief bevestigd konden worden met de Charm II test. In de monsters waren geen residuen van β -lactam antibiotica of sulfonamiden aanwezig. De monsters zijn getest op de aanwezigheid van de volgende (groepen van) antibiotica:

- aminoglycosiden
- macroliden
- tetracyclinen
- novobiocine
- chlooramfenicol

Tevens zijn in dit onderzoek de detectiegrenzen van de diverse antibiotica vastgesteld en zijn de verschillende soorten antibiotica-vrije melk en blanco-melkpoeders van Charm vergeleken.

2 MATERIAAL EN METHODE

2.1 Monstermateriaal

2.1.1 Melk vrij van antimicrobiële stoffen.

Deze melk bestond uit monsters tankmelk die met de buismethode (pH 7) negatief waren. Dit waren:

Monsternummers AV 1 t/m AV 20 van de datum 8-7-1992

Monsternummers AV 21 t/m AV 26 van de datum 15-7-1992

Monsternummers AV 27 t/m AV 32 van de datum 8-7-1992

2.1.2 Steriele melk.

Steriele magere melk en steriele volle melk, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen

2.1.3 Melkpoeder.

Melkpoeder welke door Charm wordt geleverd en waarin geen bacteriegroeiremmende stoffen aanwezig zijn. Tijdens het onderzoek werden 3 batches van Charm Sciences gebruikt (Tabel 3).

Tabel 3. Charm sciences Zero Milk Powder

batches	houdbaar tot
ZMP002F	12/92
ZMP002G	2/93
ZMP002K	6/93

2.1.4 Charm-reagentia

De reagentia bestaan uit twee tabletten; één receptor en één tracer (in doordrukstrip). De test is uitgevoerd voor de volgende groepen van bacteriegroeiremmende stoffen:

- Aminoglycosiden
- Macroliden
- Tetracyclinen
- Novobiocine
- Chlooramfenicol

De reagentia worden geleverd door Charm Sciences Inc., 36 Franklin Street, Malden, Massachusetts 02148-4129, U.S.A.. Charm Sciences wordt in Nederland vertegenwoordigd door Radiometer Nederland, Zoetermeer.

Opmerking: De totale hoeveelheid radio-activiteit van de voorraad Charm-reagentia mag volgens de arbeidsinspectie niet meer bedragen dan 0,5 Curie (Ci) ($= 1,85 \times 10^{10}$ Becquerel (Bq)).

Voor alle testen is de microbiële receptor gebruikt, behalve bij tetracycline en chlooramfenicol.

Daar is gebruik gemaakt van de immunologische receptor.

2.1.5 Scintillatie vloeistof

Liquid Scintillation Cocktail, OPTI FLUOR 6013199, Packard Instrument BV Groningen. Leverancier Radiometer Nederland, Zoetermeer.

2.1.6 Positieve standaarden

In tabel 4 staan de positieve standaarden genoemd die in dit onderzoek gebruikt zijn. Tevens staat de fabrikant van elk antibioticum genoemd en hoe de stof is opgelost.

Tabel 4: Positieve standaarden

Antibioticum:	Fabrikant:	Oplosmiddel:
Chlooramfenicol	Sigma	5 ml methanol, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Erythromycine	Sigma	5 ml methanol, aanvullen tot 100 ml met fosfaatbuffer pH 8
Kanamycine	Sigma	5 ml fosfaatbuffer pH 8, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Neomycine	Sigma	5 ml fosfaatbuffer pH 8, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Novobiocine	Serva	5 ml methanol, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Oxytetracycline	Sigma	2 ml 0,1 M HCl, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Spiramycine	Sigma	5 ml fosfaatbuffer pH 8, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Streptomycine	Sigma	5 ml TEA buffer, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Tetracycline	Sigma	2 ml 0,1 M HCl, aanvullen tot 100 ml met gedem. water
Tylosine	Sigma	5 ml methanol, aanvullen tot 100 ml met gedem. water

Bereiding:

De stockoplossing dient 1.000.000 ppb te bevatten. Voorbeeld:

Van oxytetracycline met een activiteit van 920 μg base/mg werd 0,10708 gram afgewogen en opgelost in 2 ml 0,1 M HCl en aangevuld tot 100 ml met gedemineraliseerd water. Deze stockoplossing bevat $0,09851 \times 10^{-2}$ g/ml. De stockoplossing werd doorverdund met (magere steriele) melk en de volgende concentratiereeks werd bereid: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 en 100 ppb.

2.1.7 Monsters melk met bacteriegroeiremmende stoffen

Door het melkcontrolestation Noord-Oost werden nadat het onderzoek voor deze monsters was afgerond melk, die bij de buismethode (pH 7) positief was en geen β -lactam antibiotica of sulfonamiden bevatte, meteen ingevroren bij $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Het betreft de volgende monsternummers:

GR 1 t/m GR 23 van de datum 8-7-1992

GR 24 t/m GR 42 van de datum 15-7-1992.

2.2 Methoden van onderzoek

2.2.1 Charm II test

De Charm II test werd uitgevoerd volgens de door Charm voorgeschreven methode [10].

Voor elke groep van antibiotica is er een apart voorschrift. De testen worden competitief uitge-

voerd. Dit houdt in dat receptor en tracer gelijktijdig geïncubeerd worden.

Na ontdooien wordt de te testen melk tot gebruik bij 0-5 °C bewaard (maximaal 2 uur). De test wordt volgens de volgende stappen uitgevoerd.

- 1- De receptor wordt in een glazen testbuis gebracht.
- 2- Hieraan wordt 300 µl gedemineraliseerd water toegevoegd en gedurende 10 seconden gemengd met een Vortex.
- 3- Vervolgens wordt 5 ml van de te onderzoeken melk toegevoegd.
- 4- De (radio-actieve) tracer wordt toegevoegd en er wordt wederom gedurende 10 seconden gemengd met een Vortex.
- 5- (Voor de Chlooramfenicol bepaling wordt de tablet met koolstof toegevoegd).
- 6- De bus wordt 3 minuten geïncubeerd bij de temperatuur zoals aangegeven in Tabel 5.

Tabel 5. Incubatietemperatuur en centrifugesnelheden en -tijden.

Groep	Incubatietemperatuur (°C)	Centrifugesnelheid (rpm)	Centrifugetijd (min)
Aminoglycoside	35	4300	3
Macrolide	65	3400	3
Tetracycline	35	3400	5
Novobiocine	65	4300	3
Chlooramfenicol	0	3400	5

- 7- Na incuberen wordt er gecentrifugeerd zoals aangegeven in Tabel 5.
 - 8- Na het centrifugeren wordt de bovenstaande vloeistof afgegoten en wordt de bus met 2 of meer swabs ontvet en gedroogd, zonder dat het pellet verwijderd wordt.
 - 9- (Voor de bepaling van chlooramfenicol wordt de bus niet afgegoten maar 300 µl van bovenstaande vloeistof wordt gepipeteerd in een schone bus).
 - 10- Er wordt 300 µl gedemineraliseerd water toegevoegd en de pellet wordt opgelost door de bus gedurende 15 seconden goed te mengen op de Vortex (voor chlooramfenicol geen water toevoegen).
 - 11- Er wordt 3 ml scintillatievloeistof toegevoegd en gedurende enkele seconden gemengd op de Vortex.
 - 12- Hierna worden met behulp van de analyzer de counts per minute (cpm) bepaald.
- Bij het onderzoek van de Charm Milk Powders werden deze eerst opgelost in 100 ml water van 40 °C en vervolgens gekoeld tot 4 °C.

2.2.2 HPLC

De HPLC methode werd uitgevoerd volgens intern Rikilt-voorschrift.

2.2.3 Hoogspanningselectroforese

De hoogspanningselectroforese werd uitgevoerd volgens Rikilt Standaard Voorschrift A0508.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Charm Zero Milk Powders en steriele volle en magere melk als blanco.

Drie batches Zero Milk Powder (ZMP) van Charm werden met elkaar vergeleken en met steriele volle en magere melk. Elke batch werd in viervoud geanalyseerd en hiervan werd de gemiddelde count berekend. De resultaten staan in Tabel 6.

Tabel 6. Resultaten Zero Milk Powder.

Batch	ZMP002F	ZMP002G	ZMP002K	Steriele melk	
				vol	mager
Aminoglycoside					
aantal	4	4	4	16	12
gemiddelde count	2086	2109	2004	1918	1855
standaarddeviatie	100	88	49	88	120
variatiecoëfficiënt	4,8	4,2	2,4	4,6	6,5
Macrolide					
aantal	4	4	4	6	6
gemiddelde count	1888	2190	1864	1836	1872
standaarddeviatie	209	102	90	93	75
variatiecoëfficiënt	11,1 ²	4,7	4,8	5,1	4,0
Tetracycline					
aantal	4	4	4	6	18
gemiddelde count	1779	1887	1897	1930	2756 ¹
standaarddeviatie	90	104	46	74	165
variatiecoëfficiënt	5,1	5,5	2,4	3,8	6,0
Novobiocine					
aantal	3	4	4	5	6
gemiddelde count	2258	1960	2267	2234	2150
standaarddeviatie	117	114	89	137	110
variatiecoëfficiënt	5,2	5,8	3,9	6,1	5,1
Chlooramfenicol					
aantal	4	3	4		6
gemiddelde count	2389	2166	2445		2325
standaarddeviatie	149	121	344		153
variatiecoëfficiënt	6,2	5,6	14,1 ³		6,6

¹ Andere batch

² Te hoge variatiecoëfficiënt

³ Te hoge variatiecoëfficiënt

Charm geeft aan dat de variatiecoëfficiënt beneden de 8% moet liggen voor een blanco standaard. Bij 2 verschillende melkpoeders is de variatiecoëfficiënt bij 1 van de 5 onderzochte groepen antibiotica te groot, éénmaal voor Macrolide (ZMP002F)² en éénmaal voor Chlooramfenicol (ZMP002K)³. De hoge variatiecoëfficiënt voor Chlooramfenicol is te verklaren door één hoge uitschieter in de waarden. De hoge variatiecoëfficiënt voor de Macrolide is moeilijker te verklaren: van de 4 waarden liggen er twee wat hoger (of lager) waardoor de variatiecoëfficiënt afwijkt. De reden van deze afwijking is onduidelijk. Een tweede eis die Charm stelt aan de blanco standaard is dat de waarden van de count binnen een marge van 20% van voorgaande blanco monsters ligt. Uit tabel 6 blijkt ook dat de steriele volle en magere melk als blanco gebruikt kunnen worden

omdat de variatiecoëfficiënt steeds <8% was en het gemiddelde van de count niet meer dan 20% afwijkt van de andere gemiddelden.

3.2 Detectiegrenzen van diverse antibiotica

Verschillende soorten melk (antibiotica-vrije tankmelk, steriele volle melk en steriele magere melk) zijn gebruikt voor de bepaling van detectiegrenzen. Er werden telkens 6 blanco's meegenomen. Van deze blanco monsters werd de standaarddeviatie berekend en daarna het kritisch punt vastgesteld op het gemiddelde minus 3 maal de standaarddeviatie van de blanco's. Indien de count van een monster lager is dan de kritische count wordt het geteste antibioticum aantoonbaar geacht. De resultaten staan weergegeven in de Figuren 8 t/m 18. Ook staat in de figuren het kritisch punt volgens Charm opgegeven. Omdat bij de gebruikte steriele magere of volle melk de standaarddeviatie zeer klein is, is voor de bepaling van de detectiegrenzen (Tabel 7) de door Charm voorgeschreven berekeningswijze van het kritisch punt gehanteerd.

Tabel 7: Detectiegrenzen ($\mu\text{g/l}$) van antibiotica bepaald met de Charm II test.

Antibioticum/groep	Rikilt-DLO	Charm [10]	Heeschen [8]
Aminoglycosiden			
gentamycine	10	10	50
kanamycine	400		
neomycine	10		
streptomycine	50	10	50
Macroliden			
erythromycine	15	20	40
spiramycine	35		
tylosine	20		
Tetracyclinen			
oxytetracycline	15		
tetracycline	2	1	200*
Novobiocine	100	10	20
Chlooramfenicol	1	1	30

* microbiële receptor

De detectiegrenzen komen goed overeen met wat Charm opgeeft, behalve voor Novobiocine welke een factor 10 hoger ligt. De gevonden detectiegrenzen voor de Charm II test zijn allemaal gelijk aan of lager dan de detectiegrenzen van de screeningsmethode (buismethode pH 8)(zie Tabel 2). Dit betekent dus dat de aanwezigheid van een antibioticum behorende tot één van de 5 groepen die met de Charm II test worden bepaald, moet kunnen worden bevestigd met de Charm II test.

Er wordt bij de Charm II test gebruik gemaakt van microbiële en immunologische receptoren. Als gevolg van de invoering door Charm van de immunologische receptor voor tetracyclinen en chlooramfenicol is de gevoeligheid voor deze stoffen met een factor 100 toegenomen. Voor de overige groepen worden microbiële receptoren gebruikt.

De gevonden verschillen tussen deze resultaten en die van Charm en Heeschen et al kunnen verklaard worden door het feit dat er geen gelijke receptoren gebruikt zijn (microbieel versus

immunologisch) en de uitvoering van de proef (Kiel modificatie).

3.3 Praktijkmonsters antibiotica-vrije melk

In Tabel 8 en Figuur 3 t/m 7 staan de resultaten weergegeven. De plusjes in de figuren geven de counts van de blanco monsters weer (AV). GEM is het gemiddelde van de blanco monsters, +3S en -3S betekenen respectievelijk +3x de standaarddeviatie en -3x de standaarddeviatie (ten opzichte van het gemiddelde). De nummering van de monsters is voor alle 5 groepen gelijk.

Tabel 8: Resultaten antibiotica vrije monsters

Antibioticum/Groep	aantal	Gem count (cpm)	St. dev	VC %
aminoglycosiden	25	1957	173	8,8
macroliden	32	1756	185	10,5
tetracycline	31	1975	231	11,7
novobiocine	32	2291	235	10,3
chlooramfenicol	20	2693	268	10,0

St. dev = standaarddeviatie

VC% = relatieve variatiecoëfficiënt

Over het algemeen komen de blanco waarden goed overeen met de door Charm opgegeven blanco waarden voor deze batches antibiotica.

3.4 Praktijkmonsters melk met bacteriegroeiremmende stoffen

Het aantal monsters waarin naar bacteriegroeiremmende stoffen werd gezocht staat vermeld in Tabel 9. In de Figuren 1 t/m 5 staan de resultaten weergegeven; de driehoekjes stellen de counts voor van de positieve monsters (GR).

Tabel 9: Aantal onderzochte monsters melk die bacteriegroeiremmende stoffen bevatten.

antibioticum/groep	aantal
aminoglycosiden	42
macroliden	46
tetracycline	46
novobiocine	45
chlooramfenicol	45

In de inleiding is vermeld dat het aantal counts bepaalt of een monster al dan niet positief is. Indien het aantal counts lager is dan een gedefinieerd kritisch punt wordt een monster positief aangemerkt. Charm schrijft als kritische waarde 70-75%, afhankelijk van de antibioticumgroep, van de counts van de blanco standaard van de Zero Milk Powder voor [10].

Uit de gemeten counts is op een eigen wijze het kritisch punt berekend; namelijk het gemiddelde van de count van de monsters zonder groei remming minus 3x de standaardafwijking. Het blijkt dat het zo berekende kritisch punt ongeveer overeenkomt met een percentage van 70 van de gemiddelde zero count (Tabel 10). Dit percentage komt dus overeen met wat Charm opgeeft voor de berekening van het kritisch punt.

Tabel 10: Kritisch punt (count) waar beneden monsters positief zijn

Antibioticum/groep	kritisch punt (cpm)	percentage van de gem zero count (%)
aminoglycosiden	1438	73
macroliden	1201	68
tetracycline	1282	65
novobiocine	1586	69
chlooramfenicol	1889	70

In Tabel 11 staat een overzicht van de resultaten van de verdachte monsters die onderzocht zijn met de Charm II test. Een monster is als positief aangemerkt indien de count lager was dan de gemiddelde count minus 3x de standaarddeviatie.

Tabel 11: Resultaten van de bepaling van antibiotica in verdachte monsters melk met de Charm II test

* = positief voor een of meerdere groepen (28)

+ = positief voor desbetreffende groep

- = negatief voor desbetreffende groep

nd= niet gedaan

Monsternummer (GR)	Amino-glycosiden	Macro-liden	Tetra-cyclinen	Novo-biocine	Chloor-amfenicol
1	-	-	-	-	-
* 2	+	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	nd	nd	nd	nd	nd
7	-	-	-	-	-
* 8	+	-	+	-	-
* 9	-	-	-	-	+
* 10	-	+	-	-	-
* 11	+	-	+	-	-
12	-	-	-	-	-
* 13	+	-	+	-	-
14	-	-	-	-	-
* 15	-	+	-	-	-
* 16	+	-	+	-	-
17	-	-	-	-	-
* 18	+	-	+	-	-
* 19	+	+	-	-	-
* 20	-	-	+	-	-
21	-	-	-	-	-
* 22	+	+	+	-	-
* 23	+	+	-	-	-
* 24	+	+	+	-	-
25	-	-	-	nd	-
* 26	+	-	+	-	-
27	nd	nd	nd	nd	nd
* 28	+	-	+	-	-
29	-	-	-	-	-
* 30	-	-	+	-	-
31	-	-	-	-	-
* 32	+	-	+	-	-
* 33	+	-	+	-	-
34	-	-	-	-	-
* 35	+	-	+	-	-
* 36	+	-	+	-	-
* 37	+	-	-	-	-
* 38	-	+	-	-	-
39	-	-	-	-	-
40	nd	-	-	-	-
* 41	+	-	-	-	-
* 42	nd	+	-	-	-
* 43	nd	-	+	-	-
44	nd	-	-	-	nd

	45	+	-	+	-	-
*	46	nd	-	+	-	-
	47	nd	-	-	-	-
	48	nd	-	-	-	-

Totaal:	48	42	46	46	45	45
Positief:		19	8	19	0	1
Percentage:		45	17	41	0	2

In 28 van de 46 monsters melk die met de Charm II test zijn onderzocht kon de bacteriegroei-remmende stof met behulp van de Charm II test geïdentificeerd worden. Dit betekent dat in 18 monsters niets aangetoond kon worden terwijl deze wel positief waren met de screeningsmethode van deze monsters. Van deze 18 monsters waren 5 monsters echter niet voor alle groepen getest. Een mogelijke verklaring voor het negatief vinden van de resterende 13 monsters is dat de monsters waren ingevroren. Bij het ontdooien was een lichte coagulatie waarneembaar. Om de achteruitgang in kwaliteit van de monsters zo veel mogelijk te beperken zijn de monsters 13 t/m 48 onder koud stromend water ontdooid in plaats van warm stromend water. Bovendien waren van de 13 monsters die voor alle 5 Charm-testen negatief waren er 5 die net boven het kritisch punt lagen; bij direct onderzoek van deze monsters waren deze wellicht wel positief geweest (de monsters zijn immers al een aantal keren opgewarmd en afgekoeld bij het screeningsonderzoek en ook nog eens ingevroren hetgeen de kwaliteit van de monsters niet ten goede komt). De monsternummers 43 t/m 46 werden met behulp van hoogspanningselectroforese onderzocht op de aanwezigheid van neomycine; alle 4 monsters waren positief voor neomycine. Helaas kon voor niet alle monsters de Charm II test uitgevoerd worden wegens bederf van de monsters. Alleen monster 45 kon bevestigd worden voor aminoglycoside (neomycine behoort tot de aminoglycosiden). Ook werden de monsters 43 t/ 46 bevestigd voor tetracycline met behulp van een HPLC-methode. Monsternummer 44 was wederom negatief, de andere drie waren positief; dit is overeenkomstig met de resultaten van de Charm II test.

Het blijkt ook dat monsters positief zijn voor meerdere groepen door het gebruik van combinatiepreparaten. De monsternummers 2, 8, 11, 13, 16, 18, 28, 32, 33, 35, 36 en 45 waren positief voor zowel aminoglycosiden als tetracyclinen. De monsternummers 19 en 23 waren beide positief voor zowel aminoglycosiden als macroliden. De monsternummers 22 en 24 waren positief voor zowel aminoglycosiden als macroliden als tetracyclinen.

4 CONCLUSIES

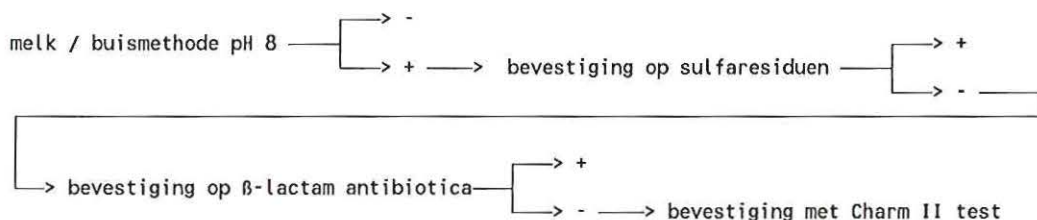
Met de Charm II test kan de aanwezigheid van verschillende (groepen van) antibiotica worden vastgesteld. Indien het aantal counts lager is dan een gedefinieerd kritisch punt, wordt het monster positief beoordeeld op de aanwezigheid van de betreffende antibioticumgroep. Voorgesteld wordt om dit kritisch punt te berekenen door het gemiddelde van blanco monsters te verminderen met 3 maal de standaardafwijking van deze blanco monsters. Als blanco monsters kunnen zowel gebruikt worden de Charm Zero Milk Powder als steriele volle en magere melk (Tabel 6).

Praktijkmonsters antibiotica vrije melk bleken een count te hebben die overeenkwam met die van blanco - Charm en steriele volle en magere melk (tabel 6 en 8).

Uit het onderzoek op Rikilt-DLO is gebleken dat de detectiegrenzen van de geteste antibiotica steeds lager waren dan van de screeningsmethode (buismethode pH 8,0) (Tabel 7). Indien dus een monster positief wordt bevonden met de screeningsmethode en er is geen β -lactam antibioticum of sulfonamide aangetoond in het vervolgonderzoek dan moet bevestiging met de Charm II test mogelijk zijn. Sinds april 1993 wordt de Charm II test dan ook toegepast bij de bevestiging van bacteriegroeiremmende stoffen volgens figuur 2.

Van 46 praktijkmonsters die met de screeningsmethode positief waren bevonden en geen β -lactam antibiotica of sulfonamiden bevatten, bleken 28 monsters (61%) positief te zijn met de Charm II test. De behandeling van de monsters (opwarmen, afkoelen, invriezen, ontdooien) heeft waarschijnlijk in de overige monsters geleid tot een verlies van activiteit van de bacteriegroeiremmende stoffen. Het toepassen van de Charm II test op grote schaal op de melkcontrolestations sinds april 1993 zal juiste informatie geven over de effectiviteit van de Charm II test bij de bevestiging van de bacteriegroeiremmende werking die in de screeningsmethode is vastgesteld.

In Figuur 2 staat het schema van het onderzoek op bacteriegroeiremmende stoffen en welke rol de Charm II test daarin speelt.



Figuur 2: Schematische weergave onderzoek bacteriegroeiremmende stoffen in melk

LITERATUUR

- 1 Heeschen, W.H. Residues of antibiotics and sulphonamides in milk: significance and toxicological evaluation: legal situation within the European Community (EC); method-related activities of the International Dairy Federation (IDF). Symposium Lund (1991). IDF Bulletin "Inhibitory substances in milk. Current analytical practice", chapter 8, in press.
- 2 Carlsson, Å. and L. Björck. Detection of antibiotic residues in herd and tanker milk. A study of the Charm-test II. *Milchwissenschaft* 44 (1), 1989. pp 7-10.
- 3 Commission Regulation (EEC) No. 675/92 of 18 March 1992, amending Annexes I and III of Council Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Requirements, Fulfilment of requirements by various test, June 1992.
- 4 Voorschriften voor het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk. Hoofdstuk 8 (1993). Centraal Orgaan voor Melkhygiëne (COM). Postbus 74, 4200 AB Gorinchem.
- 5 Vermunt, A.E.M., J. Stadhouders, G.J.M. Loeffen and R. Bakker. Improvements of the tube diffusion method for detection of antibiotics and sulfonamides in raw milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47 (1993), pp 31-40.
- 6 Suhren, G. and W. Heeschen. Improved detection of tetracyclines in milk with a modified microbial receptor assay (Charm-test II) and agar diffusion tests. *Milchwissenschaft* 45 (6) 1990. pp 343-347.
- 7 Carlsson, Å., L. Björck and G. Johnsson. The use of different microbial assays in combination with the Charm II test in the detection of antibiotic residues in herd milk. *Int. Dairy Journal* 2 (1992). pp 109-119.
- 8 Suhren G. and W. Heeschen. Detection of antibiotics in milk with a modified microbial receptor assay (Charm-test II). *Milchwissenschaft* 42 (8) 1987. pp 493-496.
- 9 Charm S.E. and R.K. Chi. Rapid screening assay for beta-lactam antibiotics in milk: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65 (5) 1982. pp 1186-1192.
- 10 Operator's Manual for Charm II test, Charm Sciences Inc. U.S. Patents 4.239.745 & 4.239.852

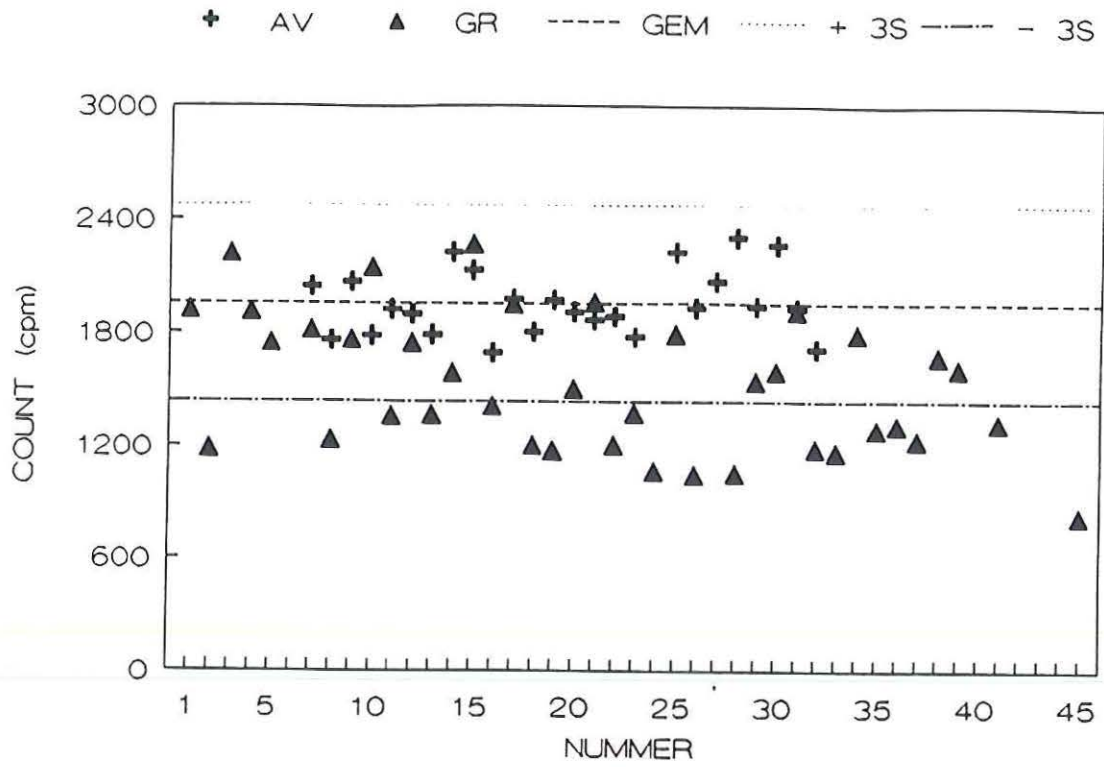
FIGUUR 3 t/m 7

Bepaling van (5 groepen) antibiotica in verdachte monsters melk met behulp van de Charm II test.

- + = count van de antibiotica vrije monsters
- ▲ = count van de monsters met groeiremming
- = gemiddelde van de count van de antibiotica vrije monsters
- = gemiddelde plus 3x de standaardafwijking antibiotica vrije monsters
- :-:- = gemiddelde minus 3x de standaardafwijking antibiotica vrije monsters

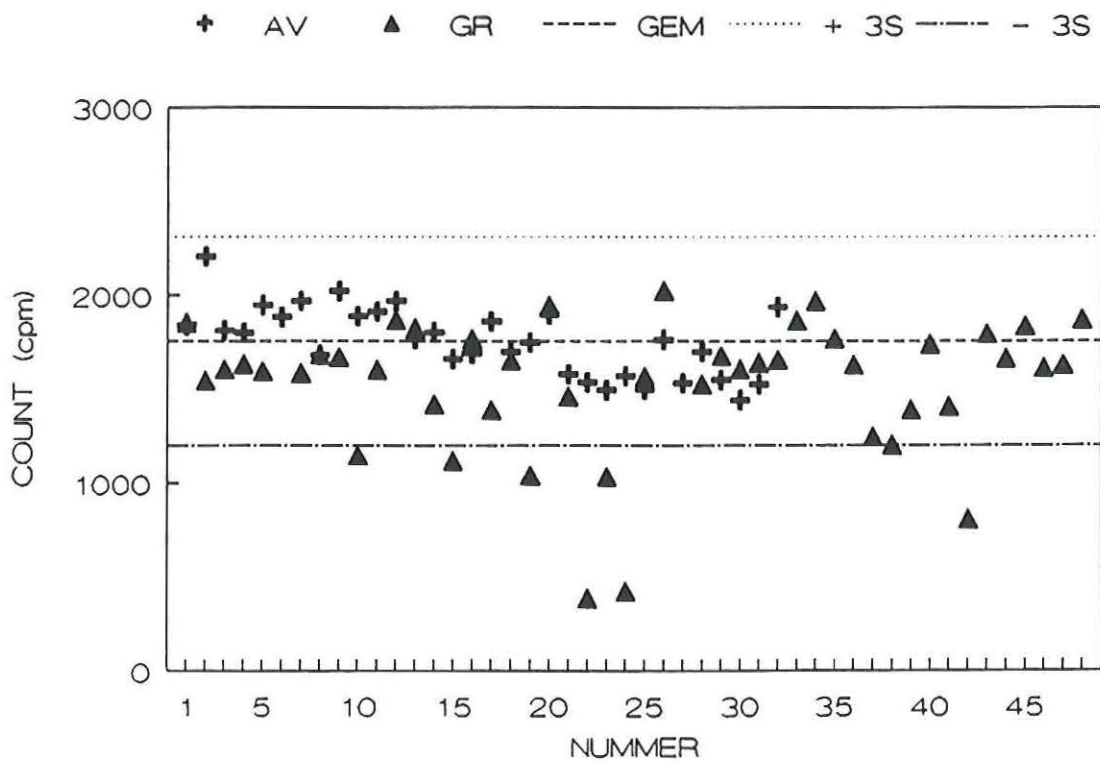
Figuur 3

AMINOGLYCOSIDE



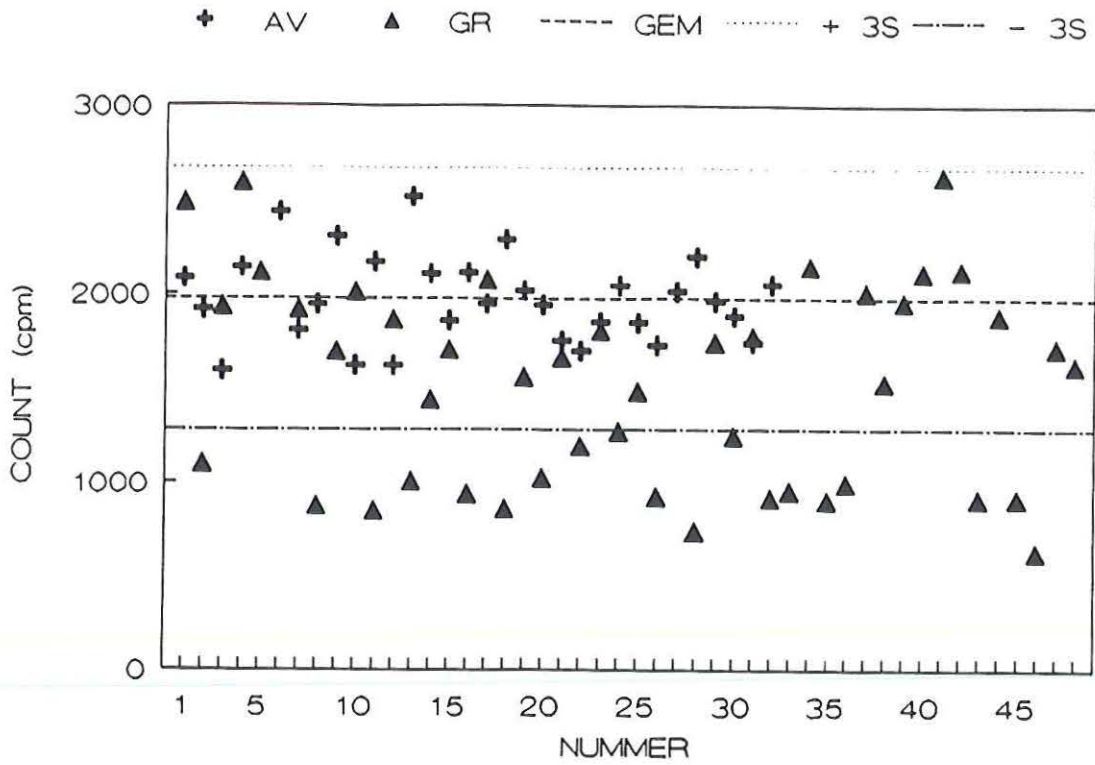
Figuur 4

ERYTHROMYCINE



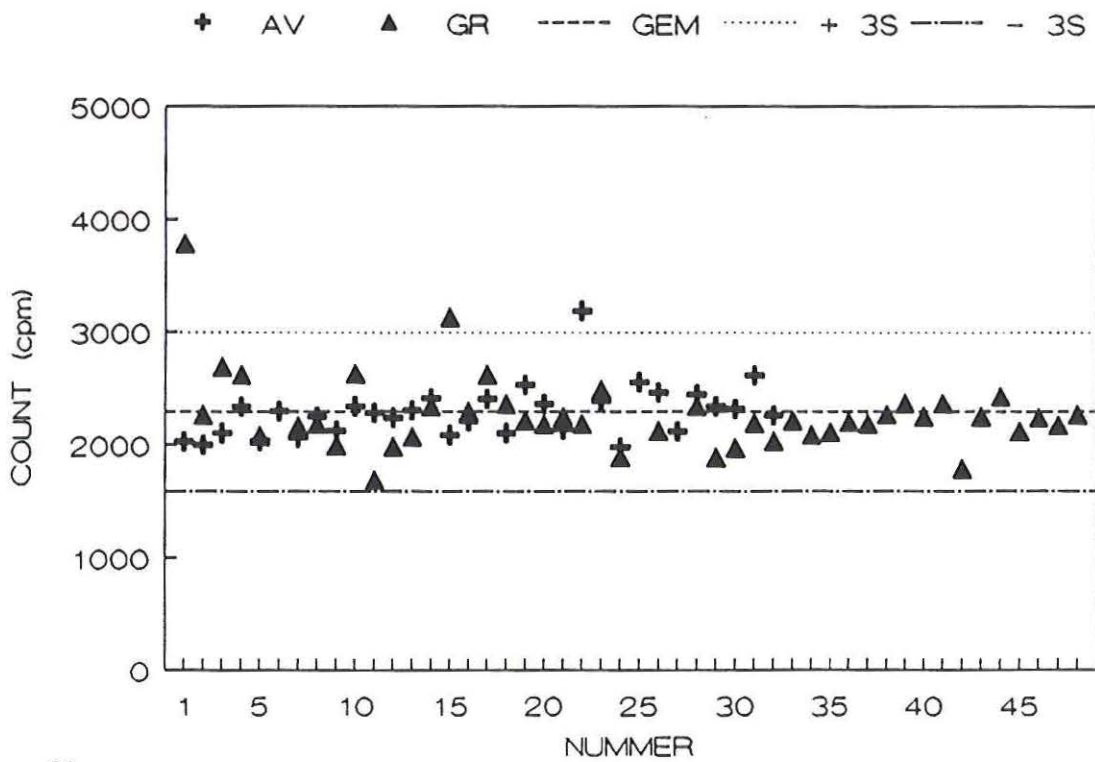
Figuur 5

TETRACYCLINE



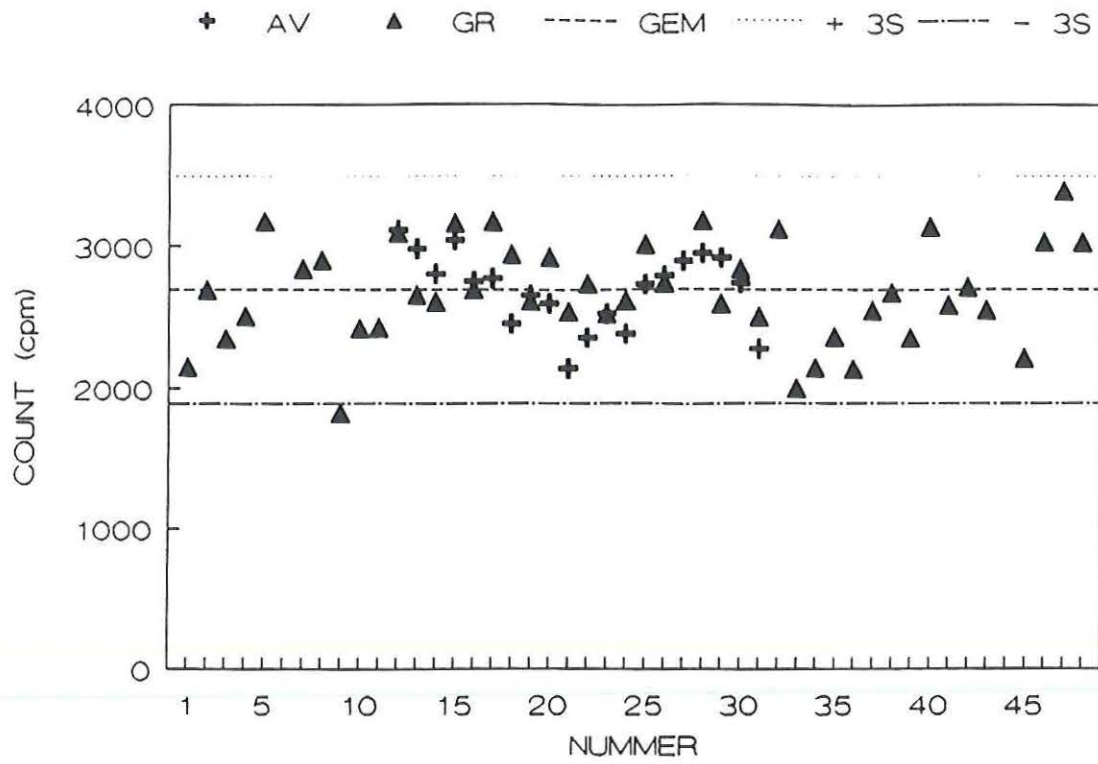
Figuur 6

NOVOBIOCINE



Figuur 7

CHLOORAMFENICOL



FIGUUR 8 t/m 18

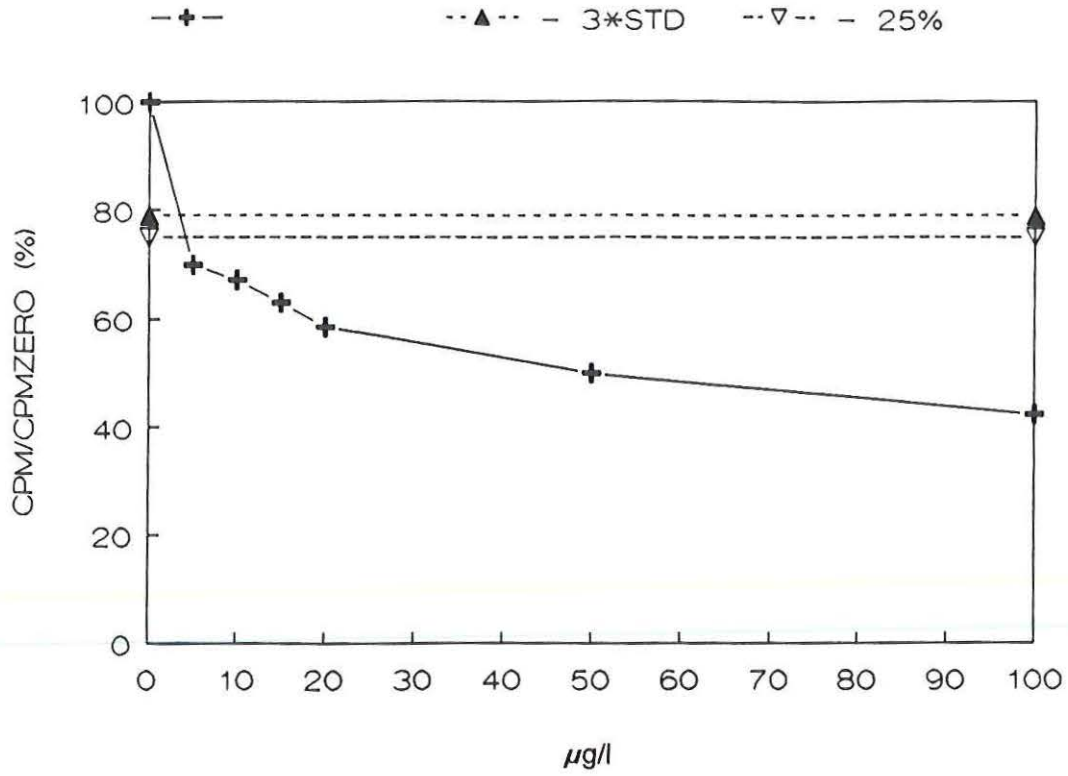
Bepaling van verschillende antibiotica in diverse soorten melk met behulp van de Charm II test.

- + = count van de bijbehorende concentratie
- ▲-- = kritisch punt, berekend aan de hand van het gemiddelde van de blanco minus 3x de standaardafwijking van de blanco.
- ▽-- = kritisch punt, berekend aan de hand van de blanco minus een door Charm opgegeven vast percentage van de blanco.

Figuur 8

GENTAMYCINE

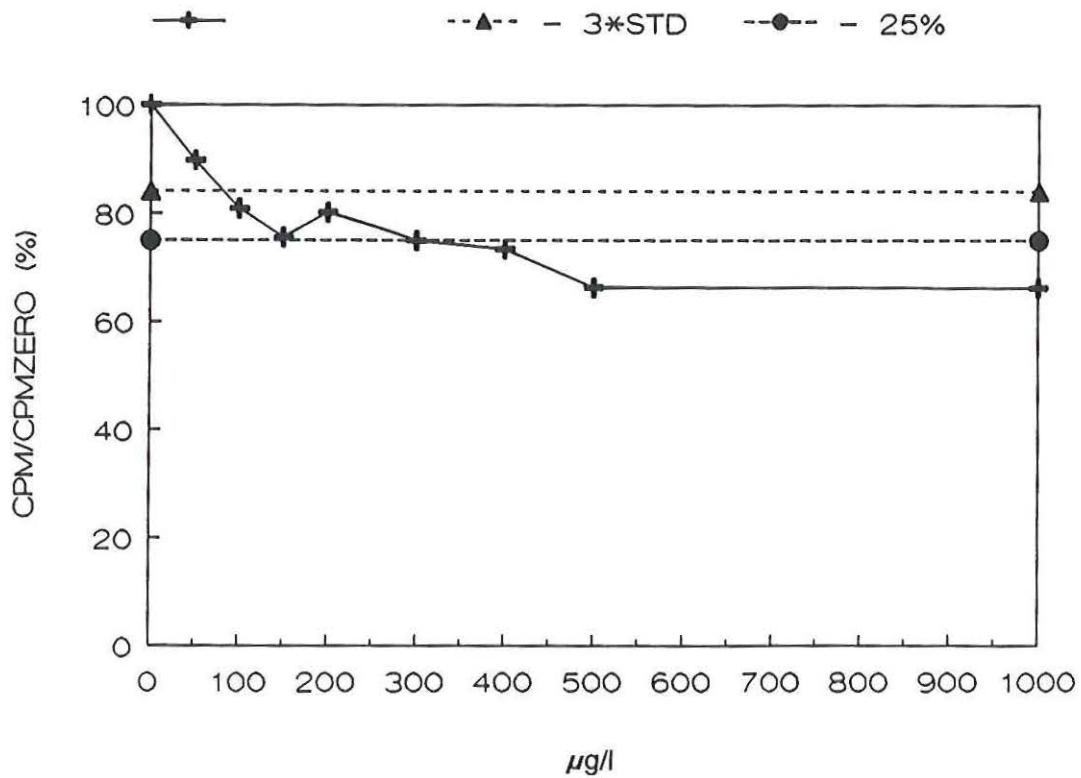
steriele magere melk



Figuur 9

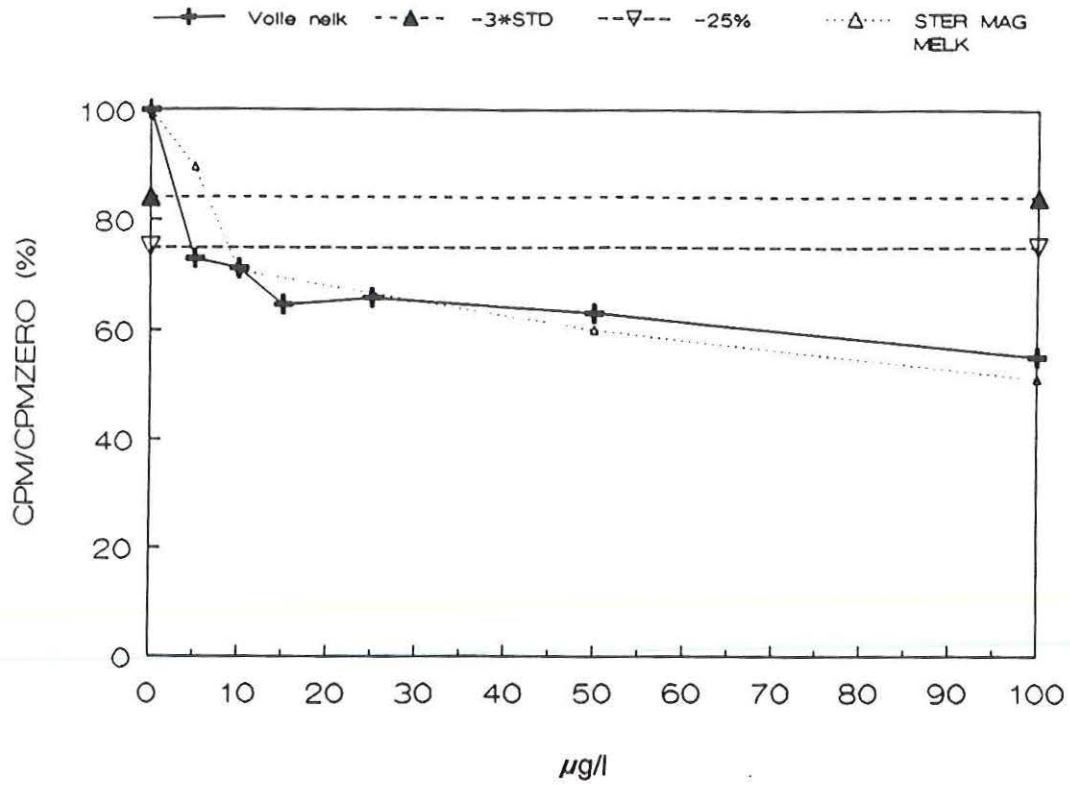
KANAMYCINE

VOLLE MELK



Figuur 10

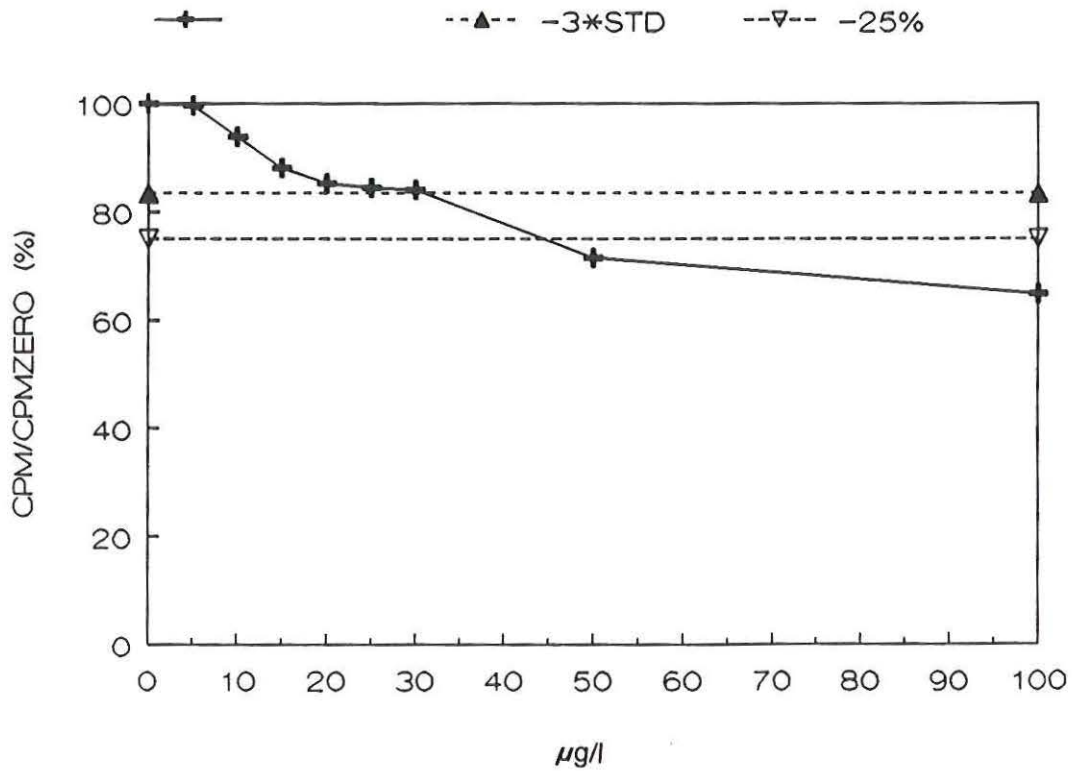
NEOMYCINE



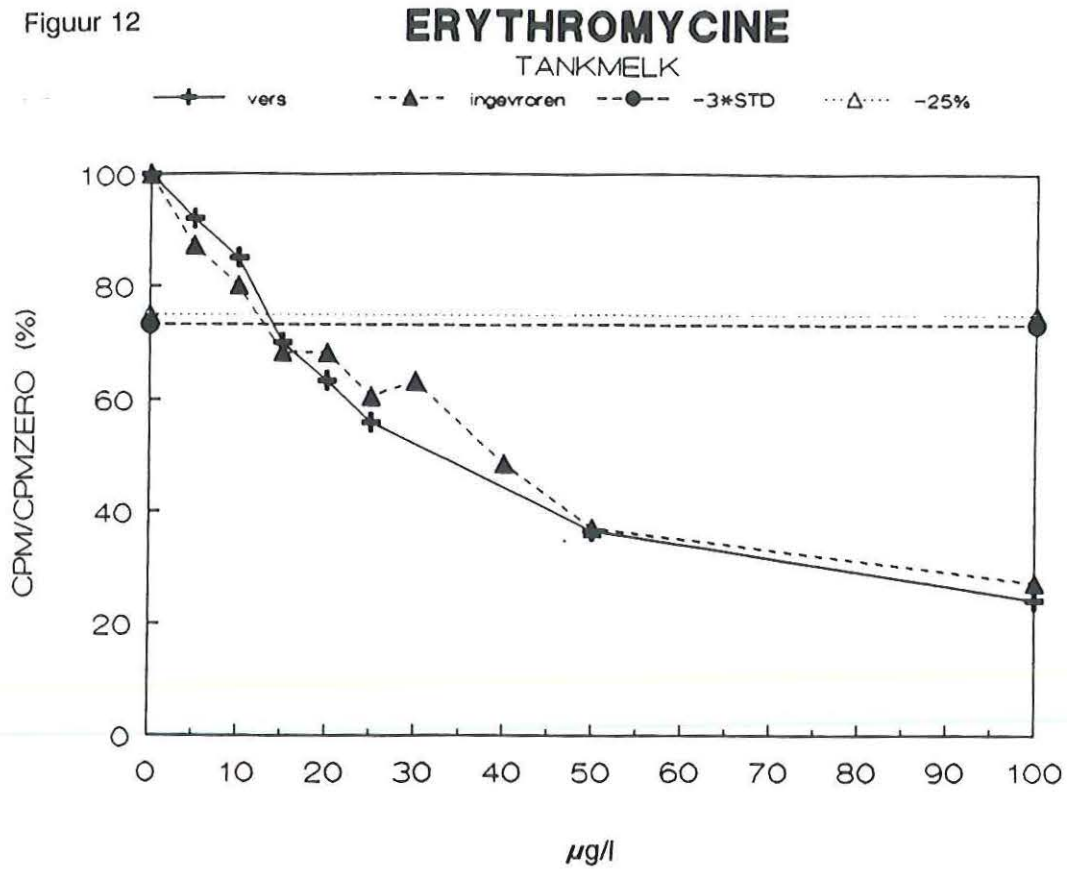
Figuur 11

STREPTOMYCINE

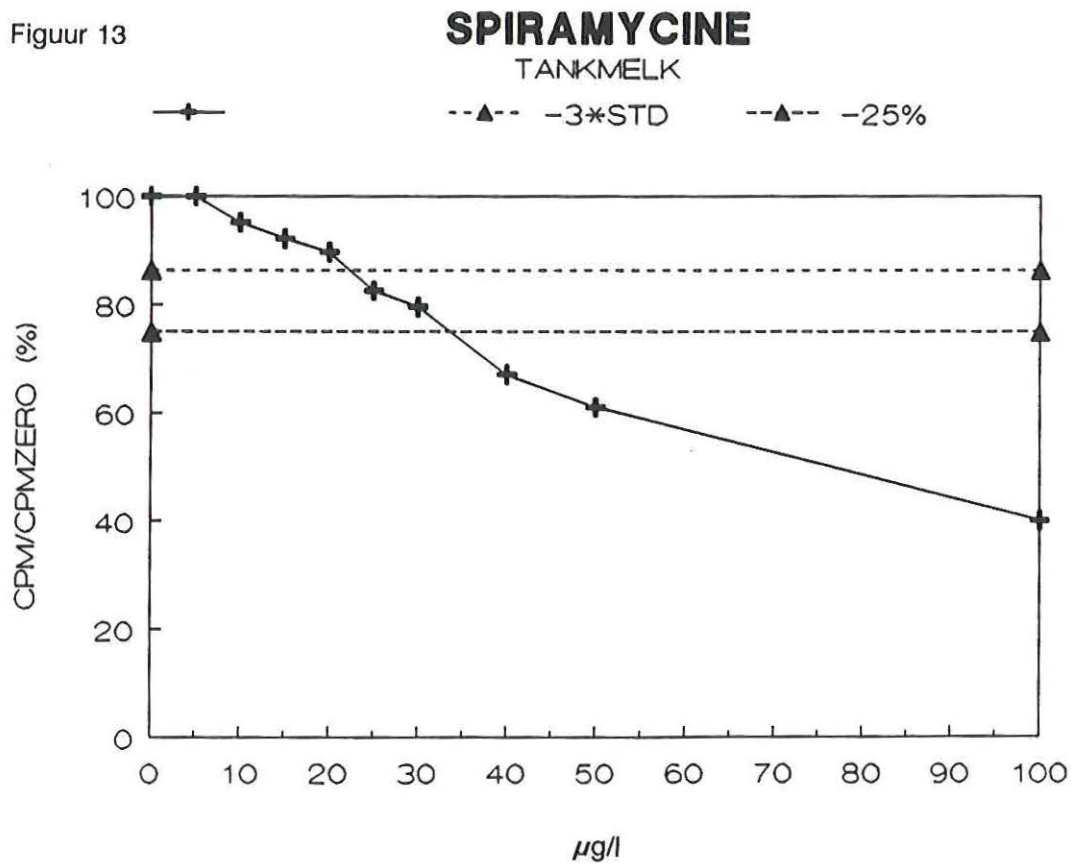
VOLLE MELK



Figuur 12



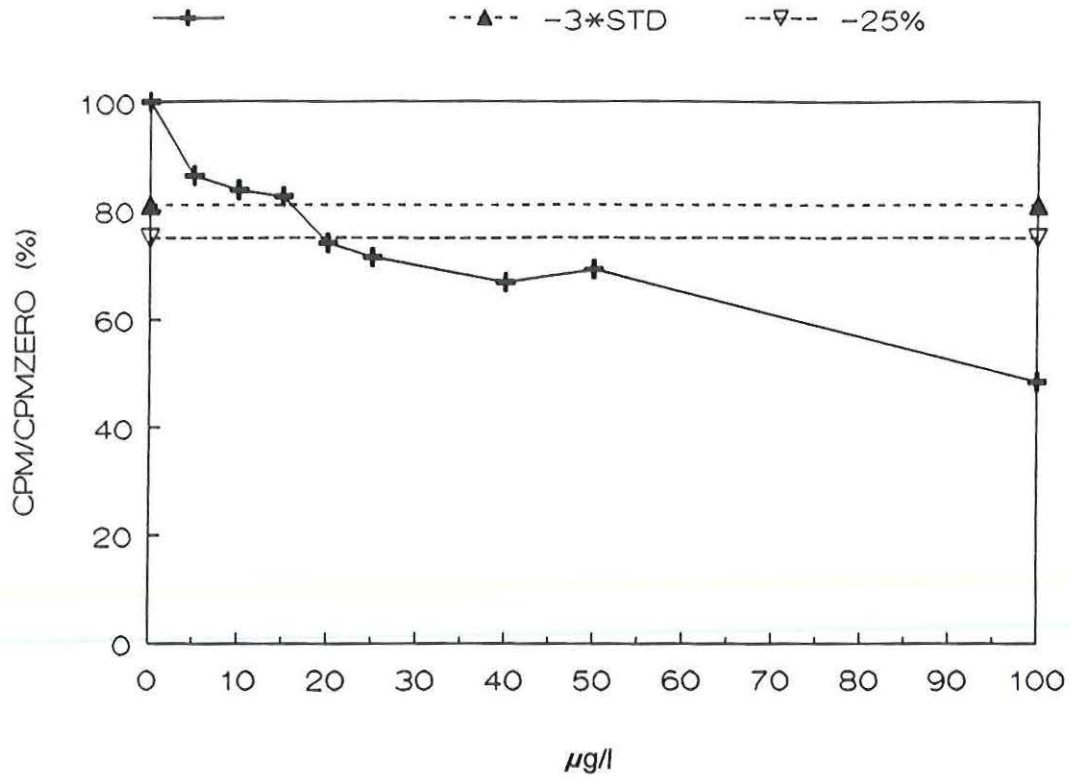
Figuur 13



Figuur 14

TYLOSINE

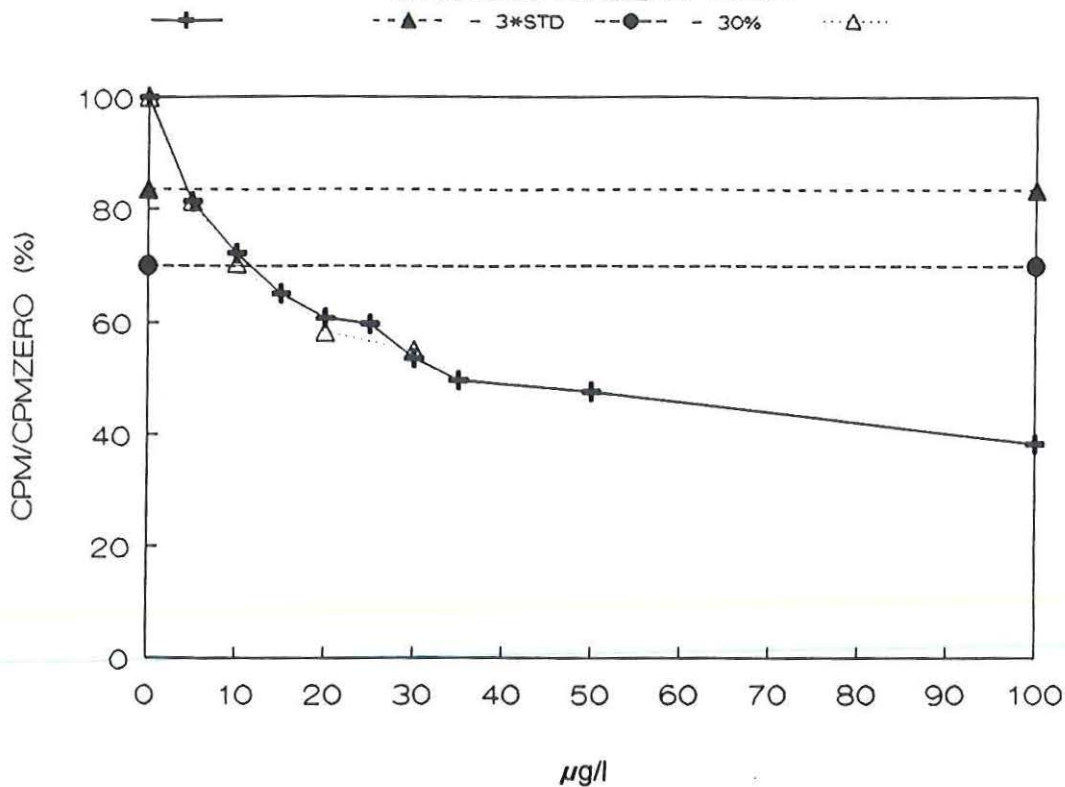
TANKMELK



Figuur 15

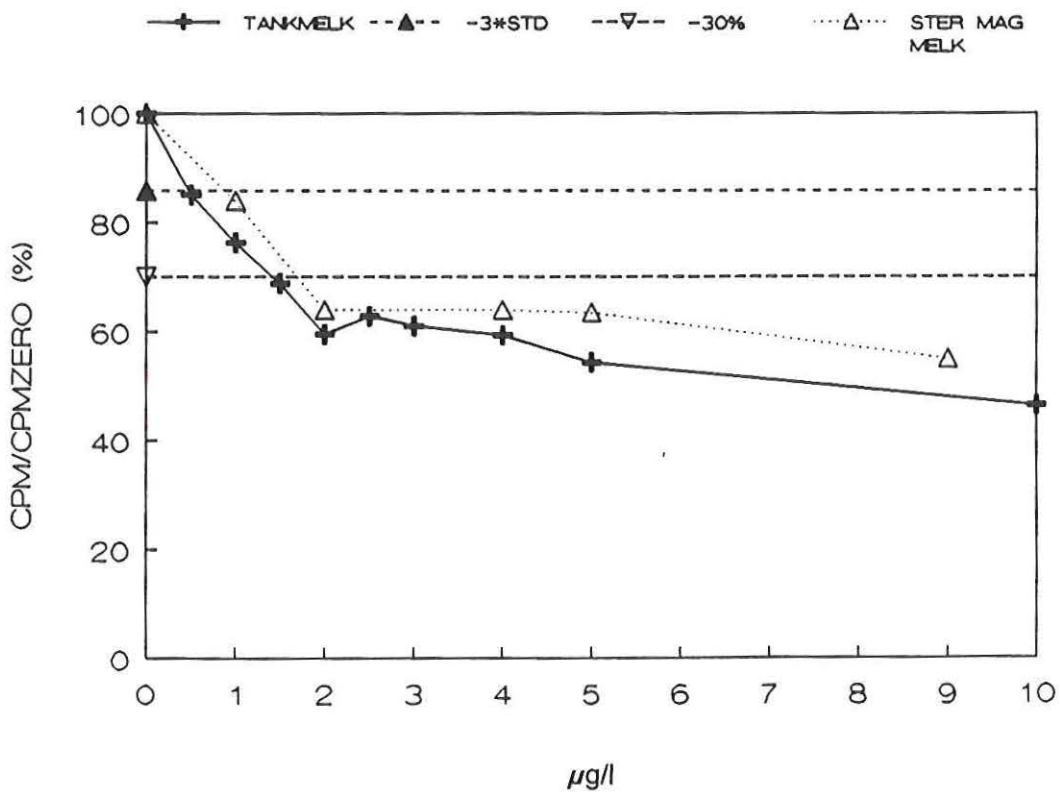
OXYTETRACYCLINE

STERIELE MAGERE MELK



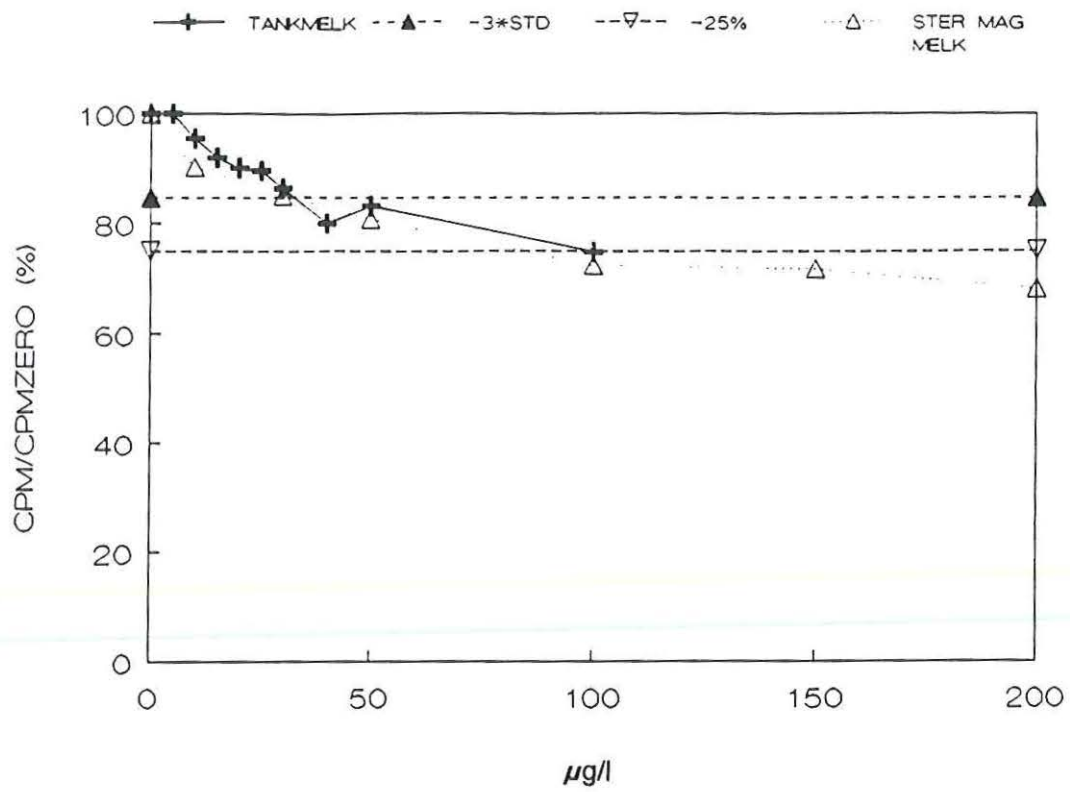
Figuur 16

TETRACYCLINE



Figuur 17

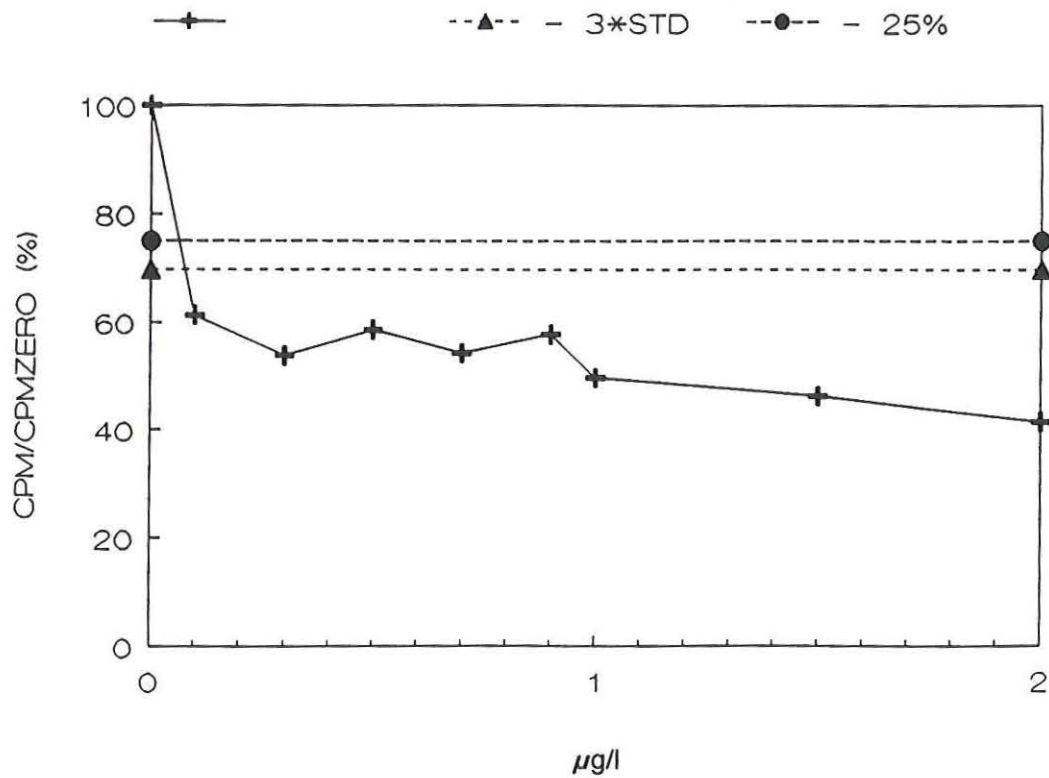
NOVOBIOCINE



Figuur 18

CHLOORAMFENICOL

STERIELE MAGERE MELK



BIJLAGE

Overdruk van Aantonen van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen

**Voorschriften voor het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk
en de uitbetaling van boerderijmelk naar gelang van de kwaliteit**

Hoofdstuk 8

AANTONEN VAN MELKVVREEMDE BACTERIEGROEI-REMMEDE STOFFEN

ONDERWERP EN TOEPASSINGS-GEBIED

Dit voorschrift is een voorschrift als bedoeld in artikel 3, lid 1 van de statuten van de Stichting Centraal Orgaan voor Melkhygiëne te 's-Gravenhage, en beschrijft de methode voor het aantonen van de aanwezigheid van melkvvreemde bacteriegroei-remmende stoffen in boerderijmelk.

A. SCREENINGSMETHODE

Met deze methode worden monsters rauwe melk opgespoord die hiermee aantoonbare hoeveelheden bacteriegroei-remmende stoffen bevatten.

B. BEVESTIGINGSPROEF EN AANTONEN VAN SULFARESIDUEN

Deze methode dient om in de met methode A opgespoorde monsters de aanwezigheid van melkvvreemde bacteriegroei-remmende stoffen te bevestigen, en de aanwezigheid van sulfonamidenresiduen aan te tonen.

C. HET AANTONEN VAN DE AANWEZIGHEID VAN (SEMI-SYNTHETISCHE) PENICILLINEN

Deze methode dient om de aanwezigheid van penicillinen en semi-synthetische penicillinen aan te tonen. Het onderzoek wordt uitgevoerd met de monsters waarin de aanwezigheid van melkvvreemde bacteriegroei-remmende stoffen volgens methode B wel is bevestigd, maar die geen sulfonamidenresiduen blijken te bevatten.

D. HET AANTONEN VAN DE AANWEZIGHEID VAN EEN OF MEER BACTERIE-GROEI-REMMEDE STOFFEN VAN DE GROEPEN AMINOGLYCOSIDEN, MACROLIDEN, EN TETRACYCLINEN, VAN NOVOBIOCINE EN CHLOORAMFENICOL

Met behulp van de Charm II-test wordt nagegaan of in de monsters waarin melkvvreemde bacteriegroei-remmende stoffen zijn aangetoond, maar die geen sulfonamiden noch penicillinen of semi-synthetische penicillinen blijken te zijn, een of meer antibiotica kunnen worden aangetoond die behoren tot een van de in de titel genoemde (groepen van) antibiotica.

E. SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN HET AANTONEN VAN MELKVVREEMDE BACTERIEGROEI-REMMEDE STOFFEN

De onderzoekinstelling draagt er zorg voor dat de uitslagen van het onderzoek worden geregistreerd volgens het schema in bijlage 2.

A. **SCREENINGSMETHODE**

A.1 **ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED**

Deze methode beschrijft het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in rauwe melk.

A.2 **DEFINITIE**

De melk wordt geacht bacteriegroeiremmende stoffen te bevatten of te kunnen bevatten, indien de kleur van het medium bij toepassing van de hier beschreven werkwijze niet algeheel geel is geworden.

A.3 **BEGINSEL**

Een hoeveelheid melk wordt toegevoegd aan een agarmedium, waaraan sporen van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, stam ATCC 10149 (A.4.1.7 en A.4.1.8), een pH-indicator en trimethoprim zijn toegevoegd.

Groei van en zuurproductie door het organisme veroorzaakt kleurverandering van de pH-indicator van paars naar geel. De aanwezigheid in de melk van stoffen die remmend werken op de groei van het organisme, heeft tot gevolg dat de kleur van het medium langer paars blijft dan de kleur van het medium in de buizen met controlemelk (A.4.3).

De aantoonbare concentraties (100 % positieve uitslagen) van verschillende bacteriegroeiremmende stoffen zijn weergegeven in onderstaande tabel in ug/ml (pH van het medium 8,0).

Stof	Aantoonbare concentratie (ug/ml)
Beta-lactam antibiotica	
penicillinen	
benzylpenicilline	0,003*
ampicilline	0,002
cloxacilline	0,02
cefalosporinen	
cefalosporine C	0,6
Tetracyclinen	
oxytetracycline	0,4
Aminoglycosiden	
streptomycine	0,3
neomycine	0,03
kanamycine	2,3
Macroliden	
spiramycine	0,5
erythromycine	0,01
Sulfonamiden	
dapson	0,002
sulfamethazine	0,4
Novobiocine	2,0
Chlooramfenicol	5,0

* Uitgedrukt in Internationale Eenheden/ml

A.4 MEDIA, REAGENTIA EN TESTORGANISME

De bestanddelen van de media moeten geschikt zijn voor bacteriologisch onderzoek. Het gebruikte water moet in glas gedestilleerd zijn of gedemineraliseerd water zijn van ten minste gelijke zuiverheid. Het mag geen stoffen bevatten die remmend zijn voor micro-organismen.

A.4.1 Media

A.4.1.1 Basismedium *)

- Samenstelling	
Gistextract	2,5 g
Trypton	5,0 g
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1,0 g
Agar	10-15 g
Water	1000 ml

*) In de handel verkrijgbaar onder de naam Plate Count Agar.

- Bereiding

Los de ingrediënten onder verwarming op in het water. Stel de pH van de oplossing zo in, dat deze na sterilisatie $7,0 \pm 0,2$ bedraagt, gemeten bij 25 °C. Verdeel in hoeveelheden van 7 ml in cultuurbuizen (A.5.2.4), om schuine agars te maken, of in hoeveelheden van ten hoogste 1000 ml in flessen. Steriliseer het aldus bereide medium gedurende 15 min bij 121 ± 1 °C.

Opmerking

Ter controle van een batch "Plate Count Agar" wordt met behulp van het daarmee bereide proefmedium (A.4.1.9), de standaard-oplossingen van penicilline (A.4.2.1.3) en dapson (A.4.2.2.4) en de controle-melk A (A.4.3) nagegaan of de resultaten gelijk zijn aan die verkregen met de oude batch (zie A.6, A.7.1 en A.7.3). Indien deze niet gelijk zijn, dient men een andere batch te gebruiken. Tevens dient te worden nagegaan of de detectiegrenzen worden gehaald.

A.4.1.2 Trimethoprimoplossing

Trimethoprim	25 mg
Ethanol 96%	5 ml
Water	tot 1000 ml

Los het trimethoprim op in de ethanol, en vul aan met water tot 1000 ml. De oplossing is 1 week houdbaar, mits in het donker bij een temperatuur van 0-5 °C bewaard.

A.4.1.3 Broomcresolpurperoplossing

Broomcresolpurper	250 mg
Ethanol 96%	5 ml
Water	tot 100 ml

Los de broomcresolpurper op in de ethanol, en vul aan met water tot 100 ml. De oplossing is 6 maanden houdbaar, mits in het donker bij een temperatuur van 0-5 °C bewaard.

A.4.1.4 Voedingsmedium*) voor het kweken van het testorganisme (A.4.1.7.1)

-Samenstelling

Vleesextract	3,0	g
Pepton	5,0	g
Agar	15,0	g
Water	1000	ml

*)In de handel verkrijgbaar onder de naam Nutriënt Agar.

-Bereiding

Los de ingrediënten onder verwarming op in het water. Stel de pH zodanig in, dat deze na sterilisatie $7,4 \pm 0,1$ bedraagt bij $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Verdeel in hoeveelheden van 7 ml in cultuurbuizen (A.5.2.4), of in hoeveelheden van ten hoogste 1000 ml in flessen, en steriliseer gedurende 15 min bij $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Laat de buizen in schuine stand stollen. Het medium in deze buizen en flessen is, in het donker bij een temperatuur van $0-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bewaard, gedurende 4 weken houdbaar.

A.4.1.5 Sporulatiemedium

-Samenstelling

Vleesextract	3,0	g
Pepton	5,0	g
Mangaansulfaat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	31,3	mg
Agar	15,0	g
Water	1000	ml

-Bereiding

Los de ingrediënten onder verwarming op in het water. Stel de pH van de oplossing zo in dat deze na sterilisatie $7,4 \pm 0,1$ bedraagt, gemeten bij $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Verdeel in hoeveelheden van ten hoogste 1000 ml in flessen. Steriliseer het aldus bereide medium gedurende 15 min bij $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Het medium is gedurende 4 weken houdbaar, mits in het donker bij een temperatuur van $0-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bewaard.

Smelt het medium voor gebruik op, en giet het na afkoelen uit in petrischalen met een diameter van ca. 14 cm in hoeveelheden van ca. 75 ml. Laat het medium stollen.

A.4.1.6 Zoutoplossing

Natriumchloride (NaCl)	8,5	g
Water	1000	ml

Los het zout op in het water, en steriliseer de oplossing gedurende 15 min bij $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.4.1.7 Testorganisme

A.4.1.7.1 Bacillus stearothermophilus var. calidolactis, stam ATCC 10149. Stam ATCC 10149 is identiek aan stam C 953, NIZO-collectie.

- A.4.1.7.2 Maak een voorraadcultuur om het testorganisme te kunnen bewaren. Ent het testorganisme met een entoogje op het schuin gestolde basismedium (A.4.1.1) in de buizen. Bebroed aëroob gedurende 48 h bij 63 ± 1 °C.
Neem de cultuur op in 2 ml zoutoplossing (A.4.1.6) per cultuurbuis, en bewaar deze oplossing bij -20 °C.
Deze cultuur is ten minste 2 jaar houdbaar.
- A.4.1.8 Sporensuspensie
Maak bij voorkeur gebruik van de sporensuspensie die bij Melkcontrolestation "Noord-Oost Nederland" verkrijgbaar is. De bereidingswijze van de sporensuspensie is als volgt.
- A.4.1.8.1 Bereid entmateriaal voor het bereiden van de sporensuspensie. Ontdooi de tot sporulatie te brengen voorraadcultuur (A.4.1.7.2), en ent dit op het voedingsmedium (A.4.1.4) overgebracht in steriele petrischalen. Bebroed gedurende 24 h bij 63 ± 1 °C.
- A.4.1.8.2 Neem de cultuur op in 2 ml zoutoplossing (A.4.1.6) per petrischaal door het bacteriemateriaal met behulp van een steriele entnaald van de voedingsbodem af te halen en met de vloeistof te mengen.
- A.4.1.8.3 Breng 1 ml van de bacteriesuspensie (A.4.1.8.2) op het sporulatiemedium overgebracht in petrischalen (A.4.1.5). Spreid de suspensie met behulp van een steriele Drigalsky spatel gelijkmatig over de voedingsbodem uit.
Ent op deze wijze een voldoende aantal petrischalen. Verpak deze petrischalen in een plastic zak, en bebroed ze gedurende 3 dagen bij 63 ± 1 °C.
- A.4.1.8.4 Breng na bebroeden (A.4.1.8.3) 5 ml zoutoplossing (A.4.1.6) op iedere plaat, en suspendeer het bacteriemateriaal in de vloeistof met behulp van een steriele Drigalsky spatel. Verzamel de suspensie in grote steriele centrifugebuizen (A.5.1.6), en controleer desgewenst de suspensie met behulp van de microscoop (A.5.1.5) op reinheid en sporulatie.
- A.4.1.8.5 Centrifugeer de suspensie gedurende 10 min bij 3000 g. Pipetteer de bovenstaande vloeistof af. Suspendeer het sediment van de hoeveelheid suspensie verkregen onder A.4.1.8.4 opnieuw in ca. 10 ml zoutoplossing (A.4.1.6) of veelvouden daarvan, en centrifugeer weer gedurende 10 min bij 3000 g. Pipetteer de bovenstaande vloeistof af. Herhaal het wassen van de suspensie in ca. 10 ml zoutoplossing (A.4.1.6) of veelvouden daarvan en het centrifugerende gedurende 10 min bij 3000 g. De bovenstaande vloeistof is dan helder. Suspendeer vervolgens het sediment in ca. 10 ml zoutoplossing (A.4.1.6) of veelvouden daarvan. De gehele bewerking dient aseptisch met steriele media en steriel glaswerk te worden uitgevoerd.
- A.4.1.8.6 Verhit de aldus verkregen suspensie gedurende 10 min in een waterbad bij 80 ± 1 °C. Koel snel af onder stromend water, en bewaar de sporensuspensie bij 0-5 °C. Verricht een telling van het aantal sporen. Verdun de suspensie met zoutoplossing (A.4.1.6) tot een concentratie van ca. 10^7 sporen per ml. De aldus verkregen sporensuspensie is, mits in het donker bij een temperatuur van 0-5 °C bewaard, een jaar houdbaar.

Opmerking

Het aantal sporen kan worden bepaald door 1 ml van decimale verdunningen (10^{-4} t/m 10^{-8}) over te brengen in petrischalen, waaraan vervolgens het basismedium wordt toegevoegd. De petrischalen worden vervolgens viermaal gezwenkt (tweemaal linksom en tweemaal rechtsom), en aansluitend bebroed bij 63 ± 1 °C gedurende 18 h.

A.4.1.9 Bereiding van het proefmedium

Smelt maximaal 24 h voor gebruik het basismedium op (A.4.1.1). Koel af tot 63 °C. Voeg per 100 ml aseptisch 2 ml broomcresolpurper (A.4.1.3) en 0,4 ml trimethoprimoplossing (A.4.1.2) toe. Stel de pH met 1 M NaOH zo nauwkeurig mogelijk in op 8,00 (spreiding $\pm 0,02$), gemeten bij 63 °C.

Voeg van de sporensuspensie (A.4.1.8.6) daarna een zodanige hoeveelheid (± 2 ml) toe, dat bij afwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen een bebroedingstijd van $4\frac{1}{2} \pm \frac{1}{4}$ h wordt verkregen (zie A.6).

Meng en verdeel in cups van microtiterplaten (A.5.2.3) in hoeveelheden van 150 ul, en laat stollen. De gevulde microtiterplaten zijn mits zorgvuldig afgedekt ten hoogste 3 dagen bij 0-5 °C houdbaar.

A.4.2 **Standaardoplossingen**

A.4.2.1 Penicilline (Kalium-benzylpenicilline Gist-Brocades) (Deze wordt boven silicagel bij 0-5 °C bewaard)

A.4.2.1.1 Bereid als volgt een basisoplossing. Laat voor het afwegen de penicilline ten minste 1 h bij kamertemperatuur staan. Bereid een oplossing van 100 ± 1 IE penicilline/ml door een hoeveelheid van ten minste 50 mg met bekende activiteit af te wegen tot op 0,1 mg nauwkeurig en in een maatkolf op te lossen in water. Deze oplossing is in het donker bewaard bij 0-5 °C ten hoogste 2 weken houdbaar.

Voorbeeld

Een penicillinepreparaat met 1590 IE/mg.

Om een oplossing van 100 IE/ml te verkrijgen, dient

$100.000 : 1590 = 62,9 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ te worden afgewogen, in gedestilleerd water te worden opgelost, en aangevuld tot 1000 ml.

A.4.2.1.2 Maak telkens voor gebruik een gebruiksooplossing van penicilline door 1 ml van de basisoplossing (A.4.2.1.1) te verdunnen tot 100 ml met steriel water. Deze gebruiksooplossing bevat 1 IE/ml.

A.4.2.1.3 Maak telkens voor gebruik een standaardoplossing van penicilline met 0,003 IE penicilline per ml door met een micropipet 0,3 ml van de gebruiksooplossing (A.4.2.1.2) aan te vullen tot 100 ml met steriele volle UHT-melk (A.4.4) en te mengen.

Opmerking

De onder A.4.2.1.3 genoemde oplossing is lange tijd (2 maanden) houdbaar te maken door ze onmiddellijk na bereiden in gebruiksporties te verdelen en ze in het donker bij -20 °C te plaatsen.

Na ontdooien dienen ze direct te worden gebruikt.

- A.4.2.2 4,4'-Diaminodiphenylsulfon (Dapson) Sigma D-2505.
(Deze wordt boven silicagel bij 0-5 °C bewaard)
- A.4.2.2.1 Laat voor het afwegen de Dapson ten minste 1 h bij kamertemperatuur staan.
- Maak een voorraadoplossing door $20 \pm 0,1$ mg dapson op te lossen in 10 ml 96% ethanol en aan te vullen tot 100 ml met steriel water. Deze oplossing bevat 200 ug/ml, en is, mits bewaard bij 0-5 °C, 2 weken houdbaar.
- A.4.2.2.2 Maak een verdunde oplossing van 2 ug dapson/ml door 1 ml van de voorraad-oplossing (A.4.2.2.1) aan te vullen tot 100 ml met steriel water.
- A.4.2.2.3 Maak een verdunde oplossing van 0,2 ug dapson/ml door 1 ml van de oplossing A.4.2.2.2 aan te vullen tot 10 ml met steriel water.
- A.4.2.2.4 Maak een standaardoplossing van 0,002 ug/ml door 1 ml van de onder A.4.2.2.3 genoemde oplossing aan te vullen tot 100 ml met steriele volle UHT-melk (A.4.4).

Opmerking

De onder A.4.2.2.4 genoemde oplossing is lange tijd (2 maanden) houdbaar te maken door deze onmiddellijk na bereiden in gebruiksporties te verdelen en ze in het donker bij -20 °C te plaatsen. Na ontdooien dient de oplossing direct te worden gebruikt.

- A.4.3 Controlemelk A, rauwe melk, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen.

Opmerking

Indien bij het onderzoek een groot aantal monsters wordt onderzocht waarvan verwacht mag worden dat ze vrij zijn van bacteriegroeiremmende stoffen, dan kunnen deze monsters als controlemelk A worden beschouwd.

- A.4.4 Steriele volle UHT-melk, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen.

A.5 **APPARATUUR EN GLASWERK**

Gebruikelijke benodigdheden voor microbiologische laboratoria. De onderstaande lijst van bijzonder(e) apparatuur en glaswerk is van toepassing op de delen A, B en C van deze methode.

A.5.1 **Apparatuur**

- A.5.1.1 Broedstoven met geforceerde luchtcirculatie, waarin een temperatuur van of liggend tussen 55 en 63 °C (± 1 °C) kan worden gehandhaafd. Voor de werkwijzen beschreven onder A.6 en B.6 wordt uitsluitend een temperatuur van 63°C (± 1 °C) toegepast.
- A.5.1.2 Waterbad met geforceerde circulatie waarin een temperatuur van $63 \pm 0,5$ °C kan worden gehandhaafd, en een goede circulatie rondom de cups in de microtiterplaten kan worden gegarandeerd na plaatsing van deze platen in het waterbad.
- A.5.1.3 Microtiterplaatdispensor voor het doseren van 150 ul voedingsmedium per cup van de microtiterplaat.

A.5.1.4 Apparaat voor het mengen van de monsters

Het apparaat moet zodanig zijn geconstrueerd, dat de afstand van het draaipunt tot het monster ten hoogste 40 cm bedraagt. Het moet zodanig worden ingesteld, dat de monsters in 25 ± 5 sec tienmaal over een hoek van 180° vanuit verticale stand worden gekanteld.

A.5.1.5 Microscoop met fasecontrastinrichting

A.5.1.6 Centrifuge voor het centrifugeren bij 3000 g, met bijbehorende grote steriele centrifugebuizen.

A.5.1.7 Micropipet met instelbaar volume

Controleer regelmatig of het gedoseerde volume overeenkomt met het ingestelde volume.

A.5.1.8 Balans waarop tot op 0,1 mg nauwkeurig kan worden gewogen.

A.5.1.9 pH-meter, voorzien van automatische temperatuurcorrectie, en elektrode(n) geschikt om in vloeistoffen met een temperatuur van 63°C te meten.

A.5.1.10 Pipetteerapparaat voor het pipetteren van hoeveelheden van 50 ul melk in cups van de microtiterplaten.

De pipetten dienen na elke pipetteercyclus te kunnen worden gereinigd.

A.5.2 **Glaswerk**

A.5.2.1 Petrischalen met een diameter van 14 cm van helder, ongekleurd glas of van steriel synthetisch materiaal met vlakke bodem van gelijkmatige dikte.

A.5.2.2 Steriele Drigalsky spatels.

A.5.2.3 Microtiterplaten met cups van 300 ul.

A.5.2.4 Cultuurbuizen met een inwendige diameter van ongeveer 16 mm, een lengte van 8 cm, voorzien van een gelijkvormige bodem.

A.6 **WERKWIJZE**

A.6.1 Meng de monsters door ze met het mengapparaat (A.5.1.4) tienmaal over een hoek van 180° te kantelen.

Opmerking

Deze mengprocedure is alleen nodig wanneer de monsters niet reeds ten behoeve van andere onderzoeken op deze wijze zijn gemengd.

A.6.2 Spoel onmiddellijk voorafgaande aan het pipetteren de pipetten grondig door met leidingwater van drinkwaterkwaliteit. Herhaal het voorspoelen bij elke pipetteercyclus. De spoelprocedure voor elke cyclus moet zodanig zijn, dat sprake is van een verwaarloosbare carry-over ($< 0,3\%$).

Opmerking

Zo vaak als nodig dient het pipetteerapparaat (A.5.1.10) te worden gereinigd met behulp van water, waaraan een geschikt reinigingsmiddel is toegevoegd.

- A.6.3 Breng met het pipetteerapparaat (A.5.1.10) van elk monster 50 µl over in elk van de cups met proefmedium van de microtiterplaat (A.4.1.9).

Laat de microtiterplaten gedurende 1 h bij kamertemperatuur staan. Giet de boven de agar staande melk af. Bebroed vervolgens de zorgvuldig afgedekte microtiterplaten in het waterbad (A.5.1.2) of de stoof (A.5.1.1), totdat de paarse kleur van de cups met controlemelk (A.4.3) gaat veranderen. Controleer daartoe na ca. 3 3/4 h om de 10 min de microtiterplaten.

Opmerking

Na afgieten en voor bebroeden mogen de microtiterplaten maximaal 24 h bij 0-2 °C worden bewaard alvorens deze te incuberen.

- A.6.4 Voer de handeling volgens A.6.3 ten minste in duplo uit met de standaardoplossingen van 0,003 IE penicilline/ml (A.4.2.1.3), en van 0,002 µg dapson per ml (A.4.2.2.4), en met controlemelk A (A.4.3). De cups met standaardoplossingen en controlemelk A dienen zich te bevinden op plaatsen die zo goed mogelijk verdeeld zijn tussen de cups met monsters melk.

- A.6.5 Haal de microtiterplaten uit het waterbad of de stoof wanneer een kleuromslag van paars naar geel van het medium in de cups met controlemelk A wordt geconstateerd. Het juiste moment van uithalen van de microtiterplaten wordt tevens bepaald door te letten op de kleur in de cups met het medium met de standaardoplossingen met penicilline en dapson. De kleur van het medium met de penicillinestandaard moet op het moment van uithalen onveranderd paars zijn gebleven; die van het medium met de dapsonstandaard mag juist zichtbaar iets lichter paars zijn dan de penicillinestandaard, echter niet meer dan dat.

A.7 **BEOORDELING VAN DE MONSTERS, INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN**

Beoordeel de kleur van het medium in de cups ca. 10 min na het uithalen van de microtiterplaten.

- A.7.1 Een paarse kleur van het medium in een cup duidt op de aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.

- A.7.2 Een licht paarse verkleuring van het medium, verkleuring van slechts een deel van het medium in een cup, of een onregelmatige verkleuring in een cup, duidt op de mogelijke aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.
- A.7.3 Een gele kleur van het medium in een cup duidt op het niet aantoonbaar zijn van bacteriegroeiremmende stoffen.
- A.7.4 Indien één van de standaardoplossingen geen groeiremming vertoont, wordt de betreffende standaard opnieuw ingezet met een vers bereide oplossing. Is de betreffende standaard dan nog negatief, dan zijn de resultaten van de gehele proef niet betrouwbaar. Men dient dan na te gaan waarom die standaard een negatief resultaat geeft (pH van het medium, sporensuspensie, glaswerk etc.).

A.8 BEVESTIGING VAN DE RESULTATEN

- A.8.1 Alle monsters die volgens A.7.1 en A.7.2 bacteriegroeiremmende stoffen bevatten of kunnen bevatten, worden bevestigd volgens methode B, en afhankelijk van het resultaat daarvan met methode C, en afhankelijk van het resultaat daarvan met methode D.
- A.8.2 Daarbij wordt uitgesloten dat de groeiremming wordt veroorzaakt door van nature in melk aanwezige hittelabiele groeiremmende stoffen. Breng daartoe, direct nadat het resultaat van de screeningsmethode bekend is, van monsters met een positieve uitslag met behulp van een pipet zoveel over in het onderste deel van schone, droge buizen, dat het vervolgonderzoek (B, C en D) kan worden uitgevoerd. Verhit de buizen vervolgens gedurende 10 min in een waterbad van 80 ± 1 °C, zodanig dat het vloeistofniveau in het waterbad zich bevindt boven het niveau in de buizen. Koel de buizen daarna af in stromend water. Bewaar de gekoelde buizen tot het vervolgonderzoek begint, en vervolgens ook tussen de gebruiksmomenten bij 2-4 °C.

A.9 LITERATUUR

- IDF Bulletin No 258/1991, Determination and confirmation of inhibitors in milk and milk products, 2nd Edition
- Bacteriegroeiremmende stoffen in boerderijmelk
RIKILT rapport 85.4
- Invloed van de pH op het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in rauwe melk.
RIKILT rapport 91.12

B BEVESTIGINGSPROEF EN AANTONEN VAN SULFARESIDUEN

B.1 ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED VAN DE BEVESTIGINGSPROEF

Dit voorschrift beschrijft de methode voor de bevestiging van de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen en voor het aantonen van sulfaresiduen in monsters, opgespoord met methode A.

Opmerking

In onderstaande methode wordt gebruik gemaakt van microtiterplaten. De methode mag echter ook worden uitgevoerd met 1 ml medium in buizen waaraan 0,3 ml melk en 0,3 ml van de standaardoplossing wordt toegevoegd.

B.2 DEFINITIE

Een monster bevat melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen, indien het proefmedium waaraan het monster verhitte melk is toegevoegd, niet of slechts juist waarneembaar van kleur verandert bij de hier beschreven werkwijze.

Het monster melk bevat sulfaresiduen, indien dan tevens het bevestigingsmedium waaraan het monster is toegevoegd, bij onderzoek volgens de beschreven werkwijze geel is geworden.

B.3 BEGINSSEL

De onder A beschreven methode wordt herhaald, nu echter met verhitte melk, om de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen al dan niet te bevestigen.

Om de aanwezigheid van sulfaresiduen vast te stellen, wordt gebruik gemaakt van het feit dat para-aminobenzoëzuur de remmende werking van sulfaresiduen tegengaat. Dit wordt zichtbaar doordat een kleuromslag optreedt.

B.4 MEDIA, REAGENTIA EN TESTORGANISME

B.4.1 Media

Zie A.4

B.4.2 Proefmedium

Bereiding van het proefmedium

Smelt maximaal 24 h voor gebruik het basismedium (A.4.1.1) op. Koel af tot 63 °C. Voeg vervolgens per 100 ml basismedium van 63 °C aseptisch toe: 0,4 ml trimethoprimoplossing (A.4.1.2) en 2 ml broomcresolpurper (A.4.1.3). Stel de pH met 1 M NaOH zo nauwkeurig mogelijk in op 8,00 (spreiding $\pm 0,02$), gemeten bij 63 °C. Voeg daarna van de sporensuspensie (A.4.1.8.6) een zodanige hoeveelheid (± 2 ml) toe, dat bij afwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen een bebroedingstijd van $4\frac{1}{2} \pm \frac{1}{2}$ h wordt verkregen (zie A.6). Meng en verdeel in cups van microtiterplaten (A.5.2.3) in hoeveelheden van 150 ul, en laat stollen.

B.4.3 Sulfaresiduen-bevestigingsmedium

B.4.3.1 Para-aminobenzoëzuuroplossing

Para-aminobenzoëzuur	1,0 g
Water	200 ml

Los het para-aminobenzoëzuur op in water door verwarmen tot ten hoogste 80 °C. Koel af tot kamertemperatuur. Deze oplossing is, in het donker bij deze temperatuur bewaard, 1 week houdbaar.

B.4.3.2 Bereiding van het sulfaresiduen-bevestigingsmedium

Smelt maximaal 24 h voor gebruik het basismedium (A.4.1.1) op. Koel af tot 63 °C. Voeg vervolgens per 100 ml basismedium van 63 °C aseptisch toe: 0,4 ml trimethoprimoplossing (A.4.1.2), 2 ml broomcresolpurper (A.4.1.3) en 2 ml para-aminobenzoëzuuroplossing (B.4.3.1). Stel de pH met 1 M NaOH zo nauwkeurig mogelijk in op 8,00 (spreiding $\pm 0,02$), gemeten bij 63 °C. Voeg daarna van de sporensuspensie (A.4.1.8.6) een zodanige hoeveelheid (± 2 ml) toe, dat bij afwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen een bebroedingstijd van $4\frac{1}{2} \pm \frac{1}{4}$ h wordt verkregen (zie A.6). Meng en verdeel in cups van microtiterplaten (A.5.2.3) in hoeveelheden van 150 ul, en laat stollen.

B.4.4 Controlemelk B

Zie A.4.4

B.5 APPARATUUR EN GLASWERK

Zie A.5

B.6 WERKWIJZE

B.6.1 Aantonen van sulfaresiduen

Meng de monsters melk (zie A.6.1) goed, en spoel het pipetteerapparaat schoon (zie A.6.2). Breng van elk monster 50 ul over in de cups van de microtiterplaten met het proefmedium (B.4.2), en 50 ul in de cups met het sulfaresiduenbevestigingsmedium (B.4.3). Voer de bepaling ook uit met 50 ul standaardoplossing van penicilline (A.4.2.1.3), met 50 ul standaardoplossing van dapson (A.4.2.2), en met 50 ul controlemelk B (B.4.4). Laat de aldus verkregen microtiterplaten 1 h staan bij kamertemperatuur. Giet de boven de agar staande melk af. Bebroed de zorgvuldig afgedekte microtiterplaten vervolgens in het waterbad (A.5.1.2) of de stoof (A.5.1.1).

Opmerking

De aangegeven hoeveelheden van 50 ul mogen ook handmatig worden overgebracht.

B.6.2 Haal de microtiterplaten uit het waterbad of de stoof wanneer een kleuromslag van paars naar geel van het medium in de cups met controlemelk B wordt geconstateerd. Het juiste moment van uithalen van de microtiterplaten wordt tevens bepaald door te letten op de kleur in de cups met het medium met de standaardoplossingen met penicilline en dapson. De kleur van het medium met de penicillinestandaard moet op het moment van uithalen onveranderd paars zijn gebleven; die van het medium met de dapsonstandaard mag juist zichtbaar iets lichter paars zijn dan de penicillinestandaard, echter niet meer dan dat.

B.6.3 **Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten**

Beoordeel de kleur van het medium in de cups ca. 10 min na het uithalen van de microtiterplaten. Vergelijk de kleur met de kleur die de dapsonstandaard op dat moment heeft aangenomen. Deze kleur van de dapsonstandaard wordt referentiekleur genoemd. Gebruik daarbij het schema van bijlage 1.

Het monster wordt geacht geen melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen te bevatten, indien de kleur van het proefmedium algeheel geel is of geler dan de referentiekleur (a in bijlage 1). Deze monsters worden niet verder onderzocht (combinatie ac en ad van bijlage 1).

Het monster wordt geacht melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen te bevatten, indien de kleur van het proefmedium paarser is dan of gelijk is aan de referentiekleur (b in bijlage 1). Dit monster wordt geacht sulfaresiduen te bevatten, indien tevens de kleur van het medium in de cup met het sulfabevestigingsmedium duidelijk geel is geworden (combinatie bc van bijlage 1).

Met alle monsters die wel melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen bevatten maar geen sulfaresiduen, wordt het onderzoek vervolgd zoals beschreven is onder C (combinaties bd en be).

B.7 **LITERATUUR**

Zie A.9

C **HET AANTONEN VAN DE AANWEZIGHEID VAN (SEMI-SYNTHETISCHE)
PENICILLINEN**

C.1 **ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED VAN DE BEVESTIGINGSPROEF**

Dit voorschrift beschrijft de methode om na te gaan of de groeiremming, geconstateerd met methode A en bevestigd met methode B, wordt veroorzaakt door penicillinen of semi-synthetische penicillinen.

C.2 **DEFINITIE**

Melk wordt geacht penicilline of semi-synthetische penicilline te bevatten, indien bij toepassing van de beschreven werkwijze een remmingszone wordt waargenomen die geheel of gedeeltelijk ongedaan wordt gemaakt door toevoeging van penicillinase aan het monster, gevolgd door een incubatie.

Daarbij worden monsters (niet met penicillinase behandelde) melk met remmingszones die significant kleiner zijn dan die veroorzaakt door 0,004 IE penicilline/ml melk, geacht geen (semi-synthetische) penicillinen te bevatten.

C.3 **BEGINSEL**

Een papierschijfje, waarop 100 ul van de te onderzoeken melk is gepipetteerd, wordt op het oppervlak van een agarmedium gelegd dat geënt is met sporen van Bacillus stearothermophilus var. calidolactis (A.4.1.7.1). De aanwezigheid van penicillinen en of semi-synthetische penicillinen in de melk wordt zichtbaar doordat er een remmingszone rond het schijfje verschijnt.

Een deel van de te onderzoeken melk wordt met een concentratie penicillinase (1000 Leo units/ml) behandeld.

Van deze melk wordt eveneens een papierschijfje met 100 ul op het zojuist genoemde agarmedium gelegd. Indien na incubatie van het medium blijkt dat de remmingszone van de met penicillinase behandelde melk significant kleiner is dan die van de onbehandelde melk, is de aanwezigheid van penicilline en/of semi-synthetische penicilline in de onderzochte melk aangetoond. (zie echter de laatste alinea van deze paragraaf).

Wordt geen significante verkleining van de remmingszone gevonden, of wordt in het geheel geen remmingszone waargenomen, dan wordt het monster verder onderzocht volgens D.

Monsters (niet met penicillinase behandelde) melk met remmingszones die significant kleiner zijn dan die veroorzaakt zijn door melk met 0,004 IE benzylpenicilline/ml, worden geacht geen aantoonbare hoeveelheid penicilline te bevatten. Indien blijkt dat de groeiremming van deze monsters in het medium bij pH 8,0 van de melk na behandeling met penicillinase niet kan worden weggenomen, worden ook deze monsters volgens D verder onderzocht.

C.4 **MEDIA EN REAGENTIA**

C.4.1 **Basismedium (A.4.1.1)**

C.4.2 **Penicillinstandaard**

Maak de standaardoplossing door 0,4 ml van de gebruikoplossing van penicilline (A.4.2.1.2) aan te vullen tot 100 ml met steriele volle UHT-melk (A.4.4). De aldus verkregen standaardoplossing bevat 0,004 IE/ml (0,0024 ug/ml benzylpenicilline).

C.4.3 **Penicillinase-oplossingen**

Stel dat de beschikbare penicillinase-oplossing een concentratie heeft van 10.000.000 Leo units/ml. Vul hiervan 4 ml aan tot 10 ml met de zoutoplossing (A.4.1.6). Van deze oplossing wordt 1,0 ml verdund met 99 ml zoutoplossing. De oplossing bevat dan 40.000 Leo units/ml.

De bovengenoemde oplossing is 2 maanden houdbaar, mits in het donker bij 0-5 °C bewaard.

Opmerking

Werk voor de verdunningsprocedure met steriel glaswerk, en op aseptische wijze.

C.4.4 **Bereiding van het proefmedium**

C.4.4.1 Smelt het basismedium (A.4.1.1), en koel af tot 55 °C.

C.4.4.2 Voeg zoveel sporensuspensie (A.4.1.8) toe aan het vloeibare medium, dat een concentratie van 10^4 sporen per ml medium wordt bereikt.

C.4.4.3 Breng een zodanige hoeveelheid beënt medium (C.4.4.2) over in een steriele petrischaal (A.5.2.1), dat een laagdikte van $0,9 \pm 0,1$ mm ontstaat. Voor een 14 cm plaat is dit 15 ml. Laat stollen. Het gebruiksklare medium is, bewaard bij 0-5 °C, 48 h houdbaar.

C.4.4.4 Merk de bodem van de platen om de monsters en standaardoplossingen te kunnen identificeren.

C.5 **APPARATUUR EN GLASWERK**

Zie A.5

C.5.1 **Apparatuur**

C.5.1.1 Pincet met scherpe, gebogen en geribde bekken.

C.5.1.2 Schuifmaat, afleesbaar tot op 0,1 mm.

C.5.1.3 Waterbad van 80 ± 1 °C met voldoende warmtecapaciteit.

C.5.1.4 Papierschijffjes, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen, diameter 12-13 mm, die 130 ul melk kunnen opnemen (Schleicher en Schuell, art. nummer 2668/2).

C.5.1.5 Micropipet van 100 ± 1 ul.
Controleer regelmatig of het gedoseerde volume overeenkomt met het ingestelde volume.

C.6 **WERKWIJZE**

C.6.1 **Voorbehandeling van de monsters**

C.6.1.1 Selecteer de monsters verhitte melk (zie A.8.2) die volgens methode B wederom bacteriegroei remming vertonen, doch niet positief bevonden zijn ten aanzien van de aanwezigheid van sulfaresiduen.

C.6.1.2 Meng de monsters goed.

C.6.1.3 Bedeel één deel penicillinase-oplossing met 39 delen van het monster melk. Dit geeft een penicillinaseconcentratie van 1000 IE/ml. Bebroed $1\frac{1}{2}$ h bij 37 °C.

C.6.2 **Aantonen van bacteriegroei remmende stoffen**

C.6.2.1 Pipetteer met een micropipet (C.5.1.5) 100 ul van het niet met penicillinase behandelde monster verhitte melk (zie A.8.2) op een schijfje. Breng op een tweede schijfje 100 ul van de met penicillinase-oplossing behandelde melk. Houd de papierschijfjes tijdens het opbrengen van de melk met een schone pincet (C.5.1.1) vast zonder ze te vervormen.

C.6.2.2 Voer per serie gelijktijdig in onderzoek zijnde monsters de handeling onder C.6.2.1 vervolgens uit met de standaardoplossing van penicilline (C.4.2) in plaats van melk.

C.6.2.3 Leg elk der schijfjes direct na het pipetteren plat op het oppervlak van het proefmedium (C.4.4.3), en druk het met de pincet even aan. Spoel tussentijds de pincetpunten met alcohol 70%, en flambeer af. De schijfjes moeten ten minste 20 mm van elkaar en ten minste 10 mm van de rand van de petrischaal verwijderd zijn.

Breng het schijfje met melk van het verdachte monster, het schijfje met melk behandeld met penicillinase, en het schijfje met de standaardoplossing van penicilline (C.4.2) op één plaat. Nadat alle schijfjes op het proefmedium zijn gelegd, wordt hun identiteit vastgelegd.

C.6.2.4 Bebroed de platen gedurende 2,5-5 h bij een temperatuur van of liggend tussen 55 en 63°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

C.6.2.5 Beoordeel de platen voor een geschikte lichtbron op heldere zones rond de papierschijfjes ten gevolge van bacteriegroei remmende werking.

De gemeten remmingszone van de standaard met 0,004 IE benzylpenicilline/ml dient bij 55 °C minimaal 14,6 mm te zijn, en bij 63 °C 14,2 mm.

Stel vast bij welke monsters de remmingszone bij de niet met penicillinase behandelde melk significant kleiner is dan die van de standaard benzylpenicilline met 0,004 IE/ml. (Onder significant kleiner (95 % betrouwbaarheid) wordt verstaan minimaal 0,5 mm kleinere middellijn).

Ga na of de remmingszone rondom de schijfjes met melk behandeld met penicillinase significant kleiner is dan die van de schijfjes met niet behandelde melk. (Onder significant kleiner (95% betrouwbaarheid) wordt verstaan: minimaal 0,5 mm kleinere middellijn).

C.6.2.6 Van de monsters waarvan de remmingszone bij de niet met penicillinase behandelde melk significant kleiner is dan die van de standaard benzylpenicilline met 0,004 IE/ml, wordt wederom de onder B beschreven bevestigingsproef uitgevoerd. Op geheel dezelfde wijze wordt dit gedaan met dezelfde met penicillinase behandelde monsters melk. Nagegaan wordt of bij deze laatste monsters de groeiremming is verdwenen.

C.7 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Penicilline wordt aanwezig geacht indien de remmingszone rondom de schijfjes met de met penicillinase behandelde melk significant kleiner is dan die van de schijfjes met niet behandelde melk (zie echter de volgende alinea).

Monsters van niet met penicillinase behandelde melk met remmingszones die significant kleiner zijn dan die veroorzaakt door melk met 0,004 IE benzylpenicilline/ml, of die welke geen remmingszone vertonen, worden geacht geen aantoonbare hoeveelheden penicillinen te bevatten. Deze monsters worden volgens D verder onderzocht, behalve die waarbij volgens het onderzoek beschreven onder C.6.2.6 de groeiremming bij de met penicillinase behandelde melk bleek te zijn verdwenen. Deze laatste monsters worden geacht geen melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen te bevatten.

C.8 LITERATUUR

Zie A.9

D **HET AANTONEN VAN DE AANWEZIGHEID VAN EEN OF MEER
BACTERIEGROEIEMMENDE STOFFEN VAN DE GROEPEN AMINOGLYCOSIDEN,
MACROLIDEN EN TETRACYCLINEN, VAN NOVOBIOCINE EN CHLOORAMFENICOL**

D.1 **ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED VAN DE BEVESTIGINGSPROEF**

Dit voorschrift beschrijft de methode om na te gaan of in de monsters waarin melkvreemde bacteriegroeiemmenende stoffen zijn aangetoond maar die geen sulfonamiden noch penicillinen of semi-synthetische penicillinen blijken te zijn, één of meer antibiotica kunnen worden aangetoond die behoren tot de aminoglycosiden, macroliden, tetracyclinen, of novobiocine of chlooramfenicol zijn.

D.2 **DEFINITIE**

Melk wordt geacht een aminoglycoside, een macrolide, een tetracycline, novobiocine of chlooramfenicol te bevatten indien bij toepassing van de beschreven werkwijze de meetwaarde voor het te onderzoeken monster lager is dan van de bij de groep behorende grensstandaard.

D.3 **BEGINSEL**

De te onderzoeken melk wordt met behulp van de Charm-test achtereenvolgens onderzocht op de volgende vijf (groepen van) bacteriegroeiemmenende stoffen: aminoglycosiden, macroliden, tetracyclinen, novobiocine en chlooramfenicol.

De Charm-test kent een microbiële of immunologische receptor en een tracer (een radio-actief (^{14}C of ^3H) gelabeld antibioticum). De test is gebaseerd op de competitie die optreedt aan de receptor tussen de tracer en de eventuele aanwezige bacteriegroeiemmenende stof in de te onderzoeken melk. Is er geen bacteriegroeiemmenende stof aanwezig, dan zal dientengevolge aan de receptor voor 100% binding van de tracer optreden. Is er wel bacteriegroeiemmenende stof aanwezig, dan zal er minder tracer gebonden zijn aan de receptor. De mate van binding van bacteriegroeiemmenende stof aan de tracer wordt met een scintillatieteller (Charm-analyzer) gemeten in counts per minuut.

D.4 **MEDIA, REAGENTIA**

D.4.1 **Charm reagentia**

De reagentia bestaan uit één receptor en één tracer, beide in tablet-vorm. De test wordt uitgevoerd voor de volgende groepen van bacteriegroeiemmenende stoffen:

groep	bestelcode	tracer	receptor
Aminoglycosiden	AGTBL	AG1	AG2
Macroliden	ETBL	E1	E2
Tetracyclinen	TABHM-T	T2	T1
Novobiocine	NTBL	N1	N2
Chlooramfenicol	CAP	C2	C1-C3

De reagentia worden geleverd door Charm Sciences Inc., 36 Franklin Street, Malden, Massachusetts 02148-4120, U.S.A.. Charm Sciences Inc. wordt in Nederland vertegenwoordigd door Radiometer Nederland, Zoetermeer.

De tabletten dienen in de diepvries bij -18 °C te worden bewaard. Haal de tabletten minimaal 30 min voor gebruik uit de diepvries en laat ze vóór openen op kamertemperatuur komen. Gebruik hierna de tabletten binnen 4 uur.

Opmerking

De totale hoeveelheid radioactiviteit van de voorraad Charm-reagentia mag niet meer bedragen dan 0,5 Curie (Ci) (=1,85 x 10¹⁰ Becquerel Bq).

D.4.2 Scintillatievloeistof

Liquid Scintillation Cocktail, OPTI FLUOR 6013199, Packard Instrument BV Groningen. Leverancier Radiometer Nederland, Zoetermeer.

D.4.3 Negatieve standaardmelk

Magere melk bereid met behulp van Nilac magere melkpoeder, NIZO Ede, volgens het daarbij verstrekte reconstitutievoorschrift, ofwel gesteriliseerde magere melk, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen. Deze melk dient te worden bewaard bij 2 ± 2 °C.

D.4.4 Grensstandaarden

Bereid een serie grensstandaarden met concentraties zoals genoemd in tabel 1. Deze moeten worden bereid met de negatieve standaardmelk (D.4.3). De standaarden zijn in de diepvries drie maanden houdbaar.

Tabel 1 Concentratie grensstandaarden

Groep/soort	Standaard	Concentratie (ug/kg)
Aminoglycosiden	gentamycine	0,050
Macroliden	spiramycine	0,075
Tetracyclinen	oxytetracycline	0,050
Novobiocine	novobiocine	0,100
Chlooramfenicol	chlooramfenicol	0,001

D.5 APPARATUUR EN GLASWERK

D.5.1 Apparatuur
Zie A.5

D.5.1.1 Scintillatieteller

D.5.1.2 Schudwaterbad, schudsnelheid 50 rpm
Temperatuur instelbaar op 35 ± 1 °C en 50 ± 1 °C

- D.5.1.3 Waterbad van 4 ± 2 °C
- D.5.1.4 Pipet, variabele instelling (1-5 ml)
- D.5.1.5 Centrifuge met rotor, steunplaatjes, deksel, rekhouders, Charmrekken, centrifugebuizen
- D.5.1.6 Buizenmenger
- D.5.1.7 Telbuizen, geschikt voor scintillatieteller
- D.5.1.8 Stopwatch (0-60 minuten)
- D.5.1.9 Repeteerpipet
- D.5.1.10 Vloeistofdispensor (1,5 ml)

D.6 **WERKWIJZE**

Veiligheidsvoorschrift

Omdat er wordt gewerkt met (weliswaar minimale hoeveelheden) radioactieve stoffen, moet al het afval worden gescheiden in vast, vloeibaar en glas. Vast afval bestaat uit doordrukstrips, tissues, plastic buizen en stoppen. Vloeibaar afval bestaat uit de onderzochte melk en scintillatievloeistof. Al het afval wordt aangemerkt als radioactief afval en dient als zodanig te worden afgevoerd.

D.6.1 **Voorbehandeling van de monsters**

Selecteer de monsters verhitte melk die volgens Methode B geen sulfaresiduen bevatten en volgens Methode C niet kunnen worden bevestigd voor penicilline of semi-synthetische penicilline (andere groeiremmende stof, zie C.7).

Centrifugeer een voldoende aantal milliliters van de te onderzoeken melk gedurende 5 min bij 3000 rpm. Verwijder de roomlaag. Breng met behulp van pipetten het ontroomde deel van de melk over in cultuurbuizen, en bewaar deze bij 0-4 °C. Met deze melk kunnen de noodzakelijke testen worden uitgevoerd.

Opmerking

De te onderzoeken melk mag onder bepaalde voorwaarden worden verdund (zie D.6.3.2).

D.6.2 **Bepaling van de meetwaarde van de antibioticavrije melk**

Bepaal eenmalig voor elke groep in zesvoud de waarde van de negatieve standaard (D.4.3), en bepaal hiervan het gemiddelde (zero-count). Herhaal deze bepaling bij het in gebruik nemen van een nieuwe batch magere melkpoeder of gesteriliseerde magere melk, dan wel een nieuwe batch reagentia. Bepaal bij elk onderzoek de negatieve standaard in tweevoud. Elk der gevonden waarden mag niet meer dan 20% van de zero-count liggen.

D.6.3 Aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen

Voer de Charm-test in enkelvoud uit volgens de hieronder beschreven werkwijze. Test de monsters melk voor bacteriegroeiremmende stoffen in de volgorde van de (groepen) antibiotica genoemd in tabel 1. Neem bij iedere groep in duplo een negatieve standaardmelk en in duplo de desbetreffende standaard mee.

D.6.3.1 Werkwijze

- 1- Plaats het benodigde aantal telbuizen (D.5.1.7) in een Charmrek (D.5.1.5) en leg het tegenhoudplaatje over de buizen. Zorg voor een eenduidige indentificatie.
- 2- Plaats het Charmrek in het waterbad (D.5.1.3). Het niveau in de buizen dient onder het niveau van het waterbad te liggen.
- 3- Breng een tablet tracer/receptor in de buizen (zie D.4.1).
- 4- Voeg met de repeteerpipet (D.5.1.9) 250 ul water toe aan de tabletten.
- 5- Voeg met de pipet (D.5.1.4) het aantal milliliters melk toe volgens tabel 2 (gebruik voor ieder monster een nieuwe pipetpunt).

Tabel 2 Benodigd aantal milliliters melk en incubatietemperatuur

Groep/soort	Melk	Incubatietemperatuur
Aminoglycosiden	2 ml	35 °C
Macroliden	2 ml	50 °C
Tetracyclinen	2 ml	35 °C
Novobiocine	2 ml	35 °C
Chlooramfenicol	0,8 ml	4 °C

- 6- Breng een tablet receptor of tracer in de telbuizen (zie D.4.1).
- 7- Haal het rek uit het waterbad en sluit het af met de bijbehorende rekafsluiter.
- 8- Schud het rek 3 min op de buizenmenger (D.5.1.6). Start langzaam, en voer de schudsnelheid geleidelijk op tot de inhoud van de buis tot op 2/3 van de buishoogte reikt.
- 9- Plaats het Charmrek in het schudwaterbad (D.5.1.2) en incubeer 15 min bij een schudsnelheid van 50 rpm. Zie voor de incubatietemperatuur tabel 2.
- 10- Plaats eventueel steunplaatjes in de rekhouders van de centrifuge. Plaats het Charmrek in de centrifuge (D.5.1.5). Zorg voor een gelijkmatige gewichtsverdeling op de rotor. Centrifugeer 4 min met 3000 rpm.
- 11- Verwijder de kap van het Charmrek en giet de vloeistof via een trechter af in een afvalvat. Schud na ± 10 sec aanhangende druppels voorzichtig af.
- 12- Voeg met de repeteerpipet (D.5.1.9) per telbuis 250 ul water toe.
- 13- Schud het rek 3 min op de buizenmenger (D.5.1.6). Start langzaam en voer de schudsnelheid geleidelijk op tot de inhoud van de buis tot op 2/3 van de buishoogte reikt.
- 14- Voeg per telbuis met de vloeistofdispensor (D.5.1.10) 1,5 ml scintillatievloeistof (D.4.2) toe.
- 15- Voorzie de telbuizen van een stop (D.5.1.7). Schud het rek 30 sec op de buizenmenger (D.5.1.6). Schud op volle snelheid.
- 16- Tel de buizen in de scintillatieteller (D.5.1.1) gedurende 1 min (cpm).

D.6.3.2 Voorwaarden bij het verdunnen van de te onderzoeken melk

Onder de hierna volgende voorwaarden mag de te onderzoeken melk worden verdund met de negatieve standaardmelk. Zo mag worden verdund in een verhouding 1:1 van deze melken (verdunningsfaktor 0,5)

- a) indien nieuwe grensstandaardoplossingen worden gebruikt die de helft van de in tabel 1 (zie D.4.4) genoemde concentraties bevatten. Zie ook D.7;
- b) ten genoegen van de toezichhoudende instantie kan worden aangetoond dat deze nieuwe grensstandaarden op een betrouwbare wijze met de Charm-test kunnen worden aangetoond.

De in tabel 3 weergegeven minimale eventuele afname van het aantal counts dient daarbij als richtlijn.

Bij andere verdunningsfactoren gelden aangepaste voorwaarden.

Tabel 3 Aantoonbaarheid van de vijf (groepen van) antibiotica

Groep/soort	minimale procentuele afname van het aantal counts t.o.v. die van de antibioticavrije melk (negatieve standaard)
- Aminoglycosiden	35%
- Macroliden	25%
- Tetracyclinen	40%
- Novobiocine	25%
- Chlooramfenicol	30%

D.7 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Middel de waarden (cpm) van de grensstandaarden, en ga na of de waarden van de onderzochte monsters melk beneden de waarden van de desbetreffende standaard liggen.

Monsters melk waarvan de waarde (cpm) beneden de waarde (cpm) van de grensstandaard ligt, worden als positief voor de desbetreffende groep aangemerkt.

Wanneer een groep bacteriegroeiremmende stoffen is aangetoond, wordt de desbetreffende uitslag doorgegeven, en vindt geen vervolgonderzoek plaats op mogelijk andere aanwezige groepen.

D.8 LITERATUUR

- D.8.1 CHARM HVS: 8000, 8100 & 9000. Operator's Manual for EC MRL Levels. Charm Sciences Inc. 36 Franklin Street, Malden, Massachusetts 02148 USA.
- D.8.2 Carlsson, A. and L. Björck. Detection of antibiotic residues in herd and tanker milk. A study of the Charm test II. *Milchwissenschaft* 44, 1989, pp 7-10.
- D.8.3 Suhren, G. und W. Heeschen. Entwicklungen zum Antibiotikum-Nachweis in Milch. *Deutsche Molkerei Zeitung* 48, 1987, pp 1566-1570.
- D.8.4 Suhren, G. and W. Heeschen. Improved detection of tetracycline in milk with a modified microbial receptor assay (Charm test II) and agar diffusion test. *Milchwissenschaft* 45, 1990, pp 343-347.
- D.8.5 Charm, S.E. and R. Chi. Microbial Receptor Assay for rapid detection of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study. *J. assoc. off. anal. chem* 71, 2 1988, pp 304-316.

BIJLAGE 1

SCHEMA VOOR DE BEVESTIGING VAN DE GROEIREMMING EN HET AANTONEN VAN SULFARESIDUEN

proefmedium kleur	letter	sulfabevestigingsmedium kleur	letter
algeheel geel of geler dan de referentiekleur (zie B.6.3)	a	geel	c
paarser dan of gelijk aan de referentiekleur (zie B.6.3)	b	geler dan de referentiekleur (zie B.6.3) <u>niet</u> algeheel geel	d
		paarser dan of kleur gelijk aan de referentiekleur (zie B.6.3)	e

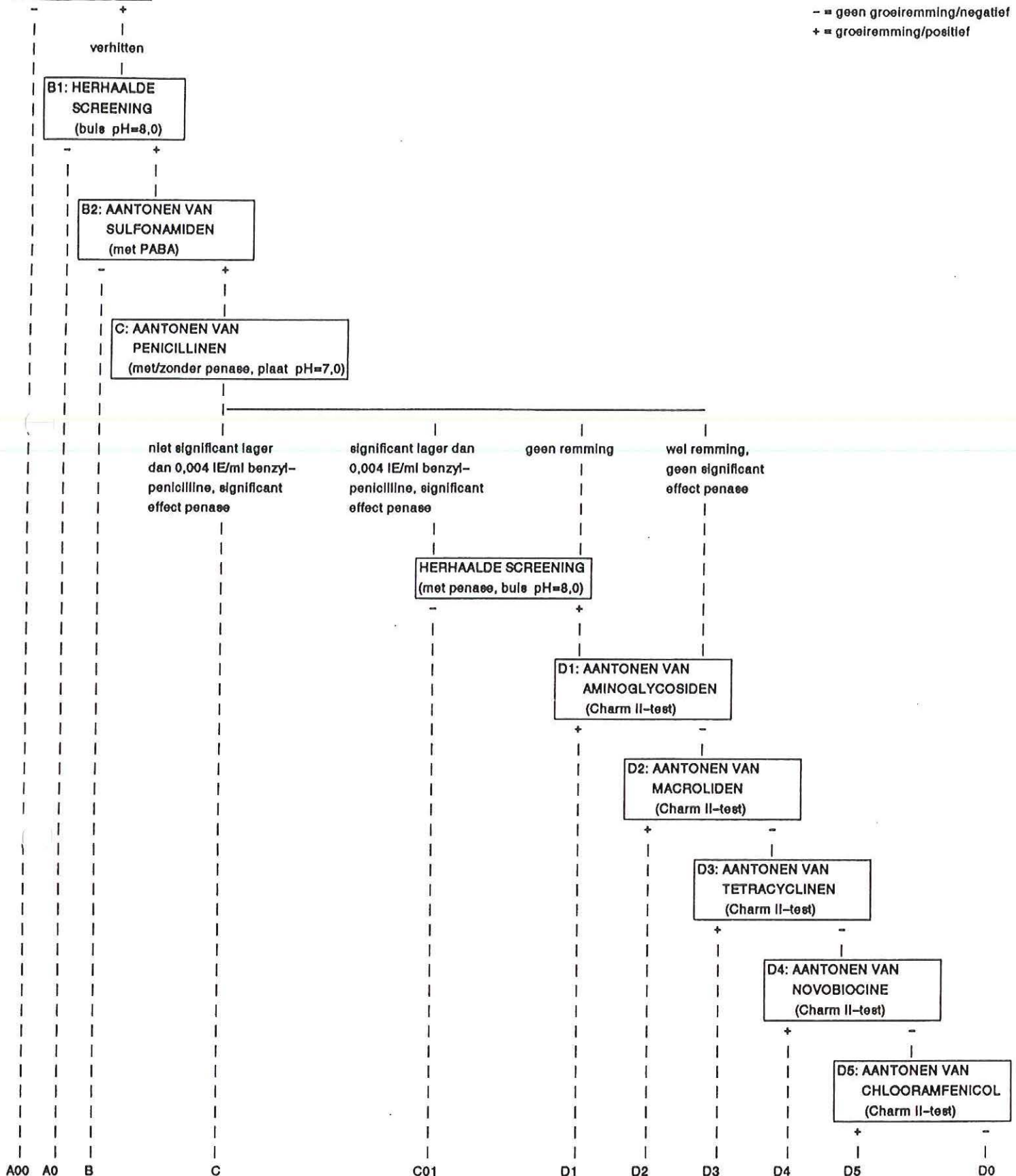
Conclusies bij de combinaties:

- ac: negatief, geen verder onderzoek
- ad: negatief, geen verder onderzoek
- bc: groeiremming bevestigd, sulfaresiduen aanwezig
- bd: groeiremming bevestigd, verder onderzoek
- be: groeiremming bevestigd, verder onderzoek

BIJLAGE 2: E. SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN HET AANTONEN VAN MELKVREEMDE BACTERIEGROEI REMMENDE STOFFEN

A: SCREENING
(buis pH=8,0)

- = geen groei remming/negatief
+ = groei remming/positief



A00 : niet aantoonbaar

A0 : niet aantoonbaar/natuurlijke groei rem. stof

B : positief op sulfonamiden

C : positief op penicillinen

C01 : zwak positief op penicillinen

D1 : positief op aminoglycosiden

D2 : positief op macroliden

D3 : positief op tetracyclinen

D4 : positief op novobiocine

D5 : positief op chlooramfenicol

D0 : andere groei remmende stof

Korting in de gevallen B, C, D1 t/m D5