

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van antibiotica op microbiologische wijze.

Onderwerp: Sulfaresiduen in boerderijmelk.

Bijlagen: 2.

Doel:

Ontwikkeling van een microbiologische bepalingsmethode om sulfaresiduen in boerderijmelk aan te tonen.

Samenvatting: Een tussenverslag van de onderzoekresultaten tot nu toe om te komen tot de gewenste onderzoekmethode.

Uitgevoerd werden een drietal ringonderzoeken met de Melkcontrolestations en een Keuringsdienst van Waren en een vervolgonderzoek met een Melkcontrolestation en een Keuringsdienst van Waren.

Conclusie:

Als de oorzaak van de zogenaamde vals-positieve eindresultaten wordt verholpen is met de uitgeteste methode 2 µg/ml sulfamethazine aantoonbaar.

Verantwoordelijk: N. Broex

Medewerkers/Samenstellers: E. van Neer-Streutjens, N. Broex

Projektleider: N. Broex

1. Inleiding

Ten behoeve van het onderzoek naar een methode om sulfaresiduen in rauwe melk aan te tonen zijn een drietal ringonderzoeken gehouden, met de Melkcontrolestations en een Keuringsdienst van Waren, om de voorgestelde methode uit te testen.

De resultaten van deze ringonderzoeken waren niet zodanig dat de methode met voldoende zekerheid toepasbaar is op de Melkcontrolestations. Problemen zijn er nog met het verzuren van de melkmonsters waardoor mogelijk het verschil in afleestijd en daardoor een verschillend eindresultaat. In de werkgroep van het COM "Antibiotica/-Chemotherapeutica" is daarom besloten om in een kleinere werkgroep het probleem van de zogenaamde vals-positieve sulfa bevattende melk nader te onderzoeken.

2. Proefopzet

Om de methode uit te testen werd besloten tot enkele ringonderzoeken. Door het RIKILT werden melkmonsters gemaakt met verschillende bacteriegroeiremmende stoffen en verzonden naar de Melkcontrolestations en de Keuringsdienst van Waren.

Ringonderzoek 1

Melkpoeder werd gereconstitueerd tot melk en in deze melk werd sulfanilamidum, sulfamethazine, penicilline en oxytetracycline opgelost, gemengd en verdund tot diverse eindconcentraties. Tevens werden zogenaamde blanco monsters meegestuurd. Aan de Melkcontrolestations werd gevraagd welke monsters bevatten sulfa, penicilline of andere antibiotica na 3 uur en na 4 uur incuberen.

Ringonderzoek 2

Als ringonderzoek 1 maar nu alleen met sulfamethazine, minder concentraties penicilline en één concentratie oxytetracycline-HCl. Welke monsters bevatten sulfa, penicilline of andere antibiotica?

Ringonderzoek 3

Aantal concentraties sulfamethazine beperkt tot 4 t.w. 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml en 5 µg/ml.

Voor het bepalen van het juiste omslagpunt werd een bekende standaard van 5 µg/ml sulfamethazine meegestuurd.

Welke monsters bevatten sulfa, penicilline of andere antibiotica?

Vervolgonderzoek

Naar aanleiding van de resultaten van de drie ringonderzoeken werd overgegaan op boerderijmelk of koemelk in plaats van gereconstitueerde melk. Met name aandacht voor afleestijd.

Wordt de afleestijd beïnvloed door:

- de P(ara) A(mino) B(enzoezuur)?
- invloed van de melk op de toegevoegde standaarden?
- hoeveelheid sporen per ml voedingsbodem?

Deelnemers ringonderzoeken

Stichting Melkcontrolestation "Drenthe-Groningen", Melkcontrolestation "Oost-Nederland", Stichting Melkcontrolestation "Gorinchem", Melkcontrolestation "West-Nederland", Stichting Melkcontrolestation "Friesland", Stichting Gezondheidsdienst voor Dieren Boxtel, Keuringsdienst van Waren Utrecht en RIKILT (2x).

Deelnemers vervolgonderzoek

Melkcontrolestation "Oost-Nederland", Keuringsdienst van Waren Utrecht en RIKILT.

3. Monstermateriaal

Voor de ringonderzoeken werd steeds magere melkpoeder gereconstitueerd tot melk. De preparaten sulfamethazine, penicilline en oxytetracycline-HCl werden opgelost en deze oplossingen werden gemengd en verdund tot gewenste eindconcentraties en in buisjes verdeeld in porties van ca. 15 ml voor verzending naar de deelnemers.

Voor het vervolgonderzoek werden koemelkmonsters van de proefaccommodatie "De Ossekampen" betrokken. Daartoe werden steeds twee dagen achter elkaar 10 koeien bemonsterd.

Het eerste onderzoek werd uitgevoerd zo spoedig mogelijk na het monsternemen (in de regel de morgen na het avondmelken). Het tweede onderzoek werd steeds een dag later uitgevoerd.

Tussen het eerste onderzoek en de herhaling werden de monsters bij 0°C bewaard. De koemelkmonsters werden voor het eigenlijke onderzoek gedurende 5 min bij 80°C gepasteuriseerd. De onderzoeksmethode werd gevolgd als omschreven in "Aantonen van sulfaresiduen en andere bacteriegroeiremmende stoffen in monsters rauwe melk" van maart 1983 (zie bijlage 2), met uitzondering van 3.2 waarvoor de in de handel verkrijgbare suspensie van *Bacillus stearothermophilus* (Merck 11499) werd gebruikt.

De koemelkmonsters werden steeds op sulfaresiduen onderzocht en met dezelfde melkmonsters werden standaardreeksen gemaakt van 1 t/m 5 µg/ml sulfamethazine.

4. Methoden van onderzoek

Voor de ringonderzoeken zie bijlage 2.

Voor het vervolgonderzoek zie proefplan bijlage 1.

5. Resultaten

ringonderzoek 1 tabel 1 t/m 6

ringonderzoek 2 tabel 7 t/m 9

ringonderzoek 3 tabel 10 t/m 12

Vervolgonderzoek tabel 13 t/m 22.

6. Conclusies

6.1 Uit de resultaten van de ringonderzoeken blijkt dat de Melkcontrolestations ca. 2 µg/ml sulfamethazine kunnen aantonen.

6.2 Een aantal gereconstitueerde melkmonsters en een aantal koemelkmonsters een vals-positief resultaat geven. Dit resultaat wordt echter niet bevestigd door de dag ervoor of de dag erna uitgevoerde duplo-bepaling.

6.3 Van de 144 bepalingen geven 10 monsters sulfa-positief als eindresultaat.

6.4 Monsternamen 7 (zie tabel 21) werd ook onderzocht met de door het Melkcontrolestation Oost-Nederland voorgestelde methode, nl. na 2 uur voordiffusie bij 20°C, de op het medium gebrachte melk afgieten en daarna incuberen. Deze extra handeling gaf niet het gewenste betere resultaat.

6.5 Om de afleestijd op 3 1/2 uur te standaardiseren is het nodig dat het voedingsmedium 10^6 sporen per ml bevat.

7. Opmerkingen

Opmerkingen naar aanleiding van

7.1 Ringonderzoek 1

7.1.1 Door bijna alle deelnemers werd $> 5 \mu\text{g/ml}$ sulfamethazine aangetoond. Voor sulfanilamidum was dit $> 25 \mu\text{g/ml}$ terwijl 2 deelnemers deze concentratie geheel niet aantoonden.

7.1.2 Het andere antibioticum (oxytetracycline-HCl) werd door nagenoeg alle deelnemers als zodanig aangegeven. Deelnemer nummer 8 interpreteerde echter enkele malen sulfa-positief in plaats van ander antibioticum.

7.1.3 De bebroedingstijd van 3 uur is te kort.

7.1.4 De Keuringsdienst van Waren nam aan deze rondzending niet deel.

7.2 Ringonderzoek 2

7.2.1 Laboratorium 5:

- Onderzoek uitgevoerd met plate count agar van Oxoid i.p.v. Difco.
- In week 12 werd na 3 uur 30 min bebroeden het waterbad uitgezet en de volgende dag werden de buizen beoordeeld.
- Voerde het onderzoek in week 12 de volgende dag nogmaals uit en had na 4 uur bebroeden nagenoeg gelijke resultaten als het eerste onderzoek voor wat betreft de sulfapreparaten. De aanwezigheid van een ander antibioticum en penicilline werd echter niet meer aangetoond.
- Vindt de buismethode moeilijk afleesbaar.
- Delvotest uitgevoerd in week 12.

Alle concentraties sulfamethazine werden aangetoond m.u.v. 1 maal $1 \mu\text{g/ml}$.

- Delvotest uitgevoerd in week 13.

Alle concentraties sulfamethazine werden aangetoond m.u.v. de concentratie 1 µg/ml.

- Microtiterplaatjes week 12.

Alle concentraties sulfamethazine werden aangetoond m.u.v. de concentratie 1 µg/ml. Penicilline werd niet gevonden.

- Microtiterplaatjes week 13.

Van de concentraties sulfamethazine werd 1 µg/ml niet aangetoond en 1 maal 2 µg/ml niet aangetoond. De hoogste concentratie penicilline en het andere antibioticum werden aangetoond.

7.2.2 Laboratorium 3

- In week 12 werd iets meer *B. calidolactis* geënt.

- Onderzocht de monsters in week 12 eveneens met de disc methode volgens Kundrad. Alle concentraties sulfamethazine werden aangetoond. De laagste concentratie penicilline (0,01 IE/ml) werd niet aangetoond.

- Week 13 volgens Kundrad.

Alle concentraties sulfamethazine werden aangetoond met de opmerking "enige twijfel" bij de laagste concentraties.

7.2.3 Algemene opmerking

Van de oorspronkelijke concentratie 0,1 IE pen/ml wordt in het algemeen zeer weinig penicilline teruggevonden. Mogelijk dat de bewaaromstandigheden van de gereconstitueerde melk hiervan de oorzaak zijn.

7.3 Ringonderzoek 3

7.3.1 Laboratorium 1: heeft beide weken 1,5% geënt in plaats van 3%.

Heeft in week 20 de monsters ook onderzocht met een sporesuspensie uit Boxtel en hiervan 1% geënt. Er werden toen 2 sulfa's minder aangetoond.

7.3.2 Laboratorium 2: heeft in week 21 2% spore geënt in plaats van 3%.

7.3.3 Laboratorium 3: Onderzocht de monsters eveneens met de disc methode volgens Kundrad. In week 20 werden alle concentraties sulfamethazine aangetoond.

De laagste concentratie penicilline (0,01 IE) werd niet aangetoond. In week 21 werden alle concentraties sulfamethazine teruggevonden. De laagste concentratie penicilline werd nu ook aangetoond.

7.3.4 Laboratorium 4: In week 20 zijn de resultaten verwerkt van het heronderzoek van 19/5 omdat bij onderzoek op 18/5 na 3 uur bebroeden alle monsters, met uitzondering van 4 andere dan sulfa, negatief waren.

7.3.5 Laboratorium 5: Delvotest in week 20: Alle concentraties sulfamethazine werden aangetoond met uitzondering van 1 maal 1 µg/ml.

De laagste concentratie penicilline werd niet aangetoond.

In week 21 werden alle concentraties van de sulfamethazine en penicilline aangetoond.

Microtiterplaatjes week 20: Er wordt slechts 1 x 5 µg/ml sulfa aangetoond. Bij 4 monsters wordt penicilline en sulfa gevonden, de beide andere antibiotica worden wel aangetoond en men vindt 14x blanco.

Microtiterplaatjes week 21: 1 µg sulfa/ml wordt 1 maal niet en 1 maal samen met penicilline teruggevonden. De 2 µg/ml 2 maal wel en 2 maal samen met penicilline. De andere sulfamonsters zijn wel aangetoond evenals de 3 penicillinemonsters en beide andere antibiotica.

7.3.6 Laboratorium 8: Geeft in week 20 bij twee monsters een uitslag van +,- (dus sulfa) en vermeldt hierachter ook een uitslag van penicilline met concentratie en remzone.

7.4 Vervolgonderzoek

7.4.1 Voor het verschil in afleestijd is geen verklaring te geven. Nadat een verschil geconstateerd was is het koloniegetal van de gekochte suspensie bepaald. Resultaat $1,4 \times 10^7$ /ml in plaats van 10^8 /ml. Mogelijk dat hier toch de oorzaak zit.

7.4.2 Het kiezen van het afleesmoment is nog een punt van onderzoek. Aflezen op het moment dat een van de buizen met PAB geel is en de buis zonder PAB nog blauw of aflezen als de bekende standaardbuis (b.v. 5 µg/ml) geel en blauw is.

7.4.3 Navraag bij de bedrijfsleiding van de proefaccomodatie "de Osse-kampen" waarvan de koemelkmonsters kwamen garandeerde ons dat de koeien waarbij sulfa werd aangetoond met de gebruikte methode in de proefperiode niet met enig sulfapreparaat behandeld waren. De oorzaak van deze vals-positieve eindresultaten moeten toch in de methode gezocht worden en verder onderzoek is dus nog nodig.

Tabel 1

Resultaten na 4 uur bebroeden

Labora- torium Sulfa- methazine	1		2		3		4	
	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5
1 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
1 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2 µg/ml	neg.	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2 µg/ml	neg.	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.	neg.
3 µg/ml	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa

* Bij buismethode beide buizen +, met disc geen remming.

Tabel 1 (Vervolg)

Resultaten na 4 uur bebroeden

Labora- torium	5		6		7		8	
	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5
1 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa
1 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa
2 µg/ml	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa	sulfa
2 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg. *
3 µg/ml	neg.	sulfa	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	sulfa
3 µg/ml	neg.	sulfa	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	sulfa
5 µg/ml	sulfa	sulfa	neg.	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml	sulfa	sulfa	neg.	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa

* Bij buismethode beide buizen +, met disc geen remming.

Tabel 2

Resultaten na 4 uur bebroeden

Laboratorium	1		2		3		4	
	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5
3 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
3 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
5 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
5 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
25 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
25 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tabel 2 (Vervolg)

Resultaten na 4 uur bebroeden

Labora- torium	5		6		7		8	
	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5
3 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa*
3 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa
5 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa*
5 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa
10 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa
25 µg/ml	sulfa	sulfa	neg.	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
25 µg/ml	neg.	sulfa	neg.	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

(+PAB)

* Bij buismethode 1 buis +, 1 buis ±, met disc geen remming.

Tabel 3

Resultaten na 4 uur bebroeden

Laboratorium	1				2			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
0,005 IE/ml	0,041 pen.	15,2	0,004 pen.	14,2	0,005 pen.	16,5	0,005 pen.	16,5
0,005 IE/ml	0,0042 pen.	15,3	0,003 pen.	13,9	0,004 pen.	15	0,004 pen.	16
0,01 IE/ml	0,01 pen.	18,0	0,007 pen.	16,4	0,010 pen.	20	0,010 pen.	19
0,01 IE/ml	0,009 pen.	17,6	0,007 pen.	16,6	0,010 pen.	20	0,010 pen.	19
0,1 IE/ml	0,13 pen.	25,7	0,09 pen.	22,4	0,100 pen.	30	0,100 pen.	30
0,1 IE/ml	0,11 pen.	25,1	0,09 pen.	22,4	0,100 pen.	30	0,100 pen.	29,5

Laboratorium	3				4			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
0,005 IE/ml	0,005 pen.	14,0	0,003 pen.	15,0	0,003 pen.	15,5	0,005 pen.	15,0
0,005 IE/ml	0,004 pen.	15,0	0,002 pen.	14,0	0,006 pen.	16,5	0,005 pen.	16,0
0,01 IE/ml	0,010 pen.	19,0	0,008 pen.	20,0	0,015 pen.	19,0	0,010 pen.	20,0
0,01 IE/ml	0,008 pen.	18,5	0,017 pen.	19,0	0,010 pen.	18,0	0,015 pen.	20,5
0,1 IE/ml	0,070 pen.	29,0	0,065 pen.	29,0	0,100 pen.	25,0	0,100 pen.	30,0
0,1 IE/ml	0,060 pen.	28,5	0,080 pen.	30,0	0,090 pen.	24,0	0,100 pen.	30,0

* groeiremming
overeenkomend
met IE pen/ml

** diameter remzone
in mm

Tabel 3 (Vervolg)

Resultaten na 4 uur bebroeden

Laboratorium	5				6			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
Penicilline								
0,005 IE/ml	sulfa		0,008 aa	18,0	neg.	-	sulfa	
0,005 IE/ml	0,004 pen.	14,5	0,004 pen.	14,5	- neg.	-	0,003 pen.	14,1
0,01 IE/ml	0,010 pen.	19,0	0,004 aa	15,0	0,005 pen.	17,1	0,008 pen.	18,9
0,01 IE/ml	0,007 pen.	17,8	0,004 pen.	14,5	0,004 pen.	16,2	0,006 pen.	17,5
0,1 IE/ml	0,070 pen.	24,5	0,050 pen+aa	23,5 p.16,0	0,052 pen.	27,2	0,060 pen.	28,5
0,1 IE/ml	0,070 pen.	24,5	0,060 pen.	24,2	0,049 pen.	26,9	0,066 pen.	29,0

Laboratorium	7				8			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
Penicilline								
0,005 IE/ml	0,005 pen.	14,9	0,0039 pen.	15,2	sulfa		0,005 pen.	15,8
0,005 IE/ml	<0,005 pen.	14,2	0,004 pen.	15,4	0,006 pen.	16,5	0,005 pen.	16,2
0,01 IE/ml	0,0089 pen.	18,0	0,011 pen.	21	0,010 pen.	18,4	0,010 pen.	19,0
0,01 IE/ml	0,0125 pen.	19,6	0,010 pen.	19,7	0,010 pen.	18,5	0,011 pen.	19,4
0,1 IE/ml	0,110 pen.	30,3	>0,100 pen.	31,4	0,103 pen.	30,3	0,100 pen.	30,3
0,1 IE/ml	0,105 pen.	30,0	>0,100 pen.	31,3	0,102 pen.	30,0	0,100 pen.	30,2

* groeiremming
overeenkomend
met IE pen/ml

** diameter remzone
in mm

Tabel 4

Resultaten na 4 uur bebroeden

Laboratorium	1				2			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
OTC-HCl								
1,0 µg/ml	0,021 aa	20,1	0,011 aa	18,0	0,020 aa	22,5	0,015 aa	21
1,0 µg/ml	0,031 aa	21,3	0,013 aa	18,4	0,020 aa	22,5	0,015 aa	21
1,6 µg/ml	0,028 aa	21,0	0,015 aa	18,9	0,030 aa	23,5	0,035 aa	24,5
1,6 µg/ml	0,035 aa	21,7	0,016 aa	18,9	0,040 aa	24	0,035 aa	24
2,4 µg/ml	0,05 aa	22,7	0,030 aa	20,4	0,040 aa	24,5	0,035 aa	24,5
2,4 µg/ml	0,039 aa	21,9	0,032 aa	20,6	0,040 aa	24,5	0,040 aa	25

Laboratorium	3				4			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
OTC-HCl								
1,0 µg/ml	0,013 aa	21,0	0,018 aa	19,0	0,030 aa	20,0	0,030 aa	24,5
1,0 µg/ml	0,009 aa	19,0	0,015 aa	18,0	0,040 aa	21,0	0,030 aa	24,0
1,6 µg/ml	0,013 aa	21,0	0,025 aa	21,0	0,040 aa	22,0	0,045 aa	26,0
1,6 µg/ml	0,015 aa	22,0	0,022 aa	21,5	0,050 aa	21,0	0,045 aa	26,0
2,4 µg/ml	0,016 aa	22,0	0,025 aa	21,0	0,045 aa	22,0	0,050 aa	27,0
2,4 µg/ml	0,018 aa	23,5	0,030 aa	22,5	0,060 aa	23,0	0,060 aa	28,0

* groeiremming
overeenkomend
met IE pen/ml

** diameter remzone
in mm

Tabel 4 (Vervolg)

Resultaten na 4 uur bebroeden

Laboratorium	5				6			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
OTC-HCl								
1,0 µg/ml	0,009 aa	18,5	0,007 aa	17,5	0,011 aa	20,1	0,008 aa	18,6
1,0 µg/ml	0,006 aa	17,0	0,007 aa	17,5	0,006 aa	18,1	0,009 aa	19,5
1,6 µg/ml	0,010 aa	19,2	0,004 aa	15,0	0,020 aa	23,0	0,012 aa	20,5
1,6 µg/ml	0,015 aa	20,5	-***	-	0,009 aa	19,4	0,010 aa	20,0
2,4 µg/ml	0,007 aa	17,8	0,007 aa	17,0	0,016 aa	21,2	0,013 pen.	20,9
2,4 µg/ml	0,020 aa	22,0	0,012 aa	19,5	0,014 aa	21,5	0,016 aa	21,9

Laboratorium	7				8			
	week 4		week 5		week 4		week 5	
	*	**	*	**	*	**	*	**
OTC-HCl								
1,0 µg/ml	0,013 aa	19,8	0,018 aa	22,3	0,011 aa	20,7	0,010 aa	19,1
1,0 µg/ml	0,012 aa	19,6	0,015 aa	21,6	-	-	0,013 aa	20,3
1,6 µg/ml	0,022 aa	22,4	0,026 aa	24,1	0,013 aa	22,7		sulfa
1,6 µg/ml	0,015 aa	20,5	0,027 aa	24,2				sulfa
2,4 µg/ml	0,022 aa	22,5	0,031 aa	24,9	0,013 aa	22,8	0,018 aa	21,9
2,4 µg/ml	0,020 aa	22,0	0,030 aa	24,7			0,023 aa	23,0

* groeiremming
overeenkomend
met IE pen/ml

** diameter remzone
in mm

*** Bij buismethode beide buizen +, met disc geen remming.

Tabel 5

Resultaten na 3 uur bebroeden

Labora- torium Sulfa- methazine	1		2		3		4	
	week 4	week 5	week 4	week 5*	week 4	week 5	week 4	week 5
1 µg/ml				neg.				sulfa
1 µg/ml				neg.				sulfa
2 µg/ml				sulfa				sulfa
2 µg/ml				neg.				sulfa
3 µg/ml				sulfa				sulfa
3 µg/ml				sulfa				sulfa
5 µg/ml				sulfa				sulfa
5 µg/ml				sulfa				sulfa
10 µg/ml				sulfa				sulfa
10 µg/ml				sulfa				sulfa

* Resultaat na 3¹/₂ uur bebroeden.

Tabel 5 (Vervolg)

Resultaten na 3 uur bebroeden

Labora- torium	5		6		7		8	
	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5
1 µg/ml	neg.	sulfa						
1 µg/ml	neg.	sulfa						
2 µg/ml	sulfa	sulfa						
2 µg/ml	neg.	sulfa						
3 µg/ml	sulfa	sulfa						
3 µg/ml	sulfa	sulfa						
5 µg/ml	sulfa	sulfa						
5 µg/ml	sulfa	sulfa						
10 µg/ml	sulfa	sulfa						
10 µg/ml	sulfa	sulfa						

In week 4 kon van de laboratoria 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8 na 3 uur bebroeden geen uitslag worden gegeven.

In week 5 kon van de laboratoria 1, 3, 6, 7 en 8 na 3 uur bebroeden geen uitslag worden gegeven.

Tabel 6

Resultaten na 3 uur bebroeden

Labora- torium	1		2		3		4	
	week 4	week 5	week 4	week 5*	week 4	week 5	week 4	week 5
3 µg/ml				neg.				neg.
3 µg/ml				neg.				neg.
5 µg/ml				neg.				t.w.
5 µg/ml				neg.				sulfa
10 µg/ml				neg.				sulfa
10 µg/ml				neg.				sulfa
25 µg/ml				sulfa				sulfa
25 µg/ml				sulfa				sulfa
blanco				neg.				neg.
blanco				neg.				sulfa

* Resultaat na 3¹/₂ uur bebroeden.

Tabel 6 (Vervolg)

Resultaten na 3 uur bebroeden

Labora- torium	5		6		7		8	
	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5	week 4	week 5
3 µg/ml	neg.	sulfa						
3 µg/ml	neg.	sulfa						
5 µg/ml	neg.	sulfa						
5 µg/ml	neg.	sulfa						
10 µg/ml	sulfa	sulfa						
10 µg/ml	sulfa	sulfa						
25 µg/ml	sulfa	sulfa						
25 µg/ml	sulfa	sulfa						
blanco	neg.	sulfa						
blanco	neg.	neg.						

In week 4 kon van de laboratoria 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8 na 3 uur bebroeden geen uitslag worden gegeven.

In week 5 kon van de laboratoria 1, 3, 6, 7 en 8 na 3 uur bebroeden geen uitslag worden gegeven.

Tabel 7

Laboratorium	1		2		3		4		5	
	week 12	week 13	week 12	week 13	week 12	week 13	week 12	week 13	week 12	week 13
tijd	4 uur	3 uur 30 min	3 uur 15 min	3 uur 45 min	2 uur 30 min	3 uur 45 min	4 uur	?	3 uur 30 min	4 uur 20 min
1 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.	neg.	sulfa
1 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.	neg.	sulfa
2 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa	sulfa
2 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.	sulfa	sulfa
3 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa	sulfa
3 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa	sulfa
4 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
4 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml bekende hoeveelh.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
6 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
6 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
8 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
8 µg/ml	sulfa	sulfa	neg.*	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa

* Bij buismethode beide buizen + (of †), met disc geen remming.

Tabel 8

Laboratorium	6		7		8		9	
	week 12	week 13	week 12	week 13	week 12	week 13	week 12	week 13
tijd	4 uur 15 min	4 uur	?	?	4 uur 10 min	3 uur 30 min	4 uur	4 uur
1 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa	sulfa	neg.	neg.
1 µg/ml	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa	sulfa	neg.	neg.
2 µg/ml	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
2 µg/ml	neg.	sulfa	neg.	neg.	sulfa	sulfa	neg.	neg.
3 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
3 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
4 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
4 µg/ml	neg.	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml bekende hoeveelh.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
6 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
6 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
8 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
8 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
10 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa

Tabel 9

Laboratorium	1				2				3			
	week 12		week 13		week 12		week 13		week 12		week 13	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
0,01 IE pen/ml	neg.		neg.		sulfa		***		***		***	
0,1 IE pen/ml	0,032 pen.	24,5	0,040 pen.	26	0,020 pen.	21,2	0,022 pen.	21,4	0,014 pen.	18,5	0,017 pen.	21,3
1 µg/ml OTC	0,015 aa	21,0	0,015 aa	22	0,008 aa	17,1	0,009 aa	17,4	0,006 aa	14,8	0,007 aa	18,1
Blanco	neg.		neg.		neg.		neg.		sulfa		sulfa	

Laboratorium	4				5				6			
	week 12		week 13		week 12		week 13		week 12		week 13	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
0,01 IE pen/ml	neg.		neg.		neg.		neg.		neg.		neg.	
0,1 IE pen/ml	0,025 pen.	23,0	0,030 pen.	22,0	0,005 pen.	-	0,008 pen.	18	0,02 pen.	25	0,030 pen.	25,0
1 µg/ml OTC	0,030 aa	23,5	0,013 aa	17,0	aa		0,007 aa	17	0,02 aa	25	0,025 aa	24,5
Blanco	neg.		neg.		neg.		neg.		neg.		neg.	

Laboratorium	7				8				9			
	week 12		week 13		week 12		week 13		week 12		week 13	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
0,01 IE pen/ml	neg.		neg.		***		neg.		neg.		neg.	
0,1 IE pen/ml	0,035 pen.	25,1	pen.		0,033 pen.	21,8	0,048 pen.	21,9	0,018 pen.	20,5	0,015 pen.	20,0
1 µg/ml OTC	0,016 aa	21,5	aa		0,018 aa	20,0	0,022 aa	19,9	0,005 aa	16,5	0,005 aa	16,5
Blanco	neg.		neg.		neg.		neg.		neg.		neg.	

* groeiroming overeenkomend met IE pen/ml

** diameter remzone in mm

*** bij buismethode beide buizen + (of ±), met disc geen reming

Tabel 10

Laboratorium Sulfamethazine	1		2		3		4		5	
	week 20	week 21	week 20	week 21	week 20	week 21	week 20	week 21	week 20	week 21
tijd	3 uur 30 min	3 uur 30 min	2 uur 30 min	2 uur 45 min	2 uur 40 min	2 uur 15 min	2 uur 30 min	2 uur 30 min	4 uur	3 uur 15 min
1 µg/ml	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa	neg.
1 µg/ml	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	neg.
2 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
2 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
2 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
2 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
3 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
3 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
3 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
5 µg/ml bekende hoeveelh.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa
Blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.	neg.
Blanco	neg.	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tabel 11

Laboratorium	6		7		8		9	
Sulfamethazine	week 20	week 21	week 20	week 21	week 20	week 21	week 20	week 21
tijd	2 uur 30 min	2 uur 30 min	?	?	2 uur 45 min	2 uur 45-60	3 uur	3 uur 30 min
1 µg/ml	sulfa	neg.	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	neg.	neg.
1 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.
2 µg/ml	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	neg.	neg.
2 µg/ml	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
2 µg/ml	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	sulfa	neg.	neg.
2 µg/ml	neg.	neg.	sulfa	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.
3 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
3 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
3 µg/ml	neg.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
5 µg/ml	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
5 µg/ml bekende hoeveelh.	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	sulfa	neg.	neg.
Blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.
Blanco	neg.	neg.	neg.	neg.	sulfa	neg.	neg.	neg.

Tabel 12

Laboratorium	1				2				3			
	week 20		week 21		week 20		week 21		week 20		week 21	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
0,01 IE pen/ml	neg.		0,01 pen.	20,5	neg.		0,010 pen.	16,8	neg.		0,007 pen.	19,6
0,1 IE pen/ml	0,01 pen.	20	0,1 pen.	28,5	1)		0,100 pen.	28,2	1)		0,076 pen.	29,3
0,1 IE pen/ml	0,01 pen.	20,5	0,1 pen.	28,5	1)		0,095 pen.	27,8	1)		0,077 pen.	29,4
1 µg/ml OTC-HCl	0,01 aa	20	0,01 aa	20,5	0,017 aa	20,5	0,027 aa	21,6	0,006 aa	22	0,013 aa	22,0
1 µg/ml OTC-HCl	0,01 aa	20	0,01 aa	21	0,018 aa	20,6	0,027 aa	21,5	0,006 aa	23	0,014 aa	22,3

Laboratorium	4				5				6			
	week 20		week 21		week 20		week 21		week 20		week 21	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
0,01 IE pen/ml	neg.		0,010 pen.	19,0	neg.		0,003 pen.	16	neg.		0,01 pen.	20,0
0,1 IE pen/ml	neg.2)		0,100 pen.	29,0	1)		0,03 pen.	27	2)		0,07 pen.	27,5
0,1 IE pen/ml	neg.2)		0,100 pen.	29,0	1)		0,03 pen.	26	2)		0,08 pen.	28,5
1 µg/ml OTC-HCl	0,020 aa	23,0	0,020 aa	21,0	0,004 aa	19	0,003 aa	17	0,05 aa	24,0	0,03 aa	23,5
1 µg/ml OTC-HCl	0,020 aa	23,0	0,020 aa	21,0	0,004 aa	19	0,003 aa	17	0,05 aa	24,0	0,03 aa	23,5

Laboratorium	7				8				9			
	week 20		week 21		week 20		week 21		week 20		week 21	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
0,01 IE pen/ml	neg.		0,086 pen	18,0	sulfa		0,015 pen.	17,8	neg.		0,008 pen+aa	17,5 14,5+ pase
0,1 IE pen/ml	0,004 pen.	15,0	0,1 pen	29,0	0,01 sulfa+ pen	17,1	0,13 pen	24,2	0,007 pen	17,0	0,045 pen	23,0
0,1 IE pen/ml	1)		0,1 pen	29,0	0,075 sulfa+ pen.	16,3	0,13 pen.	24,2	0,003 pen.	15,0	0,060 pen.	24,0
1 µg/ml OTC-HCl	0,028 aa	23,9	aa		0,0265 aa	20,0	0,027 aa	19,5	0,01 aa	19,0	0,004 aa	16,0
1 µg/ml OTC-HCl	0,022 aa	22,8	aa		0,0265 aa	20,0	0,027 aa	19,5	0,007 aa	17,0	0,004 aa	16,0

* groeiremming overeenkomend met IE pen/ml

** diameter remzone in mm

1) bij buismethode beide buizen +, met disc geen remming

2) op 18/5 waren de monsters (+,+) op 19/5 (-,-)

Tabel 13

Monstername 1 dd.: 1983-09-05

1e Onderzoek op : 1983-09-06

2e Onderzoek op : 1983-09-07

Afleestijd 0 1e onderzoek 3 uur, 15 minuten

Afleestijd 0 2e onderzoek 3 uur, 30 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	1	0	negatief	2	2	negatief
7	0	0	negatief	0	0	negatief
1015	0	0	negatief	2	2	negatief
1076	2	2	negatief	2	2	negatief
1118	0	0	negatief	0	0	negatief
1081	0	0	negatief	1	0	negatief
2012	0	0	negatief	0	0	negatief
1122	0	0	negatief	0	0	negatief
2223	0	0	negatief	0	0	negatief
247	1	1	negatief	0	1	?

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	1	2	0	sulfa	2	1	negatief
140	2	3	0	sulfa	2	0	sulfa
140	5	7	0	sulfa	6	1	sulfa
1076	1	2	0	sulfa	2	1	negatief
1076	2	3	0	sulfa	3	0	sulfa
1076	5	7	0	sulfa	6	0	sulfa
1122	1	1	0	negatief	1	0	negatief
1122	2	2	0	sulfa	2	0	sulfa
1122	5	4	0	sulfa	6	0	sulfa

Tabel 14

Monstername 2 dd.: 1983-09-06

1e Onderzoek op : 1983-09-07

2e Onderzoek op : 1983-09-08

Afleestijd 0 1e onderzoek 3 uur, 30 minuten

Afleestijd 0 2e onderzoek 3 uur, 30 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	-	-	-	-	-	-
7	0	0	negatief	0	0	negatief
1015	1	1	negatief	0	0	negatief
1076	1	1	negatief	1	1	negatief
1118	1	1	negatief	0	0	negatief
1081	0	0	negatief	0	0	negatief
2012	1	1	negatief	0	0	negatief
1122	1	1	negatief	0	0	negatief
2223	1	1	negatief	0	0	negatief
247	1	1	negatief	0	0	negatief

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
7	1	1	0	negatief	1	0	negatief
7	2	1	0	negatief	1	0	negatief
7	5	6	0	sulfa	4	0	sulfa
1076	1	3	1	sulfa	1	0	negatief
1076	2	2	1	negatief	2	0	sulfa
1076	5	6	1	sulfa	5	0	sulfa
1122	1	2	1	negatief	1	0	negatief
1122	2	2	1	negatief	1	0	negatief
1122	5	6	0	sulfa	5	0	sulfa

Tabel 15

Monstername 3 dd.: 1983-09-19

1e Onderzoek op : 1983-09-20

2e Onderzoek op : 1983-09-21

Afleestijd 0 1e onderzoek 3 uur, 30 minuten

Afleestijd 0 2e onderzoek 3 uur, 30 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	0	0	negatief	1	0	negatief
7	-	-	-	-	-	-
1015	0	0	negatief	1	0	negatief
1076	0	0	negatief	1	0	negatief
1118	0	0	negatief	1	0	negatief
1081	0	0	negatief	1	0	negatief
2012	0	0	negatief	1	0	negatief
1122	0	0	negatief	1	0	negatief
2223	-	-	-	-	-	-
247	0	0	negatief	1	0	negatief

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	1	1	0	negatief	1	0	negatief
140	2	1	0	negatief	2	0	sulfa
140	5	5	0	sulfa	4	0	sulfa
1076	1	1	0	negatief	1	0	negatief
1076	2	2	0	sulfa	2	0	sulfa
1076	5	5	1	sulfa	4	0	sulfa
1122	1	0	0	negatief	1	0	negatief
1122	2	1	0	negatief	2	0	sulfa
1122	5	5	1	sulfa	4	0	sulfa

Tabel 16

Monstername 4 dd.: 1983-09-20

1e Onderzoek op : 1983-09-21

2e Onderzoek op : 1983-09-22

Afleestijd 0 1e onderzoek 3 uur, 30 minuten

Afleestijd 0 2e onderzoek 3 uur, 30 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	1	0	negatief	0	0	negatief
7	1	0	negatief	0	0	negatief
1015	1	0	negatief	0	0	negatief
1076	1	0	negatief	0	0	negatief
1118	1	0	negatief	0	0	negatief
1081	1	0	negatief	0	0	negatief
2012	1	0	negatief	0	0	negatief
1122	1	0	negatief	0	0	negatief
2223	1	0	negatief	0	0	negatief
247	1	0	negatief	0	0	negatief

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	1	1	0	negatief	0	0	negatief
140	2	3	0	sulfa	1	0	negatief
140	5	5	0	sulfa	5	0	sulfa
1076	1	1	0	negatief	1	0	negatief
1076	2	3	0	sulfa	3	0	sulfa
1076	5	5	0	sulfa	5	0	sulfa
1122	1	1	0	negatief	1	0	negatief
1122	2	3	0	sulfa	3	0	sulfa
1122	5	5	0	sulfa	5	0	sulfa

Tabel 17

Monstername 5 dd.: 1983-10-03

1e Onderzoek op : 1983-10-04

2e Onderzoek op : 1983-10-05

Afleestijd 0 1e onderzoek 4 uur, 15 minuten

Afleestijd 0 2e onderzoek 4 uur, 15 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	-	-	-	-	-	-
7	1	0	negatief	1	0	negatief
1015	1	0	negatief	1	0	negatief
1076	1	0	negatief	2	0	sulfa
1118	1	0	negatief	2	0	sulfa
1081	1	0	negatief	1	0	negatief
2012	-	-	-	-	-	-
1122	1	1	negatief	1	0	negatief
2223	1	0	negatief	1	0	negatief
247	1	1	negatief	2	0	sulfa

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
7	1	1	0	negatief	1	0	negatief
7	2	2	0	sulfa	3	0	sulfa
7	5	> 3	0	sulfa	6	0	sulfa
1076	1	1	0	negatief	1	0	negatief
1076	2	1	0	negatief	2	0	sulfa
1076	5	> 3	0	sulfa	3	0	sulfa
1122	1	1	0	negatief	3	0	sulfa
1122	2	3	0	sulfa	3	0	sulfa
1122	5	> 3	0	sulfa	6	0	sulfa
	5	> 3	0	sulfa	6	0	sulfa
	5	> 3	0	sulfa	6	0	sulfa

Tabel 18

Monstername 6 dd.: 1983-10-04

1e Onderzoek op : 1983-10-05

2e Onderzoek op : 1983-10-06

Afleestijd 0 1e onderzoek 4 uur, 15 minuten

Afleestijd 0 2e onderzoek 4 uur, 30 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	-	-	-	-	-	-
7	2	0	sulfa	1	0	negatief
1015	2	0	sulfa	1	0	negatief
1076	2	0	sulfa	1	0	negatief
1118	2	0	sulfa	1	0	negatief
1081	1	0	negatief	1	0	negatief
2012	1	0	negatief	1	0	negatief
1122	1	0	negatief	1	0	negatief
2223	1	0	negatief	1	0	negatief
247	1	0	negatief	1	0	negatief

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
7	1	2	0	sulfa	2	0	sulfa
7	2	3	0	sulfa	4	0	sulfa
7	5	6	0	sulfa	> 4	0	sulfa
1076	1	2	0	sulfa	2	0	sulfa
1076	2	3	0	sulfa	4	0	sulfa
1076	5	6	0	sulfa	> 4	0	sulfa
1122	1	3	0	sulfa	2	0	sulfa
1122	2	3	0	sulfa	4	0	sulfa
1122	5	6	0	sulfa	> 4	0	sulfa
	5	6	0	sulfa	> 4	0	sulfa
	5	8	0	sulfa	> 4	0	sulfa

Tabel 19

Monstername 7 dd.: 1983-10-10

1e Onderzoek op : 1983-10-11

2e Onderzoek op : 1983-10-12

Afleestijd 0 1e onderzoek 4 uur, 30 minuten

Afleestijd 0 2e onderzoek 4 uur, 30 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	-	-	-	-	-	-
7	0	0	negatief	0	0	negatief
1015	0	0	negatief	≥ 2	0	sulfa
1076	2	1	negatief	≥ 2	≥ 2	aa of neg.
1118	0	0	negatief	0	0	negatief
1081	2	1	negatief	≥ 2	0	sulfa
2012	2	2	negatief	0	0	negatief
1122	1	0	negatief	0	0	negatief
2223	1	0	negatief	0	0	negatief
247	1	0	negatief	0	0	negatief

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
7	1	3	1	sulfa	≥ 2	0	sulfa
7	2	3	1	sulfa	≥ 2	0	sulfa
7	5	> 6	1	sulfa	≥ 2	0	sulfa
1076	1	3	1	sulfa	≥ 2	0	sulfa
1076	2	4	1	sulfa	≥ 2	0	sulfa
1076	5	> 6	1	sulfa	≥ 2	0	sulfa
1122	1	0	0	negatief	≥ 2	0	sulfa
1122	2	3	0	sulfa	≥ 2	0	sulfa
1122	5	> 6	0	sulfa	≥ 2	0	sulfa
	5	> 6	0	sulfa	≥ 2	0	sulfa
	5	-	-	-	≥ 2	0	sulfa

Tabel 20

Monstername 8 dd.: 1983-10-11
 1e Onderzoek op : 1983-10-12
 2e Onderzoek op : 1983-10-13
 Afleestijd 0 1e onderzoek 4 uur, 30 minuten
 Afleestijd 0 2e onderzoek 4 uur, 30 minuten

Koe nr.	1e onderzoek			2e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
140	-	-	-	-	-	-
7	0	0	negatief	1	0	negatief
1015	0	0	negatief	1	0	negatief
1076	2	0	sulfa	1	0	negatief
1118	0	0	negatief	1	0	negatief
1081	2	2	negatief	1	0	negatief
2012	2	2	negatief	1	0	negatief
1122	0	0	negatief	1	0	negatief
2223	0	0	negatief	1	0	negatief
247	0	0	negatief	1	0	negatief

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek			2e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat	-PAB	+PAB	resultaat
7	1	≥ 2	0	sulfa	1	0	negatief
7	2	≥ 2	0	sulfa	2	0	sulfa
7	5	≥ 2	0	sulfa	≥ 5	0	sulfa
1076	1	≥ 2	0	sulfa	2	0	sulfa
1076	2	≥ 2	0	sulfa	3	0	sulfa
1076	5	≥ 2	0	sulfa	≥ 5	0	sulfa
1122	1	≥ 2	0	sulfa	1	0	negatief
1122	2	≥ 2	0	sulfa	2	0	sulfa
1122	5	≥ 2	0	sulfa	≥ 5	0	sulfa
	5	≥ 2	0	sulfa	≥ 5	0	sulfa
	5	≥ 2	0	sulfa	≥ 5	0	sulfa

Tabel 21

Monstername 7 dd.: 1983-10-10

1e Onderzoek op : 1983-10-11

Afleestijd 0 1e onderzoek 4 uur, 15 minuten

Monsters na 2 uur voordiffussie en afgieten van de melk onderzocht.

Koe nr.	1e onderzoek		
	-PAB	+PAB	resultaat
140	-	-	-
7	0	0	negatief
1015	0	0	negatief
1076	2	3	?
1118	0	0	negatief
1081	1	1	negatief
2012	1	3	?
1122	1	1	negatief
2223	1	1	negatief
247	0	1	?

koe nr.	conc. µg/ml	1e onderzoek		
		-PAB	+PAB	resultaat
7	1	1	0	negatief
7	2	1	0	negatief
7	5	3	0	sulfa
1076	1	2	0	sulfa
1076	2	2	0	sulfa
1076	5	> 3	0	sulfa
1122	1	0	0	negatief
1122	2	3	0	sulfa
1122	5	> 3	0	sulfa
	5	3	0	sulfa
	5	-	-	-

Tabel 22

Overzicht van de eindresultaten van de onderzochte koemelkmonsters.

koe- nr.	aantal bemon- sterd	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		totaal sulfa +		totaal
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
140	3	-	-	*	*	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	0	0	0
7	7	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1	0	1
1015	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	1	1	2
1076	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	2	1	3
1118	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	1	1	2
1081	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0	1	1
2012	7	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	0	0	0
1122	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
2223	7	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
247	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0	1	1

- Totaal 144 bepalingen waarvan 10 sulfa "positief" als eindresultaat.
- Alle monsters zijn 5 minuten 80° gepasteuriseerd.
- Bepaling A uitgevoerd op dag van monster ontvangst.
- Bepaling B uitgevoerd na 1 nacht bewaren bij 0°C.

* geen monstermateriaal beschikbaar.

Proefplan ten bate van het vooronderzoek naar een methode om sulfa-
residuen in rauwe melk aan te tonen

Opgesteld door : Dr.Ir. T.E. Galesloot

De omstandigheden zijn :

- Verschillende monsters melk verzuren niet even snel. Verschillen tot 15 minuten zijn vastgesteld.
- Als verzuring begint is in de regel de zaak na een kwartier voor elkaar.
- Vaste afleestijd voor de proef is moeilijk te realiseren, zowel door variaties van sporensuspensies, als door die van de melk.
- Ondanks de toevoeging van trimethoprim is het effect van de sulfaresiduen niet groot. Bij lage concentraties zijn slechts vertragingen in het verzuren van 15 tot 30 minuten te verwachten.
- Toevoeging van PAB geeft buizen die sneller verkleuren en daardoor kans op vals positieve resultaten. Dit kan komen door de pH van de PAB oplossing (en dan is het effect te verhelpen) of door groei-beïnvloeding.

Proefplan

Deel A : Neem x monsters boerderijmelk.

Neem x buizen met geënte agar (met TMP en B. calidolactis, buizen nr. 4.5.2. volgens voorschrift van maart 1983)

De buizen zijn zo geënt met (sporen van) B. calidolactis dat na 3 tot 3½ uur bij 64°C de indicator geel is geworden.

Neem x buizen met geënte agar waaraan naast TMP en B. calidolactis ook PAB is toegevoegd. (Buizen 4.5.3. volgens voorschrift van maart 1983)

Voeg van elke melk 0,3 ml. toe aan buis 4.5.2. en 0,3 ml. aan buis 4.5.3. en plaats deze buizen in het waterbad.

Buizen goed in de gaten houden om te zien wanneer verkleuring (= geel geworden zijn) optreedt in de serie buizen volgens 4.5.3. (dus met PAB erbij).

Als een of meer buizen in deze reeks geel is geworden start de afleesprocedure. Dit is dan tijd = 0.

Na elk kwartier nagaan welke buizen geel zijn geworden.

Verkleuringstijd noteren in eenheden van 15 minuten. Doorgaan tot alles geel is of tot $1\frac{1}{2}$ uur na tijd = 0.

Wanneer buizen volgens 4.5.2. meer dan 15 minuten achterlopen op de buis volgens 4.5.3. (en dat gerekend afzonderlijk per monster) zijn sulfa-residuen aanwezig (voorlopige conclusie)

Deel B : Neem een paar monsters boerderijmelk (aantal y).

Geef deze sulfa-residuen van 1,2 en 5 μg sulfamethazine (ml).

Voer proef onder deel A uit met deze monsters melk. Aantal 3 y.

Deel C : Notering uitkomsten.

Deze zouden bijvoorbeeld als volgt kunnen worden genoteerd.

Verkleuringstijd. Tijd tot geel geworden zijn, te rekenen vanaf tijd = 0 in eenheden van 15 minuten.

Tijd = 0 tijdstip waarop in de reeks met PAB een of meer buizen geel zijn geworden.

Nr. melk	Verkleuringstijd	
	Melk (buizen 4.5.2.)	Melk + PAB (buizen 4.5.3.)
1	0	0
2	1	1
3	1	0
4	2 *	0
5	2	1
6	1	0
7	3 *	1
8	0	0
9	2 *	0
10	1	0

*) sulfa-residuen (voorlopige conclusie)

AANTONEN VAN SULFARESIDUEN EN ANDERE BACTERIEGROEIREMMENDE STOFFEN IN
MONSTERS RAUWE MELK (t.b.v. het vóóronderzoek geïntegreerde methode
antibiotica/chemotherapeuticabepaling COM)

1. Doel en toepassingsgebied.

Deze methode dient als screeningsmethode voor het aantonen van sulfare-
siduen (tot ± 2 mg/kg) en andere bacteriegroeiremmende stoffen in
rauwe melk m.b.v. *B-calidolactis*.

2. Principe.

Het monster wordt in buizen, gevuld met 1 ml medium, gepipetteerd en
gedurende enkele uren bebroed in een waterbad. Het al of niet omslaan
van de, in het medium aanwezige, indicator wijst op sulfaresiduen of
andere bacteriegroeiremmende stoffen in de melk. Ter bevestiging van
sulfaresiduen wordt de proef nogmaals uitgevoerd maar dan na toevoegen
van het sulfapreparaten inactiverende Para-amino-benzoëzuur.

3. Verre-organisme.

3.1 *E. steatothermophilus* var. *calidolactis*.

3.2 Sporesuspensie (bijgevoegd code Ri-1).

4. Voedingsbodem * en reagentia.

() 4.1 Sapenstelling

Trypton	5,0 g
Gistextract	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0 g
Water	1000 ml.

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

Gebruik voor het in het COM schrijven dd. 1982-12-28 bedoeld onderzoek
uitsluitend Plate Count Agar van Difco.

4.2 Trimethoprimoplossing (TMP)

Trimethoprim 5,0 mg
Water 100 ml

(bijgevoegd code Ri-2).

4.3 Broomkresolpurperoplossing

Broomkresolpurper 250 mg
Water 100 ml

(bijgevoegd code Ri-3).

4.4 Para-amino-benzoëzuuroplossing (P.A.B.)

Para-amino-benzoëzuur 1000 mg
Water 200 ml

(bijgevoegd code Ri-4)

4.5 Bereiding

4.5.1 Los de ingrediënten (4.1) onder verwarming in het water op, stel de pH zodanig in dat deze $7,0 \pm 0,2$ bedraagt bij 25°C.

4.5.2 Voeg per 100 ml voedingsbodem (4.5.1) 0,5 ml broomkresolpurper (4.3) toe en steriliseer 15 min. bij 121°C.

Voeg na sterilisatie aseptisch toe (bij $\pm 55^\circ\text{C}$) 0,2 ml TMP (4.2) en 2 ml *E. calidolactis* sporesuspensie (3.2). Vul af in steriele buizen (5.2) à 1 ml per buis en laat stollen. Bereid de buizen steeds vers.

4.5.3 Voeg aan 100 ml voedingsbodem (4.5.2), voor het afvullen in buizen, 2 ml P.A.B. (4.4) aseptisch toe.

Vul af in steriele buizen (5.2) à 1 ml per buis en laat stollen.

Bereid de buizen steeds vers.

5. Apparatuur en glaswerk.

5.1 Circulerend waterbad van $64^\circ\text{C} \pm 1^\circ$.

5.2 Steriele buizen 16 x 80 mm.

5.3 Laboratoriumglaswerk, indien nodig steriel.

6. Werkwijze.

Voeg van elk te onderzoeken melkmonster 0,3 ml toe aan buis 4.5.2 en buis 4.5.3 en bebroed gedurende 3,5 uur in een circulerend waterbad van 64°C (5.1).

7. Beoordeling en resultaat

Beoordeel de buizen zodra de kleur van de voedingsbodem, in de buis met P.A.B., van het monster met 5 ug/ml sulfamethazine, geel is. Is de kleur van het medium (4.5.2) omgeslagen van purper naar geel, dan is in het monster een voor deze bacteriestam groeiremmende stof afwezig. Is de kleur van het medium (4.5.2) onveranderd, purper, dan is in het monster een voor deze bacteriestam groeiremmende stof aanwezig. Indien de overeenkomstige buizen met het medium en P.A.B. (4.5.3) na bebroeden geel zijn is dit een bevestiging dat de bacteriegroeiremmende werking afkomstig is van een sulfapreparaat. Indien de overeenkomstige buizen met het medium en P.A.B. (4.5.3) na bebroeden purper zijn is dit een bevestiging dat de bacteriegroeiremmende werking afkomstig is van een ander preparaat (b.v. OTC) dan van een sulfapreparaat.

8. Opgave eindresultaat.

Geef per onderzocht monster in bijgevoegde tabel op

+ als kleur van de indicator purper blijft

- als kleur van de indicator geel is geworden

± als de kleur van de indicator niet geel is maar ook niet duidelijk purper meer is.

Indien de remmende stof niet geïnactiveerd wordt door para-amino-benzoëzuur moet rekening gehouden worden met de aanwezigheid van een andere bacteriegroeiremmende stof. Bepaal dan op de wijze zoals gebruikelijk bij de maandelijkse penicilline rondzending met hoeveel IE Penicilline het groeiremmend vermogen van dit antibioticum overeenstemt en geef de diameter van de remming als zodanig op. Geef op de bijlage eveneens aan of het penicilline of een ander antibioticum betreft.