

Afdeling Microbiologie 1986-10-16

RAPPORT 86.92 Pr.nr. 303.7900

Onderwerp: Vergelijkend onderzoek naar de toepasbaarheid van de Nieuwe Nederlandse Niertest voor het aantonen van bacterie-groeiremmende stoffen in nieren van slachtdieren.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd, dir DLO, dir VD, dir RVV,
dir VKA, dir RIVM, Veterinair Hoofdinspecteur,
drs H. Verburg, dr J. Nieuwenhuis, drs B.W.B. Engel
(RIVM), dhr F.M. van Leusden (RIVM), ORA-secretaris
drs A. Vertommen, RVV kringen 1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,
13,14, dr U. Fenigsen-Narucka, drs J.P.J. Peelen,
dhr H. v. Velzen, drs M.M.L. Aerts, dr J.F.M. Nouws.

Projekt: Voorbereidende en controlewerkzaamheden voor de RVV.

Onderwerp: Vergelijkend onderzoek naar de toepasbaarheid van de Nieuwe Nederlandse Niertest voor het aantonen van bacteriegroei-remmende stoffen in nieren van slachtdieren.

Doel:

De resultaten, verkregen met de door dr J.F.M. Nouws (RVV-kring 6), ontwikkelde screeningsmethode voor het aantonen van residuen van bacteriegroei-remmende stoffen in nier van slachtdieren te vergelijken met de resultaten verkregen met de in de Vleeskeuringswet voorgeschreven Nederlandse Niertest.

Samenvatting:

Door vier R.V.V. kringlaboratoria zijn integraal nieren van slachtdieren (noodslachtingen en 1/2%-onderzoek) onderzocht op het voorkomen van bacteriegroei-remmende stoffen. Van een aantal als positief beoordeelde nieren (wettelijke test remming >15mm; nieuwe Nederlandse niertest remming >20 mm), is de bacteriegroei-remmende stof geïdentificeerd mbv. hoogspanningsselektroforese.

Gedurende het onderzoek is een kwaliteitscontrole-systeem mbv. standaard controleschijfjes geïntroduceerd.

De reproduceerbaarheid van het resultaat van de N.N.N.T. werd nagegaan met simultaan geïmpregneerde papierschijfjes, welke gedurende 1 week bij -25°C waren bewaard en met de gedurende 2 x 24 uren gekoelde karkasnier.

Conclusie:

Met behulp van standaardschijfjes is een kwaliteitscontrole-systeem uitvoerbaar.

Uit de resultaten blijkt dat de Nieuwe Nederlandse Niertest vanaf het beoordelingsniveau >20 mm remmingszone bijzonder geschikt is.

Duploschijfjes diepgevroren bewaren voor evt. herkeuringsonderzoek lijkt beter reproduceerbaar dan de tot nu toe toegepaste methode van invriezen van de gehele nier.

Verantwoordelijk : drs J.M.P. den Hartog
Medewerkers/Samenstellers: dr J.F.M. Nouws, N.J.G. Broex
RVV-2, 5, 6 en 13
Projectleider : drs J.M.P. den Hartog

Inleiding

Uit onderzoeken en literatuur was reeds bekend dat de in de Vleeskeuringswet beschreven antibiotica - chemotherapeutica test, de Nederlandse Niertest, niet meer voldeed aan de EEG-norm als screeningsmethode voor het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in slachtdieren (1,3,6).

Het opsporingspectrum van antimicrobiële stoffen is met voornoemde test te smal: met name de veel gebruikte oxytetracycline, streptomycine en sulfa bevattende preparaten worden niet of onvoldoende aangetoond. Een vervangende methode is dus wenselijk.

Bij RVV-kring 6 is de laatste jaren veel ontwikkelingswerk verricht met als resultaat een één-plaat systeem met *B. subtilis* BGA als test organismen. Om de bruikbaarheid van deze methode in de praktijk te toetsen is een onderzoek uitgevoerd met een viertal kringlaboratoria van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees. Gedurende enige maanden (1986-05-01 t/m 1986-10-01) is vergelijkend onderzoek verricht met de wettelijke test de zg. Nederlandse Niertest en de nieuwe ontwikkelde test de zg. Nieuwe Nederlandse Niertest.

Het doel van dit onderzoek was:

- vergelijking wettelijke test - alternatieve test, uitgevoerd met nieren van zowel de noodslachtingen als uit het zg. 1/2% onderzoek.
- opzet van een kwaliteitscontrolesysteem.
- optimalisering van reproduceerbaarheid in verband met herkeuring.

Aan dit onderzoek werd meegewerkt door de RVV-kringlaboratoria 2, 5, 6 en 13.

2. Materiaal

2.1 Standardschijfjes

Op filtreerschijfjes (Schleicher en Schüll, diameter 12.7 mm) werden oplossingen van resp. Streptomycine, Tylosine, Chlooramphenicol, Oxytetracycline en Dapsone gebracht in de resp. concentraties van 5 µg, 2 µg, 5 µg, 1 µg en 0,03 µg. Vervolgens werden de schijfjes gevriesdroogd en naar de deelnemende kringlaboratoria verstuurd. Tegelijk met het onderzoek van de met nierbekkenvocht geïmpregneerde schijfjes werden deze standardschijfjes regelmatig onderzocht. De diameter van de remmende werking van de diverse schijfjes werd gemeten.

2.2 Nieren van zgn. "aanhouders"

In totaal werden + 5000 nieren van de diverse diersoorten onderzocht. Op de kringlaboratoria werden de nieren onderzocht met de Nederlandse Niertest en met de Nieuwe Nederlandse Niertest.

Bij de wettelijke test werden volgens voorschrift de schijfjes geïmpregneerd in de nierschors. Bij de nieuwe test werden schijfjes geïmpregneerd in het nierbekken.

Van een aantal positief beoordeelde nieren, met de Nieuwe Nederlandse Niertest (remming >20 mm) werd de bacteriegroeiremmende stof geïdentificeerd met behulp van Hoogspanningselectroforese (HVE).

2.3 Diepgevroren geïmpregneerde schijfjes

Bij een aantal nieren werden bij de Nieuwe Nederlandse Niertest niet twee maar vier schijfjes geïmpregneerd. Twee schijfjes werden meteen onderzocht, twee andere schijfjes werden bij ca -25°C bewaard en na één week nogmaals onderzocht.

2.4 Onderzoek karkasnier

Bij een aantal dieren werd bij een positieve uitslag met de N.N.N.T. deze test 48 uur na het eerste onderzoek herhaald bij de gekoelde, ongeopende karkasnier. Het ongeopend zijn is belangrijk aangezien bij een pilotstudie was gebleken dat men in de geopende nier niet alleen last had van een snelle teruggang in de antibioticaconcentratie maar ook van bacteriële contaminatie rondom het filtreerpapiertje.

2.5 Relatie uitslag nierbekken en urine-onderzoek

Met het oog op de gevoeligheid van de N.N.N.T. is aanvullend onderzoek uitgevoerd met urine.

Bij 595 zgn. "aanhouders" (categorie 4, 5, 6 en 7 dieren) werden de nieren met behulp van de N.N.N.T. onderzocht. Parallel werd urine onderzocht gebruikmakend van de testplaat voor de N.N.N.T. Hiertoe werden filtreerpapiertjes in de urine gedipt en op de testplaat gelegd. Op de filtreerschijfjes werd 25 µl van de TMP-oplossing B (zie bijlage 2) gedruppeld.

3. Methoden

3.1 Instructie gebruik standaardschijfjes (bijlage 1).

3.2 Wettelijke test als omschreven in het Onderzoekingsregulatief van de Vleeskeuringswet.

3.3 De Nieuwe Nederlandse Niertest (zie bijlage 2).

3.4 Hoogspanningselektroforese voor de identificatie van bacteriegroeiremmende stoffen (zie bijlage 3).

4. Resultaten

4.1 Standaardcontroleschijfjes

Tabel 2 geeft een totaaloverzicht van de gemiddelde diameter in mm, van de heldere zones van de standaard AB-schijfjes. In totaal zijn de remmingszones van 260 schijfjes verwerkt. Deze schijfjes werden regelmatig (ca. 10 keer) door het referentielaboratorium naar de deelnemende laboratoria verstuurd.

4.2 Nieren van zgn. "aanhouders"

Tabel 3 geeft een overzicht van de resultaten van de vergelijking wettelijke test t.o.v. Nieuwe Nederlandse Niertest uitgevoerd met 4454 nieren van zgn. "aanhouders". Aangegeven is, voor zover mogelijk, het aantal positieve per diersoort verkregen met de twee methodes.

Voor R.V.V. kring 6 en kring 13 was een uitsplitsing per diersoort niet geheel mogelijk, zodat daar volstaan is met het aangeven van totaal aantal onderzochte nieren. Van de diersoorten schaap en paard zijn verhoudingsgewijs wat minder nieren onderzocht.

Positief wil zeggen > 15 mm remmingszone wettelijke niertest en > 20 mm remmingszone Nieuwe Nederlandse Niertest.

In totaal werden 4454 nieren onderzocht met beide methodes.

Aantal positief met N.N.T. 76 1,7%.

Aantal positief met N.N.N.T. 224 5,0%.

4.3 Nieren van zg. "1/2%-onderzoek"

Tabel 4 geeft een overzicht van het aantal onderzochte dieren, voornamelijk varkens, met zowel de wettelijke test alsook de Nieuwe Nederlandse Niertest.

Bij 1,3% van de normale dieren was de N.N.N.T. positief.

4.4 Identificatie met behulp van H.V.E.

Gedurende de gehele proefperiode zijn van een aantal nieren, onderzocht met de beide methodes, de bacteriegroeiremmende stoffen geïdentificeerd met behulp van H.V.E. Uit de H.V.E. gegevens blijkt dat er soms een negatief resultaat werd verkregen.

Momenteel wordt er gewerkt aan de verdere verbetering van het H.V.E.-systeem om ook de lagere niveaus van antimicrobiële componenten te kunnen identificeren.

5. Discussie

De huidige, wettelijke voorgeschreven *S. lutea* niertest heeft een te smal detectiespectrum om te kunnen voldoen aan het gevoeligheidspatroon van de EEG-vierplatentest, welk spectrum (tabel 1) momenteel binnen de EEG als referentiewaarde gezien wordt voor elk nationaal testsysteem (1,2,3,4,9). Het EEG-vierplatensysteem is als referentiemethode toepasbaar voor vlees.

De in dit rapport beschreven Nieuwe Nederlandse Niertest (N.N.N.T.) is een gemodificeerde versie van de reeds eerder beschreven prescreeningstest (7). De modificaties, voortvloeiende uit deels gepubliceerd onderzoek (8), werden geïntroduceerd om de afleesbaarheid en gevoeligheid ten aanzien van sulfonamides te verbeteren. De belangrijkste veranderingen betroffen:

- a) de agarsamenstelling (toevoeging van NaCl, buffers, dextrose en trimethoprim),
- b) opdruppeling van trimethoprim op het met nierbekkenvocht geïmpregneerde papierschijfje,
- c) de incubatietemperatuur (37°C in plaats van 30°C),
- d) bovendien werd in dit onderzoek gebruik gemaakt van een commercieel verkrijgbare *B. subtilis* BGA stam.

De konsekwenties van deze veranderingen waren:

- verbetering in de afleesbaarheid en reproduceerbaarheid van het test-systeem;
- sterke verbetering ten aanzien van de gevoeligheid van sulfaresiduen;
- een geringe afname in gevoeligheid ten aanzien van aminoglycoside (o.a. dihydrostreptomycine) residuen ten opzichte van de prescreeningstest (7), maar desondanks een sterke verbetering ten opzichte van de huidige wettelijke test.

De resultaten verkregen met de N.N.N.T. zullen hierna geëvalueerd en bediscussieerd worden met betrekking tot de huidige wettelijk voorgeschreven *S. lutea* niertest, EEG-vierplatentest, identificatie (hoogspanningselectroforese) en reproduceerbaarheid (herkeuringsproblematiek).

5.1 Nieuwe Nederlandse Niertest vs. wettelijk voorgeschreven niertest

Het zijn beide eenvoudige testsystemen, welk op grote schaal uitgevoerd kunnen worden en vereisen beide geen grote financiële investeringen. Uit de resultaten blijkt dat het aantal positieve uitslagen met de N.N.N.T. het drievoudige is van dat met de huidige, wettelijk voorgeschreven N.N.T. Het percentage positieve uitslagen is vermoedelijk seizoen gebonden. Een breder scala van antimicrobiële middelen (o.a. chlooramphenicol, macroliden, oxytetracycline, sulfa's) kan worden opgespoord met de N.N.N.T. Ook bij het 1/2% onderzoek van normale slachtdieren was in 1,3% van de onderzoeken het resultaat met de N.N.N.T. positief (vooral sulfa en sulfonen residuen).

Met de huidige *S. lutea* niertest wordt zelden een positief resultaat bij normale slachtdieren gevonden. Dit is niet verwonderlijk gezien het smalle detectiespectrum van laatstgenoemde test (zie tabel 1).

5.2 Nieuwe Nederlandse Niertest vs. EEG-Vierplatentest

De EEG-vierplatentest (EEG-test) is oorspronkelijk ontwikkeld om vlees op antimicrobiële residuen te onderzoeken. De EEG-test is erg arbeidsintensief (duur dus), reden waarom er naar een goedkoop alternatief is gezocht zoals de N.N.N.T. Uit voorgaande onderzoeken bleek reeds dat in geval van een positieve vleestest met de EEG-test de zgn. prescreeningstest (één-plaat-methode) eveneens positief was (3,4,7,9).

Ook in niet gepubliceerd, vergelijkend onderzoek tussen RIKILT en RVV-kring 6 werd deze bevinding bevestigd. Dit resultaat is niet zo verwonderlijk aangezien de antibioticaconcentraties in het niermerg/nierbekken gemiddeld een factor 10 tot 20 hoger liggen dan in vlees (penicilline-derivaten: 6-90 X; oxytetracycline: 5-10 X; macroliden: 4-10 X; aminoglycosides: > 30 X) (zie Proefschrift Nouws, 5).

Het ligt anders bij eventueel nieronderzoek met de EEG-test. Meerdere malen is reeds gesteld dat de EEG-test als referentietest voor orgaanonderzoek niet voldoet (2,3,4,6). Veel vals-positieve uitslagen (varkens, schapen, paarden) worden verkregen bij nierschorsonderzoek (in mindere mate bij niermergonderzoek) met de EEG-test. Met de EEG-test zijn de aminoglycoside (retentie in nierschors) en tetracycline residuen in nieren op iets gevoeliger wijze opspoorbaar vergeleken met de N.N.N.T. (het verschil is marginaal). Echter bevestigingsonderzoek met HVE is noodzakelijk bij een positieve EEG-test om voornoemde residuen te kunnen onderscheiden van vals-positieve. Daarentegen zijn sulfonamide- en chlooramphenicol residuen met de N.N.N.T. beter opspoorbaar dan met de EEG-test.

Recent onderzoek toonde aan dat het percentage vals-negatieve bij nierweefselonderzoek met de prescreeningstest (7) erg laag was ten opzichte van de EEG-test (3,4,9). Dien ten gevolge mag worden aangenomen dat het percentage vals-negatieve eveneens bijzonder laag zal zijn met de N.N.N.T.

Nogmaals dient benadrukt te worden dat het onmogelijk is om met de tot op heden beschreven methoden elkaar overlappende resultaten te verkrijgen. Dit vanwege het voorkomen van vals-positieve bij b.v. de EEG-test en steeds weer iets ander gevoeligheidsspectrum van iedere testmethode.

Vleesonderzoek met de EEG-test (vierplaten test) zal vermoedelijk niet geheel vervangen kunnen worden door een methode gebruikmakend van de testplaat van de N.N.N.T. (dus een één-plaatmethode).

Indien er binnen de EEG zeer lage tolerantienormen gesteld gaan worden voor o.a. chlooramphenicol, nitrofurane, sulfonamides dient er naar alternatieve methoden gezocht te worden. Bij een 10 ppb norm voor chlooramphenicol voldoet de N.N.N.T. niet en als aanvullend alternatief kan gedacht worden aan HPLC en immuno-assays (b.v. Quick-card).

Urine-onderzoek (ongeveer 10 tot 100 keer hogere concentratie dan in niermerg uitgezonderd aminoglycosides) om antibiotica-residuen op te sporen zou eveneens een alternatief kunnen zijn (b.v. in geval van een 10 ppb level oxytetracycline en sulfonamides).

5.3 Reproduceerbaarheid van de N.N.N.T.

5.3.1 Testschijfjes.

Het kwaliteitscontrolesysteem met de standaardschijfjes laat duidelijk zien dat goed reproduceerbare gegevens verkregen kunnen worden tussen de verschillende laboratoria. Een uitzondering hierop vormt dapsone (een sulfone). Ook bij andere testsystemen (melkcontrole) blijkt deze antimicrobiële stof zich afwijkend te gedragen ten aanzien van de reproduceerbaarheid van testuitslagen. Oorzaak is niet bekend. Overgegaan zal worden naar een ander sulfa-testschijfje (b.v. sulfadimidine, sulfadiazine).

5.3.2 Nieronderzoek.

Invriezen van simultaan met nierbekkenvocht geïmpregneerde paperschijfjes voorkomt grotendeels inactivatie van eventueel aanwezige penicilline derivaten. Vooralsnog lijkt deze methode een betere garantie te geven ten aanzien van de reproduceerbaarheid dan in geval van invriezen van de gehele nier (slecht reproduceerbaar; soms veel grotere zones, soms geen remmende stoffen meer aangetoond; tabel 5).

Oorzaken van kleinere remzones zouden kunnen zijn:

- a) verdunningseffect op de aanwezige residuen (penicilline-derivaten) in het nierbekken ten gevolge van het uitgetreden niervocht (veel dripsap in het nierbekken);
- b) inactivatie van o.a. penicilline-derivaten ten gevolge van het vrijkomen van enzymen (beta-lactamases) uit de nierschors bij het ontdooien.

In geval van grotere remzones zijn vaak aminoglycosides in het spel; deze antibiotica zijn intracellulair geaccumuleerd (retentie) vooral in de nierschors, welke bij ontdooien van de nier vrijkomen.

Kortom het invriezen van de nier is niet gewenst bij de N.N.N.T., dit in tegenstelling tot de huidige wettelijk voorgeschreven N.N.T. waarbij getracht wordt om de penicilline inactivatie te minimaliseren (hoogste beta-lactamase activiteit in de nierschors).

Ook met de ongeopende, gekoelde karkasnier kan binnen 48 uur na slachten een reproduceerbaar resultaat verkregen worden (tabel 8). De eerste resultaten duiden erop dat na 48 uur koeling een merkbare enzymatische inactivatie van penicilline derivaten in het nierbekken toeneemt (lysis nier? bacteriële oorzaak?). Tetracyclines (b.v. oxytetracycline, chloortetracycline, doxycycline), aminoglycosides (b.v. streptomycine, kanamycine), macroliden (b.v. tylosine, spiramycine) zijn stabiel in het nierbekken. Echter, is de nier eenmaal opengesneden, dan is de reproduceerbaarheid slecht. Dit komt vermoedelijk door indrogen (minder vochtopname papierschijfje), door inactivatie ten gevolge van enzymen uit de nierschors en van beginnende bacteriële groei van o.a. beta-lactamase producerende Pseudomonadaceae en Enterobacteriaceae spp.

5.4 Identificatie met hoogspanningselectroforese (HVE)

Bij kleine remzones kon met behulp van hoogspanningselectroforese de remmende stof niet altijd aangetoond of geïdentificeerd worden (vooral in de beginfase van het onderzoek). Het zou echter onjuist zijn te concluderen dat bij het niet kunnen bevestigen de positieve bevindingen met de N.N.N.T. als vals-positieve uitslag aan te merken. Het is veeleer een tekortschieten van de HVE procedure. Tabel 9 laat zien dat bij kleine remzones verkregen met de N.N.N.T. op dat moment in de urine nog duidelijk antibacteriële stoffen aangetoond konden worden. In het laatste deel van het onderzoek kon in de RVV-kring 6 door uitvoering van HVE op dezelfde dag van de testuitslag, bij vrijwel alle positieve resultaten met de N.N.N.T. de remmende stof geïdentificeerd worden. Aan een verdere verbetering van het HVE systeem wordt gewerkt om op zeer laag niveau de antibacteriële componenten (o.a. sulfa's) te kunnen identificeren. In verband met instabiliteit van vooral penicilline-derivaten lijkt een remmingszone van > 20 mm als grens reëel.

5.5 Bevestiging sulfapreparaten

Ter bevestiging van sulfapreparaten werd op met nierbekkenvocht geïmpregneerde schijfjes 25 µl para-amino-benzoëzuur (0,5%) gedruppeld. Indien, na incubatie, bij de met para-amino-benzoëzuur behandelde schijfjes een bacteriegroeiremming afwezig of duidelijk kleiner was en deze bacteriegroeiremming aanwezig was bij de niet behandelde schijfjes, dan werd een sulfapreparaat aanwezig geacht.

6. Conclusies

- Uit de resultaten van het onderzoek met geïmpregneerde papierschijfjes blijkt dat een dergelijk systeem toepasbaar lijkt als kwaliteitscontrolesysteem.
Een kwaliteitsborgingsprogramma kan op deze manier worden opgezet.
- Uit de resultaten blijkt dat de N.N.N.T. een eenvoudige, op grote schaal uit te voeren, goedkope test is, welke een breder gevoeligheidsspectrum bezit dan de huidige wettelijk voorgeschreven test en die het gevoeligheidsspectrum van de EEG referentietest evenaart. In verband met de instabiliteit van penicilline-derivaten lijkt een remmingszone van 20 mm als grens reëel. Bij ongeveer 5% van de aangehouden dieren en bij 1,3% van de normale dieren die in het kader van de 1/2%-regeling onderzocht worden, werden positieve uitslagen gevonden.
- De identificatie van de bacteriegroeiremmende stof met behulp van hoogspanningselectroforese is nagenoeg altijd mogelijk. De methode dient verder geoptimaliseerd te worden.
- Bevestigen dat kleinere remmingszones inderdaad afkomstig zijn van antimicrobiële preparaten is mogelijk gebleken uit het parallel onderzoek met urine.
- Het simultaan impregneren met nierbekkenvocht van twee extra papierschijfjes en deze bewaren bij -25°C, lijkt een geschikte methode voor een eventueel antibioticaherkeuringsonderzoek.
- Het onderzoek met de 2e karkasnier toont aan dat het AB-onderzoek vanuit een max. 2 x 24 uur gekoeld bewaarde nier mogelijk is. Voorwaarde is wel dat de nier ongeopend blijft tot het moment van onderzoek.
- Diepvriezen van de nier vermindert de reproduceerbaarheid.

7. Referenties

1. Bogaerts, R., and Wolf, F.: A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft*. 1980, 60, 667-675.
2. Engel, H.W.B., Leusden, F.M. van, and Nouws, J.F.M.: Evaluation of the European Communities (EC) four-plate method for the detection of residues of antimicrobial drugs in slaughtered animals. In: *Antimicrobials and agriculture*. Butterworths, London. p. 491-499.
3. Engel, H.W.B., Leusden, F.M. van, Hofstee, M.P.M., Wijnands, L.M., Schoenmakers, M.J.G., Blaauw, L.H. de: Evaluatie van de voorspelende waarde, specificiteit en hanteerbaarheid van een aantal eenvoudige testsystemen ten opzichte van het "EG-vierplaten systeem" met betrekking tot de detectie van residuen van antibacteriële stoffen in slachtdieren. RIVM-rapport 842026001. 1985.
4. Noppen, K. van: Een alternatieve microbiologische methode voor het opsporen van kiemgroeiremmende stoffen bij slachtdieren. Thesis, Gent 1984.
5. Nouws, J.F.M.: Tissue distribution and residues of some antimicrobial drugs in normal and emergency-slaughtered ruminants. Thesis Utrecht 1978.
6. Nouws, J.F.M., Schothorst, M. van, and Ziv, G.: A critical evaluation of several microbiological test methods for residues of antimicrobial drugs in ruminants. *Arch. Lebensmittelhyg.* 1979, 30, 4-8.
7. Nouws, J.F.M.: Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. *Arch. Lebensmittelhyg.* 1981, 32, 103-110.
8. Nouws, J.F.M., Vree, T.B., Driessens, F., Smulders, A.: An improved bio-assay for qualitative detection of suphonamide and dapsone residues. *The Veterinary Quarterly* 1985, 7, 76-78.
9. Zutter, L. de, Koenen-Dierick, K., Hoof, J. van: Opsporen van kiemgroeiremmende stoffen bij slachtdieren. I. Vergelijking van methoden. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 1985, 54, 167-178.

Tabel 1: Gevoeligheden van een drietal testsystemen

	Concentratie in µg of I.U/ml. of gram		
	S. lutea niertest (N.N.T.)	EEG-test (4-platen) vlees	N.N.N.T. (nierbekken)
Beta-lactam antibiotica	0,02-0,2	0,02-0,2	0,05-0,4 (>0,02)*
Aminoglycosides	30-50	0,3-0,8	4-8 (>0,2)*
Oxytetracycline	>10	0,3-0,6	1-2 (>0,2)*
Chlooramphenicol	ongevoelig	>10	10-20 (>0,3)***)
Macroliden	>2	0,08-0,3	1-4 (>0,1)*
Sulfonamides	ongevoelig	1-5	0,05-1 (>0,1)*

* concentratie in het vlees

** dan beta-glucuronidase test nierbekken positief.

- Tussen haakjes antibioticaconcentratie in het vlees bij een positieve N.N.N.T.

- N.N.T. = Nederlandse niertest, positief indien de remmingszone > 15 mm is.

- N.N.N.T. = Nieuwe Nederlandse niertest, positief indien de remmingszone > 20 mm is.

Tabel 2: Standaardcontroleschijfjes

Totaaloverzicht van de gemiddelde diameters, in mm, van de heldere zones van standaard AB-schijfjes die door de deelnemers gedurende de gehele periode van het onderzoek gebruikt zijn.
n=268

	RIKILT gem. dia- meter + st. afw.		R.V.V.-2 gem. dia- meter + st. afw.		R.V.V.-5 gem. dia- meter + st. afw.		R.V.V.-6 gem. dia- meter + st. afw.		R.V.V.-13 gem. dia- meter + st. afw.	
Streptomycine n	18 14	1,6	17 12	2,2	19 14	2,7	18 5	0,4	18 10	1,2
Tylosine n	25 12	3,2	26 12	1,7	28 14	1,4	27 4	1,0	26 10	1,3
Oxytetra- cycline n	24 14	1,8	26 12	1,9	27 13	2,3	26 3	1,5	25 10	1,5
Chloor- amphenicol n	20 18	2,1	23 12	2,0	24 14	1,0	22 5	1,3	22 10	1,6
Dapsone n	32 11	5,1	21 12	6,8	24 12	3,9	28 5	3,3	33 10	5,8

n = aantal standaard controleschijfjes.

Tabel 3: Aantal onderzochte nieren per diersoort en het aantal positieve per methode.
Nederlandse Niertest (N.N.T.) resp. Nieuwe Nederlandse Niertest N.N.N.T.
Categorie: aanhouders.

R.V.V. lab	Diersoort	Varken		Rund		Kalf		Schaap		Paard		Totaal	
		aantal	%	aantal	%	aantal	%	aantal	%	aantal	%	aantal	%
2		1170		154		30		17		8		1379	
	N.N.T.	15	1,3	1	0,6	1	3,3	-	-	-	-	17	1,2
	N.N.N.T.	21	1,8	4	2,6	1	3,3	2	11,8	-	-	28	2,0
5		494		78		351		11		2		936	
	N.N.T.	5	1,0	3	3,8	1	0,3	1	9,1	-	-	10	1,1
	N.N.N.T.	30	6,1	7	9,0	6	1,7	1	9,1	2	100	46	4,9
6		*		*		*		*		*		1100	
	N.N.T.											13	1,2
	N.N.N.T.											54	4,9
		652		48		7		14				721	
	N.N.T.	17	2,6	4	8,3	1	14,3	3	21,4			25	3,5
	N.N.N.T.	59	9,0	9	18,8	2	28,6	2	14,3			72	10,0
13		*		*		*		*		*		218	
	N.N.T.											8	3,7
	N.N.N.T.											14	6,4
		87		12						1		100	
	N.N.T.	3	3,4	-	-							3	3,0
	N.N.N.T.	6	6,9	4	33,3							10	10,0
Totaal 2,5,6,13		2403		292		388		42		11		4454	
	N.N.T.	40	1,7	8	2,7	3	0,8	4	9,5	-	-	76	1,7
	N.N.N.T.	119	5,0	24	8,2	9	2,3	5	11,9	2	18,2	224	5,0

* diersoort niet nader gespecificeerd

** positief wil zeggen remmingszone > 15 mm bij N.N.T. en remmingszone > 20 mm bij N.N.N.T.

Tabel 4: Aantal onderzochte nieren en het aantal positieve per methode.
Nederlandse Niertest resp. Nieuwe Nederlandse Niertest.
Categorie: 1/2% onderzoek.

R.V.V. lab	positief met:		
2	Aantal	230	
	N.N.T.	-	
	N.N.N.T.	5	2,2%
5	Aantal	23	
	N.N.T.	-	
	N.N.N.T.	-	
6	Aantal	290	
	N.N.T.	-	
	N.N.N.T.	2	0,7%
Totaal	Aantal onderzocht	543	
	N.N.T.	0	0 %
	N.N.N.T.	7	1,3%

* Positief wil zeggen remmingszone \geq 15 mm bij de N.N.T. en
een remmingszone $>$ 20 mm bij de N.N.N.T.

Tabel 5: Effect van invriezen van de positieve nier, op het resultaat van de N.N.T. en de N.N.N.T.

DIER-SOORT	ONDERZOEK NIET BEVROREN NIER DIAMETER REMMINGSZONE IN MM				ONDERZOEK BEVROREN EN ONTDOOIDE NIER DIAMETER REMMINGSZONE IN MM			
	N.N.T.		N.N.N.T.		N.N.T.		N.N.N.T.	
			- β -glucu	+ β -glucu			- β -glucu	+ β -glucu
Kalf	-	-	37	36	-	-	22	26
Kalf	20	20	32	32	20	20	32	32
Kalf	-	-	16	21	17	17	16	16
Kalf	-	-	16	21	17	17	16	16
Kalf	-	-	28	32	19	19	19	19
Kalf	-	-	25	25	-	-	18	18
Rund	24	26	28	28	23	23	26	27
Rund	-	-	27	20	-	-	25	25
Rund	-	-	19	17	-	-	15	-
Rund	-	-	40	41	-	-	22	22
Rund	-	-	24	22	-	-	25	24
Varken	-	-	25	23	-	-	-	-
Varken	-	-	22	23	-	-	15	15
Varken	18	19	25	22	17	17	-	-
Varken	21	22	27	25	22	24	28	25
Varken	-	-	33	33	-	-	22	22
Varken	17	18	35	35	-	-	18	16
Varken	-	-	45	43	-	-	22	22
Varken	18	-	15	16	-	-	-	-
Varken	23	23	36	36	31	31	30	30
Varken	-	-	22	22	-	-	22	21
Varken	-	-	28	31	-	-	16	16
Varken	-	-	17	18	17	17	22	22
Varken	-	-	18	24	-	-	22	21

β -glucu = β -glucuronidase

Tabel 6: Identificatie, met behulp van hoogspanningselectroforese, van de bacteriegroeiremmende stof.

DIERSOORT	UITSLAG RVV				IDENTIFICATIE
	N.N.T.		N.N.N.T.		
			- β -glucu	+ β -glucu	
Kalf	18	18	16	17	Neomycine
Kalf	-	-	37	36	Sulfapreparaat
Kalf	20	20	32	32	Oxytetracycline
Kalf	-	-	16	21	Kanamycine
Kalf	vaag	vaag	29	26	Penicilline + Streptomycine
Kalf	-	-	28	32	Streptomycine + Penicilline
Kalf	-	-	25	25	Penicilline + Streptomycine
Rund	-	-	17	19	Streptomycine
Rund	-	-	23	16	Gentamycine cq Streptomycine
Rund	-	-	21	22	Streptomycine
Rund	24	26	28	28	Oxytetracycline
Rund	-	-	27	20	Penicilline + Streptomycine
Rund	-	-	40	41	Streptomycine + Oxytetra- cycline
Rund	-	-	24	22	Streptomycine
Varken	20	20	27	26	Penicilline
Varken	35	35	33	34	Penicilline
Varken	-	-	18	19	Streptomycine
Varken	-	-	16	24	Gentamycine
Varken	-	-	15	18	Streptomycine
Varken	32	34	26	25	Penicilline
Varken	18	18	29	29	Penicilline + Streptomycine
Varken	-	-	21	17	Negatief
Varken	-	-	23	20	Streptomycine
Varken	-	-	25	23	Streptomycine
Varken	-	-	22	23	Sulfapreparaat
Varken	21	22	27	29	Penicilline + Streptomycine
Varken	18	19	25	22	Penicilline
Varken	21	22	27	25	Streptomycine
Varken	-	-	33	33	n.o.
Varken	17	18	35	35	n.o.
Varken	-	-	28	30	Streptomycine
Varken	-	-	45	43	n.o.
Varken	18	-	33	25	n.o.
Varken	-	-	25	20	n.o.
Varken	23	-	36	36	Penicilline
Varken	-	-	22	22	Oxytetracycline
Varken	-	-	20	-	Negatief
Varken	-	-	28	31	Chlooramphenicol
Varken	-	-	20	20	Bacteriegroeiremning
Varken	-	-	-	26	Chlooramphenicol
Varken	-	-	20	20	Oxytetracycline
Varken	-	-	17	18	Oxytetracycline
Varken	-	-	19	24	Oxytetracycline

Tabel 7: Overzicht van de bacteriegroeiremmende werking (in mm) van met nierbekkenvocht geïmpregneerde schijfjes, direct onderzocht en na ca. 1 week bewaren bij -25°C.

DIER-SOORT	Uitslag N.N.N.T. diameter remmingszone in mm				IDENTIFICATIE
	direct		na 1 week -25°C		
	-β-glucu	+β-glucu	-β-glucu	+β-glucu	
Varken	34	34	34	35	Ampicilline
Varken	38	35	37	32	Oxytetracycline + Tylosine + Penicilline
Varken	33	37	34	30	Oxytetracycline + Tylosine + Penicilline
Varken	29	26	25	23	Oxytetracycline + Penicilline
Varken	34	34	34	35	Ampicilline
Varken	38	35	37	32	Oxytetracycline + Penicilline
Varken	33	37	34	30	Oxytetracycline + Penicilline
Varken	49	51	28	29	Penicilline
Varken	43	41	42	42	Penicilline + Streptomycine
Varken	36	33	33	31	Penicilline
Varken	31	33	28	28	Penicilline
Varken	24	21	22	21	Oxytetracycline
Varken	23	22	26	25	Streptomycine
Varken	22	23	22	22	Oxytetracycline
Varken	26	24	27	26	Penicilline
Varken	24	22	25	25	Oxytetracycline
Varken	19	18	24	23	Sulfapreparaat
Varken	36	42	35	36	Penicilline + Streptomycine
Varken	28	28	24	25	Penicilline
Varken	31	32	32	38	Penicilline + Streptomycine
Varken	23	24	20	22	Penicilline
Varken	20	22	22	20	Penicilline + Streptomycine
Varken	33	30	28	29	Penicilline + Streptomycine
Varken	36	33	30	27	Penicilline + Neomycine
Varken	29	30	27	23	Penicilline + Kanamycine
Varken	26	26	32	29	Penicilline + Streptomycine
Varken	28	31	25	24	Penicilline + Streptomycine + Oxytetracycline
Varken	32	31	36	34	Penicilline + Streptomycine
Varken	31	30	26	26	Penicilline + Streptomycine
Varken	32	30	30	29	Sulfapreparaat
Varken	19	24	21	20	Oxytetracycline + Penicilline
Varken	22	25	19	22	Penicilline + Streptomycine
Varken	24	21	27	22	Penicilline + Streptomycine
Varken	29	25	29	29	Streptomycine
Varken	21	19	24	22	Penicilline
Varken	23	24	24	22	Oxytetracycline
Rund	45	43	44	39	Penicilline
Rund	42	41	31	32	Oxytetracycline + Strepto- mycine + Sulfapreparaat
Rund	38	38	35	35	Sulfapreparaat
Rund	39	35	36	35	Penicilline + Neomycine
Rund	18	19	17	-	Penicilline
Kalf	26	24	26	27	Penicilline + Streptomycine
Schaap	43	43	39	40	Penicilline + Streptomycine
Schaap	32	31	28	30	Penicilline + Streptomycine

Tabel 8: Effect van 2 x 24 uur koelen van 2e karkasnier op het resultaat van de N.N.N.T.

DIER-SOORT	Uitslag N.N.N.T.		Diameter remmingszone in mm		Identificatie m.b.v. H.V.E.
	direct		na 2x24 uur koelen		
	-β-glucu	+β-glucu	-β-glucu	+β-glucu	
Varken	23	26	27	28	Penicilline
Varken	34	34	34	34	Ampicilline
Varken	33	31	29	26	Penicilline + Streptomycine
Varken	30	29	30	29	Streptomycine
Varken	27	27	32	27	Oxytetracycline
Varken	30	26	30	29	Oxytetracycline
Varken	38	35	34	34	Oxytetracycline + Penicilline
Varken	44	31	41	38	n.o
Varken	23	26	27	28	Oxytetracycline + Penicilline
Varken	34	34	34	34	Ampicilline
Varken	33	31	29	26	Streptomycine + Penicilline
Varken	30	29	30	29	Streptomycine
Varken	31	30	32	27	Oxytetracycline
Varken	30	26	30	29	Oxytetracycline + onbekende remstof
Varken	38	35	34	34	Oxytetracycline + Streptomycine
Varken	44	30	40	38	n.o.
Varken	43	41	36	36	Penicilline + Streptomycine
Varken	33	33	32	31	Penicilline + Streptomycine
Varken	23	22	19	20	Streptomycine
Varken	19	18	-	16	Oxytetracycline + Streptomycine
Varken	22	23	22	22	Oxytetracycline
Varken	26	24	27	23	Penicilline
Varken	24	22	24	22	Oxytetracycline
Varken	19	18	20	20	Sulfapreparaat
Varken	26	26	24	25	Penicilline + Streptomycine
Varken	28	31	23	25	Penicilline + Streptomycine + Oxytetracycline
Varken	32	32	25	26	Penicilline + Streptomycine
Varken	25	27	28	28	Oxytetracycline
Varken	34	30	27	33	Oxytetracycline + Streptomycine
Varken	19	21	19	19	Penicilline + Streptomycine
Rund	45	43	46	44	Penicilline
Rund	42	40	38	35	Oxytetracycline + Penicilline + onbekende remstof
Rund	42	41	41	39	n.o
Rund	45	43	44	39	Penicilline
Rund	42	41	42	39	Penicilline + Streptomycine + Sulfa
Rund	38	38	36	36	Sulfapreparaat
Rund	30	27	25	25	Penicilline
Rund	40	37	37	38	n.o.
Rund	36	35	35	35	Oxytetracycline + Penicilline +
Schaap	43	43	43	44	Penicilline + Streptomycine
Schaap	32	32	34	30	Penicilline + Streptomycine
Schaap	32	43	43	44	n.o.
Schaap	25	24	27	27	Penicilline + Streptomycine

Tabel 9: Relatie niervochtonderzoek en urine-onderzoek met N.N.N.T.
bij remmingszones < 20 mm.
Categorie: aanhouders.

Uitslag N.N.N.T. diameter remmingszone in mm				Identificatie m.b.v. H.V.E. vanuit de urine
Niervocht		Urine		
- β -glucu	+ β -glucu			
17	17	29	30	Chlooramphenicol
15	16	33	36	Oxytetracycline
18	17	31	30	Streptomycine + Oxytetracycline
18	16	33	33	n.o.

n.o. = niet onderzocht

Instructie gebruik AB-standaardschijfjes

1. Voedingsbodem

Conform intern analysevoorschrift nr A 435 (zie bijlage 2)

- Aantonen van residuen van bacteriegroeiremmende stoffen in nierbekken.

2. Werkwijze

Neem met een schone pincet een AB-standaardschijfje en leg dit meteen op een beënte voedingsbodem. Druk schijfje, met pincetpunten, zacht aan. Incubeer als voorgeschreven in bovengenoemd voorschrift.

Meet de diameter, in mm, van de heldere zone.

AFDELING MICROBIOLOGIE

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 435

3e oplage (1986-11-17)

NIER - AANTONEN VAN RESIDUEN VAN BACTERIEGROEIREMMENDE
STOFFEN IN NIERBEKKEN - MICROBIOLOGISCHE TEST METHODE

Verzendlijst: drs J.M.P. den Hartog, dr J.T.M. Nouws, drs M.M.L.
Aerts, N.J.G. Broex, bibliotheek (5x).

435.0

Nier - Aantonen van residuen van bacteriegroeiremmende stoffen in het nierbekken - Microbiologische test methode

1. Doel

Deze methode dient als screeningsmethode voor het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in boerderijmelk met behulp van *Bacillus subtilis* BGA als test organismen.

2. Principe

Een filtreerschijfje met nierbekkenvocht wordt op een voedingsbodem gebracht waarin voor bacteriegroeiremmende stoffen een gevoelige bacterie aanwezig is. Na incuberen wijst aanwezigheid van bacteriegroeiremmende werking rondom het schijfje op aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.

3. Micro-organismen

Bacillus subtilis BGA sporensuspensie, ca. 10^7 /ml.

(Op het RIKILT verkrijgbaar)

4. Voedingsbodem en reagentia

4.1 Standard II Nähragar (Merck art. nr. 7883).

4.2 Dextrose.

4.3 Natriumchloride p.a.

4.4 Natriumchloride-oplossing 0,8%.

4.5 Natriumchloride-oplossing 10,0%.

4.6 Zoutzuur 1 Mol.

(Goed afsluiten van de buitenlucht.)

4.7 Natriumhydroxydeoplossing 1 Mol.

Afvullen in goed afsluitbare 100 ml flesjes. Maximaal twee weken gebruiken. In verband met carbonaatvorming flesjes steeds goed afsluiten.

4.8 Fosfaatbuffer

Monokaliumfosfaat (KH_2PO_4)	20,0 g
Dinatriumfosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	28,0 g
Gedestilleerd water	1000 ml

4.9 Beta-glucuronidase (SIGMA: G-3510-type IX 500.000 IE) (zie 4.10.4)

4.10 Trimethoprimoplossing (TMP).

4.10.1 Trimethoprim base (SIGMA T-7833)	100 mg
Methanol	100 ml
(oplossing op RIKILT verkrijgbaar)	

4.10.2 TMP-oplossing A

Oplossing 4.10.1	1 ml
Natriumchlorideoplossing (4.4)	100 ml

4.10.3 TMP-oplossing B

Oplossing 4.10.1	1 ml
Natriumchlorideoplossing 10% (4.5)	500 ml

4.10.4 TMP-oplossing C

Beta-glucuronidase (4.9)	500.000 IE
TMP-oplossing B (4.10.3)	100 ml
(Ampullen met deze oplossing op RIKILT verkrijgbaar)	

5. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

Gebruikelijke instrumenten en glaswerk voor microbiologische laboratoria en in het bijzonder:

5.1 Petrischalen of glasplaten van 30 bij 30 cm met metalen opstaande rand van 1 cm.

5.2 Infusieflessen van 250 en 500 ml

5.3 Groot scherp slagermes.

5.4 Papierschijfjes met een diameter van 12,7 mm (Schleicher en Schüll art. 601/2).

5.5 Micropipet van 25 µl.

6. Bereiding van voedingsmedium en testplaten

6.1 Bereiding van het medium

Standard II Nähragar (4.1)	12,5 g
Dextrose (4.2)	5,0 g
Natriumchloride p.a. (4.3)	5,0 g
Fosfaatbuffer (4.8)	50 ml
Gedestilleerd water	450 ml

Weeg de droge componenten af, voeg de fosfaatbuffer toe en los het geheel op in warm water. Stel de pH van deze oplossing zodanig in dat deze na sterilisatie $7,00 \pm 0,1$ bedraagt bij 25°C. Steriliseer het aldus bereide medium gedurende 15 min bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

Controleer de pH na sterilisatie.

Koel af tot 50 à 55°C.

6.2 Beënting en gieten van de voedingsbodem

Voeg per 100 ml steriele voedingsbodem, van ca. 55°C, 1,2 ml

TMP-oplossing A (4.10.2) toe.

Ent per 100 ml steriele voedingsbodem van ca. 55°C 0,1 ml B.subtilis sporensuspensie (3).

Meng goed en giet dit medium uit in petrischalen (5.1) of grote glasplaten zodanig dat de agarlaagdikte, over de gehele plaat 2,2 mm is. Laat stollen.

N.B. Deze beënte platen vóór gebruik max. 1 dag bij ca. 2°C bewaren.

7. Werkwijze

Bewaar de te onderzoeken nieren, tot het moment van onderzoek, bij +4°C en zorg dat er geen onderlinge contaminatie kan optreden.

7.1 Nieren

Snij met een, onder stromend warm water gereinigd, slagermes (5.3) vanuit de nierschors tot diep in het nierbekken.

Leg met een schone pincet twee papierschijfjes (5.4) in het nierbekken of, bij kleine nieren, op de grens van nierbekken en niermerg.

Nier dichtklappen en even aandrukken.

Na ongeveer 30- 60 minuten, met een schone pincet, de schijfjes uit de nier diagonaalsgewijs op de voedingsbodem leggen. (Ter vermindering van contaminatie bij elke nier een schone pincet nemen.)

Druppel op een van de op de voedingsbodem gelegde schijfjes 25 µl TMP-oplossing B (4.10.3) en op het andere schijfje 25 µl TMP-oplossing C (4.10.4). Petrischalen afdekken met deksel. Bij gebruik van grote glasplaten de platen, ter voorkoming van condens, afdekken met filtreerpapier en een glasplaat. Zorg er wel voor dat het filtreerpapier niet de voedingsbodem raakt!

7.2 Incubatie

Preincubeer de platen min. 1/2 uur tot max. 2 uur bij kamertemperatuur.

Incubeer vervolgens de platen gedurende 13-15 uur bij 37°C.

Bij gebruik van grote platen (30x30 cm) deze, tijdens de incubatie, niet stapelen.

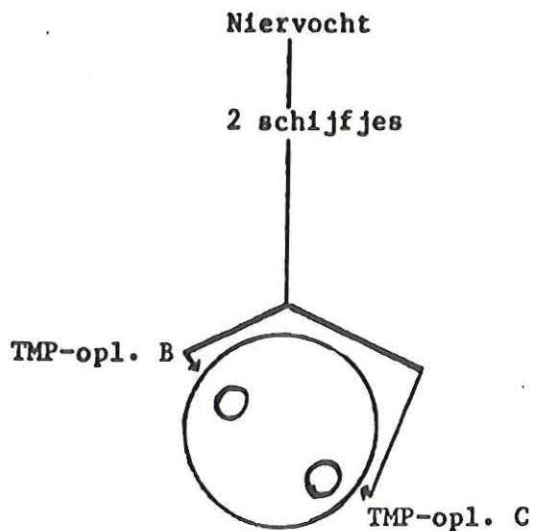
8. Interpretatie van de resultaten

Meet de diameter van de heldere remmingszones in mm.

Alleen die remmingszones gelijk of groter dan 20 mm als positief aanmerken.

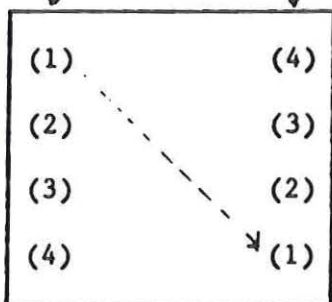
Vertoont het schijfje met Beta-glucuronidase-TMP-oplossing C een veel grotere remmingszone dan het met TMP-oplossing B behandelde schijfje dan vermoedelijk chlooramphenicolresiduen aanwezig. Vertoont deze een veel kleinere remmingszone dan vermoedelijk penicilline-derivaten aanwezig (penicillinase activiteit).

9. Inzetschema



of

TMP oplossing B TMP oplossing C



Samenstellers : dr J.F.M. Nouws, N.J.G. Broex

AFDELING MICROBIOLOGIE

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 471

1e oplage (1986-11-23)

NIER - IDENTIFICATIE VAN RESIDUEN VAN BACTERIEGROEIEMMENDE STOFFEN -
HOOGSPANNINGSELEKTROFORESE IN COMBINATIE MET BIOAUTOGRAFIE

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling MICROB (5x).
drs J.M.P. den Hartog, dr J.F.M. Nouws, drs M.M.L.
Aerts, N.J.G. Broex

471.0

Afdeling microbiologie

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 471

1e oplage (1986-11-23)

Nier - Identificatie van residuen van bacteriegroeiremmende stoffen -
Hoogspanningselectroforese in combinatie met bioautografie

1. Doel

Deze methode beschrijft de identificatie van residuen van bacteriegroeiremmende stoffen in nieren van slachtdieren met behulp van hoogspanningselectroforese in combinatie met bioautografie, met als testorganismen *Bacillus subtilis* B.G.A. en *Sarcina lutea* ATCC 9341.

2. Principe

Een fijn gemalen hoeveelheid nierbekken wordt m.b.v. plastic monstercupjes op een beënte voedingsbodem gebracht en gedurende enige uren geëlektroforeerd.

De identificatie van de verschillende antibiotica is mogelijk aan de hand van de Rf. waarden van de bacteriegroeiremmende zones die zichtbaar worden nadat de platen met voedingsbodem zijn geïncubeerd bij 37°C.

3. Micro-organismen

3.1 *Bacillus subtilis* B.G.A. sporensuspensie ca. 10⁷/ml (in de handel verkrijgbaar Merck art. 10649)

3.2 *Sarcina lutea* ATCC 9341

Ent een öse van een stokcultuur in Brain Heart Infusion Broth (4.1). Incubeer gedurende 24 uur bij 37°C. Deze gebruikscultuur is stabiel gedurende max. 1 week bewaren bij 4°C.

De entsuspensie moet ongeveer 10⁷ kve/ml bevatten.

4. Voedingsbodem en reagentia

4.1 Voedingsbodem voor het aanhouden van de stam*

Aftreksel van kalfshersenen (in droge vorm)	12,5 g
Aftreksel van runderhart (in droge vorm)	5,0 g
Proteose pepton	10,0 g
Glucose	2,0 g
Natriumchloride (NaCl)	5,0 g
Dinatriumwaterstoffosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	2,5 g
Gedest. water	1000 ml

Los op door verhitting stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $7,4 \pm 0,1$ bedraagt bij 25°C .

Vul af in kultuurbuizen à 10 ml per buis en steriliseer gedurende 20 min. bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

* In gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar (Brain Heart Infusion Broth)

4.2 Voedingsbodem voor de electroforese

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gistextract	3,0 g
Lab lemco	1,5 g
Dextrose	1,0 g
Agar (purified agar OXOID L-28)	7,5 g
Gedest. water	1000 ml

Los op door verhitting en stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $6,0 \pm 0,1$ of indien gewenst $8,0 \pm 0,1$ bedraagt bij 25°C , steriliseer 20 min. bij 121°C .

(Controleer de pH na sterilisatie)

4.3 Buffer

Pepton	12,0 g
Trypton	8,0 g
Gistextract	6,0 g
Lab lemco	3,0 g
Dextrose	2,0 g
Gedest. water	1000 ml

Los op en stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie $6,0 \pm 0,1$ of indien gewenst $8,0 \pm 0,1$ bedraagt bij 25°C steriliseer 20 min. bij 121°C .

(Controleer de pH na sterilisatie)

4.4 Fysiologische zoutoplossing

Natriumchloride NaCl p.a.	8,5 g
Gedest. water	1000 ml

Los op en steriliseer 15 min. bij $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in porties van max. 500 ml.

4.5 Zoutzuur 1 mol/l

4.6 Natriumhydroxide 1 mol/l

4.7 Kleurstofstandaard: Brilljantzwart opl. 0,1%

Briljantzwart	0,1 g
Gedest. water	100 ml

Los op door schudden.

Deze oplossing is gedurende 1 jaar houdbaar bij kamertemperatuur.

5. Apparatuur en glaswerk

5.1 Electroforese apparatuur

Gebaseerd op het principe of Smither e.a.

(Zie J. of Appl. Bacteriology 1978, 44, 421-429)

Perspex beveiligingsbak met een koudwatertafel van 92 x 20 cm en aan iedere zijde 2 buffertankjes (afm 21 x 8 x 5 l x b x h) en 2 platina elektroden (60 cm platina draad gewikkeld om een glasstaaf van 15 cm).

5.2 Krachtbron

Voor het leveren van max. 2500 Volt en 100 mA.

5.3 Koeling

Koelcapaciteit, min. 10°C in koudwatertafel.

5.4 Glasplaten van 92 x 20 cm met een dikte van 5 mm

5.5 Raamwerk

Voor het gieten van de agarlaag op glasplaten.

Inwendige afm. 90 x 17 cm.

5.6 Filtreerpapier

(Stromübertragungstreifen van Camag)

5.6.1 Filtreerpapier met een afm. van 17 bij 9 cm voor de verbinding van beiden buffertanks.

5.6.2 Filtreerpapier met een afm. van 17 bij 12 cm voor de verbinding van buffertank en agarlaag.

5.7 Stoof 30 +/- 1°C

5.8 Ultra torrax of vergelijkbaar

5.9 pH meter

5.10 Laboratoriumglaswerk al dan niet steriel

5.11 Dialysemembraan (bacteriegroeiremmende stoffen vrij!!)

Voor gebruik enige tijd koken in water.

5.12 Plastic monstercupjes met inwendig een diameter van +/- 10 mm

6. Standaarden

Gewenste standaarden van bekende concentratie, opgelost in geschikt oplosmiddel.

b.v. Penicilline, Ampicilline, Streptomycine, Oxytetracycline, Gentamycine, Neomycine etc.

7. Werkwijze

7.1 Gereedmaken van de testplaten

Plaats een met 70% ethanol gereinigde glasplaat (5.4) met raamwerk (5.5) op een waterpas gestelde ondergrond. Bij voorkeur koud-, warmwatertafel. Fixeer het raamwerk langs de binnenkant met enkele ml onbeënte voedingsbodem (4.2). Voeg vervolgens entsuspensie (3.) toe aan 200 ml voedingsbodem (4.2). Gebruik B.subtilis BGA bij een pH 6.0 en/of pH 8.0 en S.lutea bij een pH 8.0.

B.subtilis B.G.A. 0,1 ml (3.1) enten per 100 ml voedingsbodem.

S.lutea 0,1 ml (3.2) enten per 100 ml voedingsbodem.

Meng de geënte voedingsbodem zorgvuldig en giet uit op de glasplaat (luchtbellen voorkomen!). Laat de agarlaag stollen.

Leg de te gebruiken testplaat op de koudwatertafel in de perspex beveiligingsbak en haal het raamwerk van de testplaat.

Plaats aan weerszijden van de koudwatertafel 2 buffertankjes en vul deze elk met 450 ml buffer (4.3). Bij een testplaat van pH 6.0 een buffer met een pH van 6.0, bij een testplaat van pH 8.0 een buffer met een pH van 8.0.

Breng de platina elektroden in de buitenste buffertankjes en verbind deze met de krachtbron.

Breng papierbruggen (3 vellen) aan tussen beide buffertankjes en tussen de binnenste tankjes en de uiteinden van de testplaat m.b.v. filtreerpapier (5 vellen) (5.6.1 en 5.6.2). Zorg dat de papierbruggen goed met buffer bevochtigd zijn.

7.2 Monstervoorbereiding

Neem ca. 10 gram van het nierbekkenweefsel, versnipper dit met een schone schaar en maal vervolgens deze hoeveelheid fijn met een ultratorrax (5.8).

Breng met een schone spatel ca. 1 gram fijn gemalen weefsel in een monstercupje (5.12) en sluit dit cupje af met een dialyse-membraan m.b.v. een elastiekje.

7.3 Opbrengen van monsters

Plaats de met nierweefsel gevulde monstercupjes met de met het dialyse-membraan afgesloten zijde op regelmatige afstand van elkaar in het midden van de testplaat.

Breng op iedere testplaat een controleschijfje met 20 µl briljant-zwartoplossing, eveneens in het midden van de plaat.

7.4 Elektroforese

Sluit de perplexbeveiligingsbak.

Stel de krachtbron in op een konstant ampèrage en voer de stroomsterkte op tot 100 mA. De spanning moet dan ca. 2000 V zijn.

Schakel de krachtbron na ca. 1 uur uit, verwijder de monstercupjes. Bevochtig de papierbruggen met buffer uit de tankjes, sluit de beveiligingsbak en schakel de krachtbron weer in zoals genoemd.

Beëindig de elektroforese indien de referentiestof, briljantzwart, een afstand van ca. 40 cm op de pH 8.0 plaat en ca. 30 cm op de pH 6.0 plaat heeft afgelegd.

Schakel de krachtbron uit.

Verwijder de papierbruggen, breng het raamwerk aan en laat de agar evt. drogen aan de lucht zodanig dat op de agar liggende druppels zijn verdwenen.

Dek de testplaat af met een glazen plaat.

7.5 Incubatie

Incubeer de testplaten gedurende ca. 18 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

8. Beoordeling

Meet de afstand van de kop en staart van de zone waarin duidelijke bacteriegroeiremmende werking zichtbaar is. Leg tevens de vorm van de vlek vast. Fotografeer de testplaat.

9. Interpretatie

Vergelijk de gevonden patronen van de vlekken met de bacteriegroei-remming van die van de standaarden op verschillende platen of met referentie patronen van andere antibiotica en/of chemotherapeutica. Indien de patronen uit het monster overeenstemming vertonen met de patronen van standaarden kan worden gezegd, dat in het monster stoffen zijn aangetoond welke qua patroon gelijken op de met name te noemen standaarden.

Verantwoordelijk: N.J.G. Broex

Samenstellers : W.D.M. Driessen-van Lankveld, N.J.G. Broex

