

## Opsporen remstoffen in industriemelk

### Inleiding

Deze methode beschrijft de te volgen werkwijze bij het opsporen van antibiotica en sulfonamiden in industriemelk.

Op de te onderzoeken rauwe melk wordt een screening uitgevoerd met de Delvotest<sup>®</sup> SP, Delvotest<sup>®</sup> Mini of Delvotest<sup>®</sup> SP 5PACK. Alle monsters die na de voorgeschreven incubatie bij de screening aanleiding geven tot een positief of twijfelachtig resultaat, worden onderworpen aan een bevestiging. Deze bevestiging wordt uitgevoerd op het origineel melkmonster na verwarming van het melkstaal bij 80°C gedurende 10 minuten. Monsters die bij de bevestiging opnieuw een groeiremming vertonen, worden als positief beschouwd.

Ter controle van de gebruikte test wordt steeds een staal remstovrije melk en een penicillinestandaard (4 µg/l of ppb) meegeanalyseerd.

De Delvotest<sup>®</sup> SP (en zijn variant Delvotest<sup>®</sup> Mini en Delvotest<sup>®</sup> SP 5PACK) is een microbiologische breed spectrum screeningstest voor residuen van infectiewerende stoffen in de melk. Met deze test kunnen tal van substanties voorkomend op de MRL-lijst (Maximum Residue Limit) voor melk (EEG-Verordening 2377/90 en aanvullingen) op MRL-niveau opgespoord worden. Het gebruik van de Delvotest<sup>®</sup> SP of variant sluit evenwel niet uit dat er van bepaalde diergeneesmiddelen (bijvoorbeeld tetracyclines, quinolones, ...) er zich toch residuen boven MRL in de melk kunnen bevinden, zonder dat deze aan het licht komen. Tevens is de test ongevoelig voor bepaalde verboden stoffen zoals chlooramphenicol en nitrofurane. Wil men een absolute zekerheid i.v.m. productveiligheid betreffende antibioticaresiduen dient men parallel bijkomende testen in te zetten.

### **A. Principe van de test**

Een melkmonster laat men diffunderen door een agarbodem, bestaande uit voedingsstoffen, een pH-indicator en trimethoprim, geënt met sporen van het testorganisme *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Na incubatie zal bij normale groei en zuurproductie van het testorganisme de kleur van de pH-indicator veranderen van purper naar geel. Bij aanwezigheid van remstoffen is de kleur van het testmedium nog purper of blauwgroen na incubatie gedurende de voorgeschreven tijdsduur.

### **B. Materiaal**

#### B.1. Remstovrije melk

Volle melk, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen.

#### B.2. Standaard penicilline-oplossing

Standaard van 4 µg/l of ppb (= 0,0067 I.E./ml) penicilline, gemaakt met remstovrije melk (B.1.).

Deze standaard is min. 3 maanden houdbaar, indien bewaard bij -18 °C.

#### B.3. Testkits: men heeft de keuze uit drie commerciële testkits.

##### B.3.1. Delvotest<sup>®</sup> SP (DSM-Gist)

##### B.3.2. Delvotest<sup>®</sup> SP Mini (DSM-Gist) (verpakking van 25 ampullen)

##### B.3.3. Delvotest<sup>®</sup> SP 5PACK (DSM-Gist). Een doos 5PACK bevat 5 breekplaten, gevuld met een vast agarmedium en een flesje met ongeveer 500 nutriënttabletten. De breekplaten zijn afgedekt met een aluminiumfolie en bestaan elk uit 6 blokken met 16 rechthoekige

testhokjes of cups.

- B.4. Incubatieapparatuur: afhankelijk van de gebruikte testkits heeft men de keuze uit incubatieapparatuur, telkens ingesteld op 64,0 °C.
- B.4.1. Specifieke blockheater ingesteld op 64,0 ± 0,5 °C.
- B.4.2. Waterbad met geforceerde circulatie, werkend bij 64,0 ± 0,5 °C. Het waterbad dient te zijn voorzien van een afdekking.
- B.4.3. Broedstoof met geforceerde luchtcirculatie, werkend bij 64,0 ± 0,5 °C.
- B.5. Waterbad met geforceerde circulatie, werkend bij 80 ± 1°C.
- B.6. Micropipet met wegwerptips voor bemonstering van volumes van 100 µl.

### C. Screening

- C.1. Na menging wordt van de te onderzoeken melktank een representatief melkstaal genomen. In afwachting van analyse moeten de melkstalen tussen 0 en 5 °C bewaard worden.
- C.2. Identificeer elke ampul (B.3.1. of B.3.2.) of elk cupje van een microtiterplaat (of blokken ervan) (B.3.3.)
- C.3. Na het verwijderen van de aluminiumfolie voeg een nutriënttablet toe aan elke ampul (B.3.1. of B.3.2.) of elk cupje van een microtiterplaat (of blokken ervan) (B.3.3.)
- C.4. Meng de te onderzoeken monsters. Breng 100 µl monster over in een ampul (B.3.1. of B.3.2.) of cupje van een microtiterplaat (B.3.3.)
- C.5. Breng 100 µl van de remstofvrije melk (B.1.) over in een ampul (B.3.1. of B.3.2.) of in een cupje van een microtiterplaat (B.3.3.) gevuld met testmedium.
- C.6. Breng 100 µl van de penicillinestandaard (B.2.) over in een ampul (B.3.1. of B.3.2.) of in een cupje van een microtiterplaat (B.3.3.) gevuld met testmedium.
- C.7. Sluit de ampullen met kleefband of de cups van de breekplaat met de doorzichtige folie die bij de kit is gevoegd. Incubeer bij 64,0 ± 0,5 °C. Ampullen worden geïncubeerd in een specifieke blockheater (B.4.1.) of in een waterbad (B.4.2.) of in een broedstoof (B.4.3.). Breekplaten of blokken ervan worden geïncubeerd in een waterbad (B.4.2.) of in een broedstoof (B.4.3.).  
De te respecteren incubatieduur is: Delvotest® SP en Delvotest® SP *Mini*: 2u50. De Delvotest® SP 5PACK breekplaten worden 2u45 geïncubeerd.
- C.8. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten.  
De kleur van het testmedium wordt beoordeeld in de ampullen of in de cups van de breekplaat direct na de incubatie.
- C.8.1. Een purpere kleur van het testmedium wijst op aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.
- C.8.2. Een gele verkleuring van het testmedium duidt op het niet aantoonbaar zijn van bacteriegroeiremmende stoffen.
- C.8.3. Het medium in de proefbuizen/cupjes met controlemelkmonsters (C.5.) moeten geel gekleurd zijn, zoniet zijn de sporen onvoldoende levenskrachtig en moet de proef hernomen worden.
- C.8.4. Het medium in de proefbuizen/cupjes met penicillinestandaard (C.6.) moet paars gekleurd zijn, zoniet zijn de sporen onvoldoende gevoelig en moet de proef hernomen worden.
- C.9. Bevestiging van de resultaten  
Bevestig alle monsters die een reactie geven zoals beschreven onder C.8.1. met methode D..

## **D. Bevestiging**

### **D.1. Voorverhitting van de melk**

Alle positieve of verdachte melkmonsters worden verhit gedurende 10 min in een waterbad van 80 °C (B.5.). Hierbij let men erop dat het waterniveau in het warmwaterbad minimum 1 cm hoger staat dan het niveau van de melk. Door de verhitting wordt een groeiremming door in de melk mogelijks aanwezige natuurlijke groeiremmende stoffen te niet gedaan. Na de verhitting dient men de monsters direct terug te koelen onder stromend water en verder te bewaren bij 0-5 °C.

D.2. De onder C. beschreven methode wordt herhaald, nu echter met verhitte melk, om de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen al dan niet te bevestigen.

### **D.3. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten**

Melkmonsters die na verhitting opnieuw aanleiding geven tot een purpere kleur na incubatie worden als positief aanzien. Tevens wordt de goede werking van de testkit gecontroleerd aan de hand van de controlemonsters (blanco en penicillinestandaard).