

Påvisande av rester av antimikrobiella medel i mjölk med Delvotest SP-NT

1 Metodens syfte och tillämpningsområde

Delvotest SP-NT (DSM Food Specialities, Delft Nederländerna) är lämpat för påvisande av rester av antibiotika i mjölk inom testets känslighetsområde. Med antibiotika avses i det här sammanhanget också syntetiska antimikrobiella medel. Testet är ospecifikt, det vill säga att det utöver antibiotika också påvisar närvaro av ämnen som hämmar andra bakteriers tillväxt. Testet lämpar sig för testning av mjölkråvara från kor, flytande mjölkprodukter och vassla, men lämpar sig inte för analys av syrade mjölkprodukter. Testresultatet är endast vägledande, det vill säga att det påvisar att mjölken innehåller något ämne som förhindrar bakteriernas tillväxt.

2 Definition och princip

Delvotest SP-NT är ett mikrobiologiskt test. Testampullerna innehåller ett känt antal sporer av *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953, vars groning och tillväxt förhindras eller saktar av i närvaron av antibiotika. Testorganismen och testförhållandena har valts så, att testet påvisar flera antibiotika som används vid behandling av juverinflammation, om halten av dessa överskrider de högsta tillåtna värdena, dvs. MRL (Maximum Residue Limit), för de antimikrobiella medlen i fråga.

Groning och tillväxt av sporer från *Bacillus stearothermophilus* börjar vid 64°C. Vid bakteriens ämnesomsättning bildas syror, vilka gör att substratets pH-indikator växlar färg från violett till gul. Om provet innehåller ämnen som hämmar bakteriens tillväxt, förblir indikatorns färg violett.

Mjölksprovet förvaras i kylskåp fram till testningen. Om testet inte kan utföra under samma eller följande dag, fryses provet ner till -70 °C, och kan analyseras inom 3 månader. Ett parallellt prov fryses genast ner till -70 °C och förvaras i 2 månader från och med undersökningdagen.

3 Eventuella felkällor och arbets säkerhet

Testet är känsligt för växlingar i förvaringstemperaturen och mycket känsligt för biocida ämnen i miljön (rester av tvättmedel, desinfektionsmedel, konserveringsmedel, antibiotika etc.).

Tvätta, skölj och torka händerna noggrant. Använd inte desinfektionsmedel på händerna eller bordsskivan strax innan du utför testet; du kan använda engångshandskar och skyddspapper på bordet.

Påvisande av rester av antimikrobiella medel i mjölk med Delvotest SP-NT

Testresultatets pålitlighet beror till stor del på inkubationstidens längd och på inkuberingstemperaturen.

En hög bakterie- eller cellhalt i provet kan ge ett felaktigt resultat.

Testet ger endast ett kvalitativt resultat, och exakta detektionsgränser avseende specifika antibiotika kan inte ges för testet. Testresultatets pålitlighet försvagas då man testar resthalter som ligger nära MRL-värdena. Bakteriehämmande ämnen som utsöndras i mjölk från djur med juverinflammation kan ge ett felaktigt positivt testresultat.

Ett prov som har gett ett negativt resultat kan innehålla hämmande ämnen i en koncentration som ligger under metodens detektionsgräns.

Ampullerna kan också inkuberas i vattenbad vid den temperatur som anges i anvisningen. Då ska man se till att kondenseringsvattnet inte tränger in i ampullerna.

4 Miljöförhållanden, testlokaler

Vanlig laboratoriemiljö

5 Utrustning och redskap

- 5.1 Sax
- 5.2 Värmebad (värmeblock, vattenbad) eller värmeskåp $64,0 \pm 0,5$ °C
- 5.3 Finnpipett och spetsar

6 Kalibrering

Vid kalibrering av termometrar i värmeskåp och värmebad samt kalibrering av pipetterna följs kalibreringsprogrammet. Uppföljning av värmeblockets temperatur görs som beskrivits i punkt 8.

Ampullernas känslighet testas med grupprepresentanterna då partiet byts, men dock minst två gånger om året. Resultatet av testningen av partiet antecknas på uppföljningsblanketten.

7 Substrat och reagenser

- 7.1 Delvotest SP-NT ampullförpackning (DSM, Nederländerna, importör Labimex oy). Förvaras vid 4-15 °C
- 7.2 Negativt kontrollprov, utan rester av antibiotika
- 7.3 Positivt kontrollprov, som innehåller så mycket känd antibiotika att resultatet säkert är positivt (arbetsbeskrivning LAB 7031 för utförande av referensprover)
- 7.4 Positivt kontrollprov som innehåller 0,2 µg/ml sulfadiazin
- 7.5 Positivt kontrollprov som innehåller 0,1 µg/ml sulfadiazin (används vid behov i samband med ett andra test)

Påvisande av rester av antimikrobiella medel i mjölk med Delvotest SP-NT

8 Utförande

Förvärm värmebadet innan testet påbörjas.

Kontrollera och anteckna värmeblockets temperatur före testningen. För kontrolleringen behöver du en kalibrerad termometer som passar in i den andra av blockets två mätningsskopar.

Om en stor mängd prover ska analyseras samtidigt, inkuberas de i vattenbad eller i ett vattenkäril i värmeskåp. Kontrollera och bokför alltid också vattnets temperatur.

Bokför testets partinummer.

Klipp försiktigt ut det antal ampuller som behövs.

Numrera ampullerna.

Gör hål i ampullerna genom att sticka hål på aluminiumförslutningen t.ex. med den trubbiga ändan på en spruta.

Blanda mjölkproverna genom att vända på provrören upp och ner.

Inokulera 0,1 ml mjölkprov och kontrollprov som ska undersökas (ta provet på ca 1 cm djup) i motsvarande ampull på agaren.

Vid rutintestning är det tillräckligt med en positiv kontroll (bokför antibiotikan och vid behov styrkan på en arbetsblankett, t.ex. pen, sulfa 0,2 µg/ml).

Använd en skild spets för varje prov.

Inkubera ampullerna i 3 timmar vid $64,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Resultaten avläses första gången efter att rören har inkuberats 2h 15min och därefter med 15 min mellanrum

Avläs resultaten i naturligt ljus mot en vit bakgrund. De slutliga resultaten registreras så snart som det negativa kontrollröret har blivit gult (negativt); detta kallas "kontrolltid" (Control Time, CT). Det tar i allmänhet 2h 30min – 3h för att uppnå kontrolltiden.

3h inkuberingstid får inte överskridas; om den negativa kontrollen vid det laget inte är gul och den positiva kontrollen violett (eller gråviolett) ska de undersökta proverna förkastas, kontrollerna kontrolleras och proverna undersökas.

9 Resultat

9.1 Tolkning av resultaten

Resultatet är positivt (+) då provet innehåller antibiotika (eller andra ämnen som hämmar bakterietillväxt) och ampullens färg förblir violett. Resultatet är negativt (-) då provet inte innehåller hämmare och ampullens färg blir gul.

Påvisande av rester av antimikrobiella medel i mjölk med Delvotest SP-NT

Ett gulviolett resultat är osäkert. Även en liten färgförändring betyder att resultatet är osäkert. Ett sådant resultat ska alltid utläsas av minst två personer.

Obs! Resultatet av sulfadiazin-kontroll 0,2 µg/ml ska antingen vara positivt eller osäkert positivt. Även ett prov som har orsakat en svagare färgförändring än sulfadiazin-kontrollen 0,2 µg/ml ska tolkas som osäkert positivt.

Ett prov som har gett ett osäkert eller positivt resultat testas på nytt senast följande dag på ett sådant sätt, att provet hettas upp före testningen till 80-85°C i 5 minuter (kontrollprover hettas inte upp).

I samband med upprepningen testas också ett kontrollprov för penicillin, ett negativt kontrollprov och vid behov en sulfadiazin-kontroll 0,1µg/ml (resultatet kan vara positivt, osäkert eller negativt).

9.2 Rapportering av resultaten

Resultatet anges enligt följande "Resthalter av antibiotika konstaterades" eller "Resthalter av antibiotika konstaterades inte" eller "Osäkert positivt". Om provet har undersökts på nytt, ska resultatet av den nya undersökningen anges.

Ett positivt eller osäkert resultat rapporteras genast vidare, i enlighet med programmet för övervakning av främmande ämnen. Prover som har tagits i anslutning till programmet för övervakning av främmande ämnen och som gett ett osäkert eller positivt resultat sänds till kemiska forskningsenheten för undersökning av de antibiotika för vilka det finns en metod. För andra prover överenskommes om kemisk konfirmering specifikt för provet med den som beställt undersökningen.

10 Validering av metoden

Metoden validerades vid EELA år 2005. Valideringsmaterialet och resumén förvaras i Delvotest-mappen.

En resumé om ändring av metoden Delvotest SP > Delvotest SP-NT och en resumé om testning av kontrollerna fogades till valideringsrapporten 24.1.2007.

En ytterligare validering av metoden gjordes vid Evira år 2010. Detta valideringsmaterial och valideringsrapporten förvaras i Delvotest-mappen.

11 Metoder för kvalitetssäkring

Jämförande undersökningar mellan laboratorierna	<input checked="" type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input type="checkbox"/>
Referensämnen eller -stammar	<input type="checkbox"/>
Kontrollprover	<input checked="" type="checkbox"/>
Tillsynsprover	<input type="checkbox"/>
Utbyttestest/inokulerade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>
Blankprover/sterilitetstester	<input type="checkbox"/>
Bekräftelse av att substraten fungerar	<input type="checkbox"/>
Kontrollkort	<input type="checkbox"/>
Andra procedurer (kemisk konfirmering)	<input checked="" type="checkbox"/>

Påvisande av rester av antimikrobiella medel i mjölk med Delvotest SP-NT

12 Metodreferenser och avvikelser

Tillverkarens anvisningar för testet, dvs. DSM Food Specialities, Delft Nederländerna.

Kang, JH, Jin, JH, Kondo, F. 2005. False-Positive Outcome and Drug Residue in Milk Samples Over Withdrawal Times. J Dairy Sci 88, 908-913.

Kang, JH, Kondo, F. 2001. Occurrence of False-Positive Results of Inhibitor on Milk Samples Using the Delvotest SP Assay. J Food Prot 64, 1211-1215.

Rapid Test Kits for the Detection of Antibiotics and Sulphonamides in Milk. The Food Safety Authority of Ireland, 2002.

13 Ändringar till den föregående versionen

Några förändringar i temperaturuppföljningen (punkt 6 och 8).
Anvisningen sammanställdes av: Katariina Pekkanen