



Omzendbrief m.b.t. sneltesten en microbiologische inhibitortesten voor de detectie van remstoffen in rauwe melk te gebruiken in het kader van autocontrole

Referentie	PCCB/S3/JWS/96718	Datum	04/05/2018
Huidige versie	2.4	Van toepassing vanaf	Datum van publicatie
Trefwoorden	Rauwe melk, remstoffen, sneltest, microbiologische inhibitortest		

Opgesteld door	Goedgekeurd door
Wits Julie, attaché	Vicky Lefevre, directeur-generaal

1. Doel

Deze omzendbrief heeft als doel de operatoren te informeren over de testen die in het kader van autocontrole gebruikt kunnen worden om remstoffen in rauwe melk te detecteren.

2. Toepassingsgebied

Ingangscntrole op de aanwezigheid van remstoffen in rauwe melk door de kopers in het kader van hun autocontrole.

Het betreft hier niet de analyses in het kader van de officiële controles zoals beschreven in de omzendbrief PCCB/S3/JWS/1352818 m.b.t. de controle op de kwaliteit van de rauwe melk.

3. Referenties

3.1. Wetgeving

Verordening (EG) nr. 853/2004 van het Europees Parlement en de Raad van 29/04/2004 houdende vaststelling van specifieke hygiënevoorschriften voor levensmiddelen van dierlijke oorsprong;

Verordening (EG) nr. 1069/2009 van het Europees Parlement en de Raad van 21/10/2009 tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften inzake niet voor menselijke consumptie bestemde dierlijke bijproducten en afgeleide producten en tot intrekking van Verordening (EG) nr. 1774/2002 (verordening dierlijke bijproducten);

Koninklijk besluit van 14 november 2003 betreffende autocontrole, meldingsplicht en traceerbaarheid in de voedselketen;

Ministerieel besluit van 22 januari 2004 betreffende de modaliteiten voor de meldingsplicht in de voedselketen.

3.2. Andere

Autocontroleplannen van de zuivelindustrie.

Autocontroleplannen voor de productie en verkoop van zuivelproducten op landbouwbedrijf.

Plannen autocontrole voor de sector van de biscuit-, chocolade-, praline-, suikergoed en ontbijtgranenindustrie.

Plannen voor de autocontrole in de brood- en banketbakkerij.

4. Definities en afkortingen

RMO: Rijdende Melk Ontvangst.

Remstoffen: stoffen die de groei van bacteriën remmen.

Rauwe melk: de melk afgescheiden door de melkklier van één of meer melkproducerende dieren, die niet is verhit tot meer dan 40 °C en evenmin een behandeling met een gelijkwaardig effect heeft ondergaan.

5. Onderzoek naar remstoffen

Rauwe melk moet onderworpen worden aan bemonstering voor de controle op de aanwezigheid van remstoffen (ingangscntrole).

Een lijst van sneltesten die voor dit doel ingezet kunnen worden, alsook de voorwaarden voor de erkenning van een test worden vermeld op bijlagen 1 en 3. De gebruiksvoorwaarden van iedere test (temperatuur en incubatietijd, cut-off reader,...) worden vermeld in de lijst.

In het geval dat bij de controle van RMO-melk met een sneltest een niet-conform resultaat wordt bekomen, dan mag de betreffende RMO-melk onderzocht worden met een microbiologische inhibitortest alvorens men de beslissing neemt over het al dan niet aanvaarden van de RMO-lading voor verwerking tot zuivelproducten voor menselijke consumptie. Deze extra analyse is niet verplicht maar laat toe om de te hoge gevoeligheid van de sneltest te corrigeren.

Een lijst van microbiologische inhibitortesten die voor dit doel ingezet kunnen worden, alsook de voorwaarden voor de erkenning van een test worden vermeld op bijlagen 4 en 5. De gebruiksvoorwaarden van iedere test worden vermeld in de lijst.

Als een sneltest de aanwezigheid van remstoffen aantoont en als u geen extra analyse (microbiologische inhibitortest) uitvoert, dan mag u die melk niet verwerken tot producten die bestemd zijn voor menselijke consumptie. Ook indien bij het uitvoeren van een extra analyse (microbiologische inhibitortest) het resultaat niet-conform is, mag de melk niet verwerkt worden tot producten die bestemd zijn voor menselijke consumptie.

De melk waarin remstoffen werden teruggevonden mag ook niet meer gebruikt worden voor de verwerking tot dierlijke voeding. Overeenkomstig verordening (EG) nr. 1069/2009 wordt de melk als een

dierlijke bijproduct van categorie 2 beschouwd en moet volgens de voorwaarden van de verordening verzameld en verwijderd worden.

Als een sneltest de aanwezigheid van remstoffen aantoont, dan moet dit resultaat gemeld worden aan het FAVV conform het KB van 14/11/2003 en het MB van 22/01/2004. Als u een extra analyse (microbiologische inhibitortest) uitvoert en dat deze conform is, dan moet het niet-conform resultaat van de sneltest niet gemeld worden.

6. Bijlagen

Bijlage 1 - Lijst van gevalideerde en door het FAVV erkende sneltesten voor ingangscntrole van melk op antibioticaresiduen en hun toepassingswijze.

Bijlage 2 - Tabel detectiecapaciteit van de verschillende door het FAVV erkende sneltesten voor β -lactamantibiotica in rauwe koemelk.

Bijlage 3 - Voorwaarden voor de erkenning van een sneltest voor de screening van antibioticaresiduen in rauwe melk.

Bijlage 4 – Lijst van gevalideerde en door het FAVV erkende microbiologische inhibitortesten voor het bevestigen van een niet-conform resultaat bekomen met een sneltest bij de ingangscntrole van melk op antibioticaresiduen.

Bijlage 5 – Voorwaarden voor de erkenning van een microbiologische inhibitortest voor het bevestigen van een niet-conform resultaat, bekomen met een sneltest bij de ingangscntrole van melk op antibioticaresiduen.

7. Overzicht van de revisies

Overzicht van de revisies van de omzendbrief		
Versie	Van toepassing vanaf	Reden en omvang van de revisie
1	31/05/2005	- Niet van toepassing
2.0	07/04/2014	- Aanpassing van het formaat van de omzendbrief van 31/05/2005 - Publicatie van een lijst van sneltesten die erkend zijn door het FAVV voor de screening op antibioticaresiduen in rauwe melk door opkopers
2.1	22/12/2014	- Publicatie van een lijst van microbiologische inhibitortesten die erkend zijn voor het FAVV voor het bevestigen van een niet-conform resultaat
2.2	12/05/2016	- Toevoeging van sneltesten in bijlage 1
2.3	03/02/2017	- Toevoeging van sneltesten in bijlage 1 - Schrappen van informatie met betrekking tot autocontrole die ook terug te vinden is in de gidsen
2.4	Date de publication	- Aanpassing bijlagen 1, 2 en 4

Lijst van gevalideerde en door het FAVV erkende sneltesten voor ingangscntrole van melk op antibioticaresiduen en hun toepassingswijze

- **beta-s.t.a.r. combo (v1.0)** (Neogen Corporation)

200 µl melk in vial, menging melk met receptor en incubatie bij $47,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ gedurende 2 minuten, aanbrengen van de dipstick en verdere incubatie bij $47,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ gedurende 3 minuten en aflezing van de kleurvorming met een Accuscan III of Accuscan Pro reader met 1,00 als cut-off waarde.

- **Betastar S Combo** (Neogen Corporation)

300 µl of melk en een teststrip in een plastic vial en incubatie bij $47,5^{\circ}\text{C}$ gedurende 5 minuten (Rapid test incubator) en aflezing van de kleurvorming met een Accuscan Pro reader met 1,00 als cut-off waarde.

- **BetaXpress Milk MRL KIT044** (Unisensor s.a.)

200 µl melk in cupje, menging melk met receptor, aanbrengen van strip in het valsysteem van de HeatSensor en incubatie bij $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ gedurende 3 minuten, aflezing van de kleurvorming met een ReadSensor met 1,10 als cut-off waarde.

- **BT Sensors Test Kit** (Ballya)

200 µl melk (op kamertemperatuur gebracht) in cupje, menging melk met receptor, incubatie bij 37°C gedurende 3 minuten, aanbrengen van strip en verdere incubatie bij 37°C gedurende 3 minuten en aflezing van de kleurvorming binnen de 3 minuten met NB GEN readersysteem met volgende cut-off waarden: 1,5 voor tetracyclinekanaal, 1,2 voor cefalexinekanaal en 1,8 voor β -lactamkanaal.

- **Charm MRLBL (ROSA)** (Charm Sciences Inc.)

300 µl melk, incubatie bij $56\pm 1^{\circ}\text{C}$ gedurende 8 minuten, gevolgd door het onmiddellijk aflezen van de strip met een Charm reader met 0,000 als cut-off waarde.

- **Charm MRLBL1** (Charm Sciences Inc.)

300 µl melk, incubatie bij $56\pm 1^{\circ}\text{C}$ in EZ-Reader gedurende 1 minuut, automatisch gevolgd door het onmiddellijk aflezen van de strip met 0,000 als cut-off waarde.

- **Charm MRLBL3** (Charm Sciences Inc.) met ROSA Pearl of EZ-Reader

300 µl melk, incubatie bij $56\pm 1^{\circ}\text{C}$ gedurende 3 minuten, gevolgd door het onmiddellijk aflezen van de strip met een Charm ROSA Pearl of EZ Reader met 0,000 als cut-off waarde.

- **EXTENSO KIT075** (Unisensor)

250 µl melk in cupje, menging melk met receptor en incubatie bij $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ gedurende 3 minuten, aanbrengen van de biostick en verdere incubatie bij $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ gedurende 10 minuten en aflezing van de kleurvorming met een EXTENSO device binnen de 3 minuten. Minimum activatie van aflezing van het BETA en CEFA kanaal met 1,00 als cut-off waarde.

- **'A Rapid Test for Beta-lactams, Cefalexin & Tetracyclines in Milk'** (Order Code: YRM1008-40; Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.)

Cupje in incubator, 200 µl melk in cupje, menging melk met receptor en incubatie bij $40\pm 3^{\circ}\text{C}$ gedurende 3 minuten, aanbrengen van de dipstick en verdere incubatie bij $40\pm 3^{\circ}\text{C}$ gedurende 6 minuten, verwijdering van het absorberend materiaal onderaan de strip en aflezing van de kleurvorming binnen de 5 minuten met een SAFF Reader LF en Bioeasy Data Export software met 1,10 als cut-off waarde.

- **SNAP Beta ST Plus** (IDEXX Inc.)

Uitvoering van de test bij omgevingstemperatuur ($15-30^{\circ}\text{C}$), 450 µl melk in staalbuisje, menging van de melk met het conjugaat niet langer dan 15 seconden, inhoud in sample well van SNAP Beta ST Plus device, eenmaal de flow de activatiecirkel heeft bereikt activatie 'snap' van de device, verdere incubatie gedurende 6 minuten en aflezing van de kleurvorming met een SNAPshot DSR reader met 1,05 als cut-off waarde.

- SNAPduo ST Plus (IDEXX Inc.)

Uitvoering van de test bij omgevingstemperatuur (15-30°C), 450 µl melk in staalbuisje, menging van de melk met het conjugaat niet langer dan 15 seconden, inhoud in sample well van SNAPduo ST Plus device, eenmaal de flow de activatiecirkel heeft bereikt activatie 'snap' van de device, verdere incubatie gedurende 6 minuten en aflezing van de kleurvorming met een SNAPshot DSR reader met 1,05 als cut-off waarde.

- TwinSensor KIT020 (oude ref BT660+) (Unisensor s.a.)

200 µl melk in cupje, menging melk met receptor en incubatie bij 40±1°C gedurende 3 minuten, aanbrengen van de dipstick en verdere incubatie bij 40±1°C gedurende 3 minuten en aflezing van de kleurvorming met een ReadSensor met 1,10 als cut-off waarde.

- TriSensor KIT035 (Unisensor s.a.)

200 µl melk in cupje, menging melk met receptor en incubatie bij 40±1°C gedurende 3 minuten, aanbrengen van de dipstick en verdere incubatie bij 40±1°C gedurende 3 minuten en aflezing van de kleurvorming met een ReadSensor met 1,10 als cut-off waarde.

- 4-Sensor KIT060 (Unisensor s.a.)

200 µl melk in cupje, menging melk met receptor en incubatie bij 40±1°C gedurende 10 minuten in een voorverwarmde HeatSensor, aanbrengen van de dipstick in speciale houder. Dipstick wordt na verloop van tijd automatisch toegevoegd. Aflezing van de kleurvorming met een ReadSensor met 1,10 als cut-off waarde (1,25 voor chlooram-phenicolkanaal).

Tabel A. Detectiecapaciteit van de verschillende door het FAVV erkende sneltesten voor β -lactamantibiotica in rauwe koemelk (update 13/02/2018) Deel 1.

Merker residu	MRL ^b $\mu\text{g kg}^{-1}$	Detectiecapaciteit ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a							Charm MRLBL3	
		β -s.t.a.r. combo (v1.0)	β -s.t.a.r. S Combo	Beta Xpress Milk MRL KIT044	BT Sensors Test kit	Charm MRLBL (ROSA)	Charm MRLBL1	Pearl reader	EZ Reader	
benzylpenicilline	4	≤3	1,5	2	1	2	2	3	3	
ampicilline	4	4	3	3	1	3	4	4	4	
amoxicilline	4	≤4	2	3	2	3	4	4	4	
cloxacilline	30	6	6	9	1	25	16	25	25	
nafcilline	30	14	5	100	7	45	150	175	175	
ceftiofur	100 ^c	100	30	10	50	6	16	14	14	
desfuroylceftiofur	100 ^c	1000	35	60	400	8	90	≤100	≤100	
cefquinome	20	≤8	16	20	6	14	≤20	20	20	
cefazoline	50	50	90	12	25	10	20	25	30	
cephapirine	60 ^d	10	20	4	5	5	30	9	10	
desacetylcephapirine	60 ^d	50	60	20	12	7	≤60	≤60	≤60	
cefoperazone	50	≤8	3	1	1	4	1	2	2	
cefalexine	100	>700	3000	900	12	15	1750	1250	1250	
cefalonium	20	≤5	2	2	1	3	9	12	12	

Tabel B. Detectiecapaciteit van de verschillende door het FAVV erkende sneltesten voor β -lactamantibiotica in rauwe koemelk (update 13/02/2018) Deel 2.

Merker residu	MRL ^b $\mu\text{g kg}^{-1}$	Detectiecapaciteit ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a						
		EX-TENSO KIT075	SNAP BETA ST Plus	A Rapid Test for Beta-lactams, Cefalexin & Tetracyclines in Milk	SNAPduo ST Plus	Twin Sensor KIT020	Tri Sensor KIT035	4Sensor Milk KIT060
benzylpenicilline	4	2	2	2	2	3	3	2
ampicilline	4	4	4	2	4	4	4	4
amoxicilline	4	3	2	3	3	4	4	4
cloxacilline	30	12	3	3	4	8	9	6
nafcilline	30	350	4	9	3	80	70	80
ceftiofur	100 ^c	8	9	90	8	10	10	10
desfuroylceftiofur	100 ^c	60	30	1000	25	60	≤100	60
cefquinome	20	14	12	7	16	16	20	20
cefazoline	50	9	18	45	20	12	18	12
cephapirine	60 ^d	4	25	14	30	4	5	4
desacetylcephapirine	60 ^d	16	≤60	45	≤60	18	≤60	20
cefoperazone	50	3	20	3	35	4	3	1
cefalexine	100	4	40	6	30	1250	800	900
cefalonium	20	3	18	2	14	4	4	2

Nota's: ^a Detectiecapaciteit gedefinieerd als de laagste geteste concentratie die minimum respectievelijk 19 op 20, 38 op 40 of 57 op 60 herhalingen een positief resultaat geeft.

^b MRL, Maximum Residue Limit (Verordening (EC) No 470/2009; Commissie Verordening (EU) No 37/2010 van de Commissie en wijzigingen (status op 20/11/2013).

^c som van alle residuen met een intacte β -lactamstructuur uitgedrukt als desfuroylceftiofur.

^d som van cephapirine en desacetylcephapirine.

Opm.: gekleurde vakjes duiden de antibiotica aan voor welke de detectielimiet van de testen hoger is dan de MRL.

Voorwaarden voor de erkenning van een sneltest voor de screening van antibioticaresiduen in rauwe melk.

De groep van β -lactam antibiotica (penicillines en cefalosporines) vormen veruit de voornaamste groep inzake residuen in rauwe melk (Reybroeck en Daeseleire, 2003; Kress *et al.*, 2007). Derhalve moet de test inzake detectiespectrum de merkerresiduen van alle β -lactamantibiotica die als farmacologisch werkzame substantie in België geregistreerd zijn voor gebruik bij melkvee kunnen aantonen. Het betreft de volgende substanties: benzylpenicilline, ampicilline, amoxicilline, cloxacilline, nafcilline, ceftiofur, desfuroylceftiofur, cefquinome, cefazoline, cephapirine, desacetylcephapirine, cefoperazone, cefalexine en cefalonium.

Inzake detectiecapaciteit moet de test minimum 85% (of 12/14) van de hogervermelde merkerresiduen op hun respectievelijke Maximum Residue Limit (MRL) (Verordening (EU) 37/2010) kunnen aantonen in minimaal 95% van de gevallen.

De test moet robuust zijn en mag maximaal 5% negatieve resultaten geven op positieve monsternames.

De test dient op kosten van de kitproducent door een NRL of een erkend geaccrediteerd laboratorium gevalideerd te zijn volgens EG-Beschikking 2002/657. Voor testen op de markt gebracht na januari 2010, dient de validatie eveneens volgens de CRL-richtlijnen te zijn uitgevoerd (*Anonymous*, 2010).

De test dient erkend te worden door het FAVV op advies van het Belgisch NRL op basis van de beoordeling van het validatiedossier. Indien het FAVV het nodig acht, kan een bijkomend advies van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV gevraagd worden.

Referenties :

Anonymous. 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Community Reference Laboratories Residues (CRLs). 20/01/2010: 1-18.

Beschikking van de Commissie Nr. 2002/657/EG van 12 augustus 2002 ter uitvoering van Richtlijn 96/23/EG van de Raad wat de prestaties van analysemethoden en de interpretatie van resultaten betreft.

Kress C., Seidler C., Kerp B., Schneider E., Usleber E. 2007. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Anal. Chim. Acta* 586: 275-279.

Reybroeck W., Daeseleire E. 2003. Invloed bewaring op antibioticaresiduen in melk. Heranalyse positieve stalen en identificatie van remstoffen verantwoordelijk voor een ongunstige resultaat bij de officiële kwaliteitsbepaling van melk. Resultaten. Melle, Belgium: T&V-ILVO.

Verordening (EU) Nr. 37/2010 van de Commissie van 22 december 2009 betreffende farmacologisch werkzame stoffen en de indeling daarvan op basis van maximumwaarden voor residuen in levensmiddelen van dierlijke oorsprong.

Lijst van gevalideerde en door het FAVV erkende microbiologische inhibitortesten voor het bevestigen van een niet-conform resultaat, bekomen met een sneltest bij de ingangscntrole van de rauwe melk op antibioticaresiduen door de zuivelindustrie met vermelding van de gebruiksvoorwaarden

Charm Blue Yellow II (Charm Sciences Inc, Lawrence, MA)

Incubatie in een afgesloten circulerend waterbad bij 64°C; incubatietijd vermeld op de verpakking van de reagentia. Visuele aflezing volgens de instructies van de kitproducent of instrumentele aflezing: reflectometrische lezing (GVSCAN) van de gesloten platen met de melk bovenop de agar, cut-off score 6,0. Er wordt tevens een negatief en een positief controlemonster meegeanalyseerd.

Delvotest SP-NT (MCS) (DSM Food Specialties bv, Delft, NL)

Incubatie in een afgesloten circulerend waterbad of in een blockheater bij 64°C; incubatietijd zoals vermeld door de kitproducent en maximaal 3u. Visuele aflezing volgens de instructies van de kitproducent of instrumentele aflezing: reflectometrische lezing (Delvoscan software (microtiterplaten) of Premiscan (ampullen)) van de gesloten platen/ampullen met de melk bovenop de agar, cut-off z-value -3,0. Er wordt tevens een negatief en een positief controlemonster meegeanalyseerd.

Delvotest T (DSM Food Specialties bv, Delft, NL)

Incubatie in een afgesloten circulerend waterbad of in een blockheater bij 64°C; incubatietijd zoals vermeld door de kitproducent en maximaal 3u15. Visuele aflezing volgens de instructies van de kitproducent of instrumentele aflezing: reflectometrische lezing (Delvoscan software (microtiterplaten) of Premiscan (ampullen)) van de gesloten platen/ampullen met de melk bovenop de agar, cut-off z-value -3,0. Er wordt tevens een negatief en een positief controlemonster meegeanalyseerd.

Eclipse 3G (ZEULAB S.L., Zaragoza, ES)

Incubatie in een voorverwarmde incubator (FX Incubator, Ref ZE. / EX ZEULAB S.L.) bij 65°C; incubatietijd vermeld op certificaat per lot van reagentia. Visuele aflezing volgens de instructies van de kitproducent of instrumentele aflezing: spectrofotometrische aflezing bij 590 nm (filter 1) en 650 nm (filter 2) na het verwijderen van de melk en het wassen van de platen, cut-off = gemiddelde absorptie van 4 x blanco melk + 0,2. Er wordt tevens een negatief en een positief controlemonster meegeanalyseerd.

Voorwaarden voor de erkenning van een microbiologische inhibitortest voor het bevestigen van een niet-conform resultaat, bekomen met een sneltest bij de ingangscntrole van de rauwe melk op antibioticaresiduen door de zuivelindustrie

Gezien het doel van het testen komen zowel microtiterplaten als ampullen in aanmerking.

Inzake detectiecapaciteit moet de test minimum 85% (of 12/14) van de hierna vermelde merkerresiduen op hun respectievelijke Maximum Residue Limit (MRL) (Verordening (EU) nr. 37/2010) kunnen aantonen in minimaal 95% van de gevallen.

Het betreft de merkerresiduen van alle β -lactamantibiotica die als farmacologisch werkzame substantie in België geregistreerd zijn voor gebruik bij melkvee, namelijk benzylpenicilline, ampicilline, amoxicilline, cloxacilline, nafcilline, ceftiofur, desfuroylceftiofur, cefquinome, cefazoline, cephapirine, desacetylcephapirine, cefoperazone, cefalexine en cefalonium.

De test dient door een NRL of een geaccrediteerd en door het FAVV erkend laboratorium gevalideerd te zijn volgens Beschikking van de Commissie nr. 2002/657/EG. Voor testen op de markt gebracht na januari 2010 dient de validatie eveneens volgens de CRL richtlijnen te zijn uitgevoerd.

De test dient erkend te worden door het FAVV na beoordeling van een validatiedossier opgesteld door een NRL. Indien het FAVV het nodig acht, kan een bijkomend advies van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV gevraagd worden.

Referenties:

Anonymous. 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Community Reference Laboratories Residues (CRLs). 20/01/2010: 1-18.

Beschikking van de Commissie nr. 2002/657/EG van 12 augustus 2002 ter uitvoering van Richtlijn nr. 96/23/EG van de Raad wat de prestaties van analysemethoden en de interpretatie van resultaten betreft.

Verordening (EU) nr. 37/2010 van de Commissie van 22 december 2009 betreffende farmacologisch werkzame stoffen en de indeling daarvan op basis van maximumwaarden voor residuen in levensmiddelen van dierlijke oorsprong.