

Stofnaam	Avoparcine
Type methode	Agardiffusie
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	5 mg/kg
Herhaalbaarheid	20 % bij < 100 mg/kg 10 % bij 100 mg/kg of meer
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	
Titel	Diervoeders en voormengsels - Bepaling van het gehalte aan avoparcine - Microbiologisch. RIKILT Wageningen (1993). RSV nr A0360; DAM code 0800316; Uitgiftedatum 9-6-1993; Editie nr 2;
EEG-methode	Bepaling van Avoparcine door middel van agardiffusie. Bijlage. Negende richtlijn van de Commissie van 31 juli 1981 houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (81/715/EEG). Publikatieblad van de EG 10-9-1981; Nr L 257/39-42 De beschreven methode is een be-/uitwerking van de EEG-methode en kan als gelijkwaardig worden beschouwd met de EEG-methode

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Deze methode beschrijft de kwantitatieve bepaling van avoparcine in voormengsels, diervoeders en kunstmelkpoeders. De aanwezigheid van andere bacteriegroeiremmende stoffen, met name tetracyclines, penicillines, ionophoren en furazolidon kan storen. De storing van ionophoren en furazolidon is op te heffen door een voorextractie met chloroform. De storing van penicillines is op te heffen door toevoeging van penicillinase en die van tetracyclines door het gebruik van een ander micro-organisme.

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens van de bepaling ligt bij 2,5 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De ondergrens van de bepaling ligt bij 5 mg/kg.

2 Definitie

Het bepaalde avoparcine wordt als avoparcine in mg/kg opgegeven.

3 Beginsel

Na een eventuele voorextractie wordt het monster geëxtraheerd met een aceton/zoutzuur/water-mengsel. Na filtreren/centrifugeren wordt het extract op pH 4,5 gebracht en verdund met fosfaatbuffer pH 4,5 tot een gewenste concentratie. Hierna wordt de antibiotische activiteit bepaald door meting van de groeiremzones van avoparcine in een met *Bacillus subtilis* ATCC 6633 geënte agarvoedingsbodem. De diameter/het oppervlak van deze groeiremzone is rechtevenredig met de logaritme van de concentratie van het antibioticum.

4 Precisie

4.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon, dient voor gehalten < 100 mg/kg niet groter te zijn dan 20% relatief en voor andere gehalten niet groter dan 10% relatief.

4.2 Reproduceerbaarheid

"Niet bekend".

5. Reagentia en hulpstoffen

5.1 Micro-organisme

5.1.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sporensuspensie met een kiemgetal van ca. 10^7 sporen/ml.

(Zie voor het aanhouden, bereiden, uittesten en de functionaliteitscriteria van deze sporensuspensies RSV A0481 en RSV A0038).

5.1.2 *Bacillus cereus* K 250 Tetracycline Resistent in gevriesdroogde toestand.

(Zie voor het aanhouden, vriesdrogen, uittesten en de functionaliteitscriteria van deze stam RSV A0481 en RSV A0350).

5.2 Bereiden van de entsuspensie

5.2.1 Het in (5.1.1) beschreven micro-organisme kan direct gebruikt worden.

5.2.2 Het in (5.1.2) beschreven micro-organisme wordt opgenomen in 1 ml fysiologische zoutoplossing (5.8) en gehomogeniseerd. Deze suspensie kan, mits bewaard bij 0-5°C, gedurende een week worden gebruikt.

Via voorproeven op platen met voedingsbodem (5.3) dient te worden nagegaan hoeveel van deze suspensies aan het medium moet worden toegevoegd (zie bijlage 1).

Andere methoden voor het bereiden van entsuspensies mogen worden gebruikt, zover bewezen is dat zij overeenkomstige suspensies geven.

5.3 Voedingsbodem voor de bepaling (*)

Samenstelling:

dextrose	10	g
gistextract	2,5	g
kaliumpydrogeenfosfaat (KH_2PO_4) p.a.	0,45	g
dikaliumpydrogeenfosfaat (K_2HPO_4) p.a.	0,69	g
agar	15	g
gedemineraliseerd water	1000	ml

Los de ingrediënten onder verwarming in het water op en steriliseer gedurende 15 min. bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Koel het medium af tot $50 \pm 2^\circ\text{C}$ in een waterbad (6.10). Stel vlak voor gebruik, onder aseptische omstandigheden, de pH in op $6,5 \pm 0,1$ met behulp van natriumhydroxide-oplossing (5.9). Het medium dient vers bereid te worden.

(*) In de handel verkrijgbare kant en klare voedingsbodems, van gelijke of nagenoeg gelijke samenstelling mogen worden gebruikt, mits ze dezelfde resultaten geven.

(Zie voor kwaliteitscriteria gedemineraliseerd water RSV T0014, beheer en ijking pH meter RSV T0015, sterilisatie uitvoering en onderhoud RSV T0013).

5.4 Standaard avoparcine met een bekende activiteit uitgedrukt in μg avoparcine per mg.
(Cyanamid Benelux S.A./N.V., Rue du Bosquet B-1348, Mont-Saint-Guibert, België)

5.5 Zoutzuur d:1.19

5.6 Aceton p.a.

5.7 Chloroform p.a.

5.8 Fysiologische zoutoplossing

Samenstelling:

natriumchloride (NaCl) p.a.	8,5	g
gedemineraliseerd water	1000	ml

Los op en steriliseer gedurende 15 min. bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$ in gewenste hoeveelheden. Deze oplossing is maximaal 1 maand houdbaar bij $0-5^\circ\text{C}$.

5.9 Natriumhydroxideoplossing 1 mol per liter

Deze oplossing is maximaal 6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur.

5.10 Natriumhydroxideoplossing 10%

Samenstelling:

natriumhydroxide (NaOH) p.a.	100	g
gedemineraliseerd water	1000	ml

Los het natriumhydroxide onder afkoeling op in het water. Deze oplossing is maximaal 6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur.

5.11 Penicillinase-oplossing van 10.000.000 IU/ml (Difco 0346-63-7)

5.12 Zoutzuuroplossing 0,1 mol per liter

Deze oplossing is maximaal 6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur.

5.13 Fosfaatbuffer pH 4,5

Samenstelling:

kaliumdihydrogeenfosfaat (KH_2PO_4) p.a.	13,6	g
gedemineraliseerd water	1000	ml

Los op in 900 ml water, stel de pH in op $4,5 \pm 0,1$, vul aan met water tot 1000 ml en meng.

Deze oplossing is maximaal 6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur.

5.14 Aceton/zoutzuur/water mengsel

Samenstelling:

aceton (5.6)	650 ml
zoutzuur (5.5)	25 ml
gedemineraliseerd water	325 ml

Breng met behulp van een maatcilinder 325 ml water in een bekerglas van 2 L, voeg onder voortdurend roeren 25,0 ml zoutzuur toe, voeg met behulp van een maatcilinder 650 ml aceton toe en meng. Bewaar deze oplossing in een goed afgesloten fles. Deze oplossing is maximaal 6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur.

5.15 Aceton/zoutzuur mengsel

Samenstelling:

aceton (5.6)	600 ml
zoutzuur (5.12)	400 ml

Meet deze hoeveelheden in afzonderlijke maatcilinders af, voeg samen en meng. Bewaar deze oplossing in een goed afgesloten fles. Deze oplossing is maximaal 6 maanden houdbaar bij kamertemperatuur.

5.16 Standaardoplossingen

Alvorens afgewogen kan worden, dient de standaard eerst op kamertemperatuur gebracht te worden, door deze minimaal een uur bij kamertemperatuur te laten staan.

5.16.1 Standaardoplossing voor voormengsels met een gehalte ≥ 100 mg/kg

Weeg van de standaard (5.4) $4,00 \pm 0,40$ mg aan avoparcine af in een maatkolf van 100 ml, los op en vul aan met aceton/zoutzuur mengsel (5.15). Deze oplossing kan, mits bewaard bij $0-5^{\circ}\text{C}$, maximaal een week worden gebruikt. Van deze standaard-oplossing wordt 10,00 ml op $\text{pH } 4,5 \pm 0,1$ gebracht en aangevuld met fosfaatbuffer $\text{pH } 4,5$ (5.13) tot 100 ml. Deze werkstandaardoplossing S_8 heeft een richtconcentratie van $4,0 \mu\text{g/ml}$ aan avoparcine.

Door verdere 1 : 1 verdunning met fosfaatbuffer $\text{pH } 4,5$ (5.13) worden de volgende concentraties bereid:

$$S_4 = 2,0 \mu\text{g/ml}$$

$$S_2 = 1,0 \mu\text{g/ml}$$

$$S_1 = 0,5 \mu\text{g/ml}$$

Deze werkstandaardoplossingen worden vers bereid.

5.16.2 Standaardoplossing voor diervoeders en kunstmelkpoeders met een gehalte < 100 mg/kg

Zoals beschreven onder (5.16.1) met dit verschil dat de werkstandaardoplossing S_8 een richtconcentratie van 2,0 $\mu\text{g/ml}$ aan avoparcine bevat. Door verdere 1 : 1 verdunning met fosfaatbuffer pH 4,5 (5.13) worden de volgende concentraties bereid:

$$\begin{aligned} S_4 &= 1,0 \mu\text{g/ml} \\ S_2 &= 0,5 \mu\text{g/ml} \\ S_1 &= 0,25 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Deze werkstandaardoplossingen worden vers bereid.

5.16.3 Standaardoplossing bij gebruik van *B.cereus* K 250 T.R. als micro-organisme.

Zoals beschreven onder (5.16.1) voor voormengsels en onder (5.16.2) voor diervoeders en kunstmelkpoeders.

6 Apparatuur

- 6.1 Micro-balans 0,01 mg.
- 6.2 Micro-pipet voor volumes van 0,1 ml \pm 0,001 ml.
- 6.3 Ponsapparaat voor het ponsen van gaatjes met een diameter van 9,0 mm.
- 6.4 Zone-afleesapparatuur voor het meten van het oppervlak van de groeiremzones, of een schuifmaat met een afleesnauwkeurigheid van minimaal 0,1 mm.

(Zie voor de bediening van het zone-afleesapparaat RSV T0016).
- 6.5 Koelcentrifuge 4600 t.p.m. G = 200 g met een temperatuurbereik van -30°C tot +40°C.
- 6.6 pH meter met een afleesnauwkeurigheid van \pm 0,01 pH eenheden met een electrode geschikt voor het meten van pH in voedingsbodems bij een temperatuur tot ca. 55°C.
- 6.7 Broedstoof 30 \pm 1°C.
- 6.8 Schudapparaat met cirkelvormige schudbeweging.
- 6.9 Petrischalen (steriel) met een inwendige diameter van ca. 11 cm.
- 6.10 Waterbad van 50 \pm 2°C.
- 6.11 Soxhlet apparatuur met een inhoud van 100 en 300 ml.
- 6.12 Extractiehulzen voor soxhlet apparatuur (6.11) Schleicher en Schüll 22 x 80 en 48 x 145 mm.
- 6.13 Büchnertrechter voor filters met een diameter van 9 cm.

6.14 Filtreerpapier met een diameter van 9 cm. (MN 640 witband).

6.15 Papierfilters Schleicher en Schuell 595½ φ150 mm.

6.16 Laboratoriumglaswerk al dan niet steriel.

7 Werkwijze

7.1 Algemeen

Neem bij elke serie monsters, indien aanwezig een blanco- en positief controlemonster mee, die qua samenstelling zoveel mogelijk overeenkomen met de te onderzoeken monsters. Het blanco controlemonster mag geen bacteriegroeiremmende werking vertonen. Het avoparcine gehalte in het positieve controlemonster dient 5 maal bepaald te zijn en globaal overeen te komen met het te verwachten gehalte in de te onderzoeken monsters.

Indien geen positief controlemonster aanwezig is, dient er een spike-monster (blanco controlemonster waaraan een bekende hoeveelheid standaardoplossing is toegevoegd) meegenomen te worden.

7.2 Voorzorgsmaatregelen

De monsterbewerking dient zoveel mogelijk te worden uitgevoerd in een zuurkast.

7.3 Voorbehandeling van het monster

Diervoeders en voormengsels worden in de monsterkamer gemalen tot een deeltjesgrootte van maximaal 1 mm en verdeeld, in hoeveelheden van ca. 100 gram, over de daarvoor bestemde monsterpotjes. Deze laboratoriummonsters worden bij kamertemperatuur in het donker bewaard.

7.4 Proefeenheid

0,5 - 50 g.

7.5 Beschrijving procedure

7.5.1 Voormengsels met een verwacht gehalte ≥ 100 mg/kg

Weeg een hoeveelheid monster af (0,5-10 g al naar gelang het te verwachten gehalte, zie bijlage 2), voeg 60 ml aceton/zoutzuur/water mengsel (5.14) toe en schud 30 minuten op het schudapparaat (6.8). Controleer de pH en breng deze, indien nodig op $\text{pH} \leq 2$ met zoutzuur (5.5), voeg vervolgens 40 ml aceton/zoutzuur/water mengsel (5.14) toe en schud nogmaals 5 minuten. Filtreer (6.15) of centrifugeer het monster ca. 10 minuten bij ca. 4500 t.p.m. en een temperatuur van 10°C (6.5). Pipetteer een opgegeven hoeveelheid (zie bijlage 2) van de bovenstaande vloeistof in een maatkolf, stel met natriumhydroxideoplossing (5.10) de pH in op $4,5 \pm 0,1$ en vul aan met fosfaatbuffer pH 4,5 (5.13) en meng. Verdun verder met fosfaatbuffer pH 4,5 (5.13) tot een richtconcentratie van 4,0 µg/ml aan avoparcine en

centrifugeer, indien de oplossing troebel is, ca. 10 minuten bij ca. 4500 t.p.m. en een temperatuur van 10°C (6.5). De aldus verkregen oplossing = U_8 . Door verdere 1 : 1 verdunning met fosfaatbuffer pH 4,5 (5.13) worden de volgende richtconcentraties bereid:

$$U_4 = 2,0 \mu\text{g/ml}$$

$$U_2 = 1,0 \mu\text{g/ml}$$

$$U_1 = 0,5 \mu\text{g/ml}$$

7.5.2 Diervoeders en kunstmelkpoeders met een verwacht gehalte < 100 mg/kg

Weeg 50 g monster af, voeg 100 ml aceton/zoutzuur/water mengsel (5.14) toe en schud 30 minuten op het schudapparaat (6.8). Filtreer (6.15) of centrifugeer het monster ca. 10 minuten bij ca. 4500 t.p.m. en een temperatuur van 10°C (6.5). Pipetteer 10,0 ml van de bovenstaande vloeistof in een maatkolf, stel met natriumhydroxideoplossing (5.10) de pH in op $4,5 \pm 0,1$ en vul aan met fosfaatbuffer pH 4,5 (5.13) en meng. Verdun verder met fosfaatbuffer pH 4,5 (5.13) tot een richtconcentratie van 2,0 $\mu\text{g/ml}$ aan avoparcine en centrifugeer, indien de oplossing troebel is, ca. 10 minuten bij ca. 4500 t.p.m. en een temperatuur van 10°C. De aldus verkregen oplossing = U_8 . Door verdere 1 : 1 verdunning met fosfaatbuffer pH 4,5 (5.13) worden de volgende richtconcentraties bereid:

$$U_4 = 1,0 \mu\text{g/ml}$$

$$U_2 = 0,5 \mu\text{g/ml}$$

$$U_1 = 0,2 \mu\text{g/ml}$$

7.5.3 Voorextractie

7.5.3.1 Voormengsels die ionophoren met een gehalte > 200 mg/kg of furazolidon bevatten en diervoeders die furazolidon bevatten.

Weeg in een extractiehuls (6.12) een hoeveelheid monster af al naar gelang het te verwachten gehalte aan avoparcine (zie 7.5.1) en dek dit af met ontvette watten. Breng de extractiehuls in het soxhletapparaat (6.11) en extraheer gedurende 3 uur met chloroform (5.7). Droog het monster in de extractiehuls gedurende 1 nacht in een stoof van $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Breng het monster kwantitatief over in een erlenmeyer en ga verder met de extractie zoals beschreven in 7.5.1 behalve de inweeg.

7.5.3.2 Diervoeders die ionophoren met een gehalte < 200 mg/kg bevatten.

Weeg 50 g monster af, voeg 100 ml chloroform (5.7) toe en schud gedurende 60 minuten op het schudapparaat (6.8). Filtreer het monster onder vacuum kwantitatief over een büchnertrechter (6.13) waarin een filtreerpapier (6.14) is aangebracht. Droog het monster in de büchnertrechter gedurende een nacht in een stoof van $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Breng het monster kwantitatief over in een erlenmeyer en ga verder met de extractie zoals beschreven in 7.5.2 behalve de inweeg.

7.5.4 Enten van de voedingsbodem

De voedingsbodem (5.3) wordt met de entsuspensie (5.2.1) geënt. Indien het monster een tetracycline bevat wordt de entsuspensie (5.2.2) gebruikt. (Bij aanwezigheid van penicilline's in het monster, wordt per 100 ml voedingsbodem (5.3) 1 ml penicillinase-oplossing (5.11) toegevoegd).

7.5.5 Gereed maken van de platen

De agardiffusie vindt plaats in platen waarop de vier standaardconcentraties (S_8 , S_4 , S_2 en S_1) en de vier monsterconcentraties (U_8 , U_4 , U_2 en U_1) voorkomen. Elke plaat moet beslist alle vier de standaard- en monsterconcentraties tezamen bevatten. Giet in de petrischalen (6.9) 24 ml beënte voedingsbodem (7.5.4), zodat een laagdikte verkregen wordt van ca. 2,5 mm en laat op een horizontale plaats stollen. Pons na het stollen 8 gaatjes met een diameter van 9 mm in de voedingsbodem. In de gaatjes wordt met de micro-pipet (6.2) een hoeveelheid van 0,1 ml van de standaard-of monsterconcentraties gepipetteerd in de volgorde S_1 , U_1 , S_2 , U_2 , S_4 , U_4 , S_8 en U_8 (zie bijlage 2). Voor ieder monster wordt de diffusiebepaling in viervoud uitgevoerd, zodat iedere bepaling neerkomt op het meten van 32 groeiremzones verdeeld over vier petrischalen.

7.5.6 Bebroeding

Bebroed de platen 16 tot 18 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

8 Resultaten

8.1 Opmeten van de remzones

Meet de diameter/het oppervlak van de remzones van standaard en monster (6.4). Zet voor elke concentratie de gemiddelde waarden op semi-logaritmisch papier uit, zodanig dat de logaritme van de concentraties tegen de diameter/het oppervlak van de remzones komt te staan. (Platen die niet meteen afgelezen worden, mogen maximaal 48 uur bij $0-5^\circ\text{C}$ bewaard blijven).

8.2 Berekenen van de relatieve activiteit

Trek de best passende lijnen voor standaard en monsters; ga daarbij als volgt te werk. Bepaal het best passende punt voor de laagste standaardwaarde (S_L) volgens de formule:

$$(a) S_L = \frac{(7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8)}{10}$$

Bepaal het best passende punt voor de hoogste standaardwaarde (S_H) volgens de formule:

$$(b) S_H = \frac{(7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1)}{10}$$

Bepaal op dezelfde wijze de best passende punten voor de laagste monsterwaarde (U_L) en de hoogste monsterwaarde (U_H) door in de bovenstaande formules S_1, S_2, S_4 en S_8 door U_1, U_2, U_4 en U_8 te vervangen.

Vul de waarden S_L en S_H in dezelfde grafiek in. Door deze twee punten te verbinden krijgt men de best passende rechte voor de standaardconcentraties. Op dezelfde wijze verkrijgt men met U_L en U_H de best passende rechte voor het monster. Wanneer er geen enkele storing is, moeten deze rechten evenwijdig zijn.

De rechten kunnen als evenwijdig worden beschouwd wanneer $(S_H - S_L)$ en $(U_H - U_L)$ niet meer van elkaar verschillen dan 10% van hun gemiddelde. Als de rechten niet evenwijdig zijn, kan men hetzij U_1 en S_1 , hetzij U_8 en S_8 uitsluiten. De waarden S_L , S_H , U_L en U_H waarmee men dan de best passende rechten kan trekken worden dan berekend volgens de volgende formules:

$$S_L = \frac{(5S_1 + 2S_2 - S_4)}{6} \quad \text{of} \quad \frac{(5S_2 + 2S_4 - S_8)}{6}$$

$$S_H = \frac{(5S_4 + 2S_2 - S_1)}{6} \quad \text{of} \quad \frac{(5S_8 + 2S_4 - S_2)}{6}$$

en analoge formules voor U_L en U_H . De met deze alternatieve formules getrokken rechten moeten ook op evenwijdigheid onderzocht worden, zoals boven aangegeven. Wanneer het eindresultaat uit drie niveaus berekend is moet dit op het analyseformulier (zie bijlages 3 en 4) vermeld worden met de toevoeging: "berekend op basis van drie standaardniveaus".

Wanneer de rechten als evenwijdig beschouwd kunnen worden, wordt de logaritme ($\log A$) van de relatieve activiteit van het monster berekend volgens een van de volgende formules:

Voor 4 niveaus

$$\log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{(U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2)}$$

Voor 3 niveaus

$$\log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{(U_4 + S_4 - U_1 - S_1)} \quad \text{of}$$

$$\log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{(U_8 + S_8 - U_2 - S_2)}$$

Wanneer de rechten niet als evenwijdig kunnen worden beschouwd, moet men de bepaling éénmaal volledig herhalen. Wanneer het dan opnieuw niet lukt evenwijdige rechten te verkrijgen, moet men de logaritme van de relatieve activiteit ($\log A$) berekenen met de formule voor 4 niveaus. Het resultaat van de analyses moet dan echter beschouwd worden als een benadering en moet op het analyseformulier (zie bijlagen 3 en 4) vermeld worden met de toevoeging: "benadering". Het eindresultaat is het gemiddelde van de afzonderlijke analyses.

8.3 Berekenen van de werkelijke activiteit in het monster

Werkelijke activiteit = aangenomen gehalte x relatieve activiteit. Deze wordt uitgedrukt in mg/kg aan avoparcine. Door vermenigvuldiging met de door de fabrikant gegeven standaard activiteit (5.4) wordt het gehalte opgegeven als avoparcine.

8.4 Kwaliteitscontrole

8.4.1 Standaarden

Deze dienen na ontvangst bij 0-5°C in het donker, boven silicagel, bewaard te worden. Tevens dient de vervaldatum genoteerd te worden. Vóór in gebruik name van een nieuwe batch standaardstof wordt de microbiologische activiteit van de nieuwe batch vergeleken met de activiteit van de voorgaande batch. De relatieve activiteit moet $1 \pm 0,15$ zijn, zie batchcontrolestaat 302, bijlage 5. Indien dit niet het geval is dient men contact op te nemen met de fabrikant en de geteste batch vooralsnog niet in gebruik te nemen.

8.4.2 Standaardlijnen

De helling van de standaardlijn dient een rechte lijn te zijn met een correlatiecoëfficiënt van 0,99.

8.4.3 Positieve controlemonsters

Resultaten van de analyses van positieve controlemonsters met een gehalte < 100 mg/kg mogen niet meer dan 20% van het gemiddelde van de 5 voorgaande analyseresultaten afwijken; voor andere gehalten geldt 10%. Indien hieraan niet wordt voldaan dient de bepaling overgedaan te worden met een ander positief controlemonster.

8.4.4 Spike-monsters

Resultaten van de analyses van spike-monster mogen niet meer dan 20% afwijken van het gedoseerde gehalte. Indien hieraan niet wordt voldaan dient de bepaling overgedaan te worden, met een nieuw spike-monster.

8.4.5 Blanco controlemonsters

Wanneer er groeiremming optreedt bij het blanco controlemonster dient de analyse herhaald te worden. Er kan lichte groeiremming bij U_8 en U_4 optreden, veroorzaakt door remming van de chemicaliën/oplosmiddelen. Dit heeft geen invloed op de bepaling, monster en standaardremzones worden beiden iets groter. Indien ook bij U_2 en/of U_1 remming wordt gevonden dient de analyse herhaald te worden.

9 Registratie

De resultaten dienen op de Lijsten A0360/3 of A0360/4 genoteerd te worden.

LITERATUUR

- Publicatieblad van de Europese Gemeenschap Nr. L 257/39.
- H.L. Hatfield and A.Thomas - Elimination of feedadditive derived interferences in the assay for avoparcin.
Analyst, january 1986 vol. III.
- Microbiological assay of avoparcine in animal feeds and premixes, Analyst november 1977 vol. 104 p.p.
1075-1082.

Bepalen van de juiste hoeveelheid entsuspensie (5.1.1) en 5.1.2 per 100 ml voedingsbodem (5.3).

Benodigdheden:

- Standaardoplossing (5.16.2) die resp. 2.0 - 1.0 - 0.5 en 0.25 µg/ml aan microbiologisch actieve stof bevat.
- Hoeveelheden van 100 ml voedingsbodem (5.3) met een pH 6,5.
- Entsuspenies: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sporensuspensie die ca 10^7 sporen/ml bevat (5.2.1). *Bacillus cereus* K250 TR in fysiologische zoutoplossing (5.2.2).

Voeg per 100 ml voedingsbodem (5.3) resp. 0,10 - 0,20 - 0,50 - 0,75 en 1,0 ml entsuspensie (5.2.1) toe. Voor entsuspensie (5.2.2) geldt resp. 0,05 - 0,10 - 0,15 - 0,20 en 0,25 ml.

Giet de beënte voedingsbodem in hoeveelheden van 24 ml in petrischalen (6.9) en laat op een horizontale plaats stollen. Pons na het stollen gaatjes met een diameter van 9 mm in de voedingsbodem en pipetteer hierin 0,1 ml van de verschillende standaardoplossingen (5.16.2). (Per serie worden vier petrischalen gebruikt). Bebroed de platen 16 tot 18 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Meet het oppervlak/de diameter van de groeiremzones en zet voor elke avoparcine concentratie het oppervlak/de diameter uit tegen de log. concentratie.

De hoeveelheid *B.subtilis* suspensie (5.2.1) die voor de toegepaste concentraties avoparcine zo groot mogelijke maar nog scherpe remzones geeft en waarvan het oppervlak/de diameter uitgezet tegen de log. concentratie een rechte lijn geeft met een correlatiecoëfficiënt $r = 0,99$ is geschikt voor de bepaling van avoparcine. Indien dit niet het geval is kan men door meer of minder entsuspensie (5.2.1) aan de voedingsbodem (5.3) toe te voegen om het resultaat verbeteren. De entsuspensie kan eventueel verdund worden met fysiologische zoutoplossing (5.8). Anders dient een nieuwe suspensie bereid te worden.

De hoeveelheid *B.cereus* K250 TR suspensie (5.2.2) die voor de toegepaste concentraties avoparcine zo groot mogelijke maar nog scherpe remzones geeft en waarvan het oppervlak/de diameter uitgezet tegen de log. concentratie een rechte lijn geeft met een correlatiecoëfficiënt $r = 0,99$ is geschikt voor de bepaling van avoparcine. Indien dit niet het geval is kan men door meer of minder entsuspensie (5.2.1) aan de voedingsbodem (5.3) toe te voegen om het resultaat verbeteren. De entsuspensie kan eventueel verdund worden met fysiologische zoutoplossing (5.8). Anders dient een nieuwe suspensie bereid te worden.

Lijst: A0360/1

Datum: 1989-04-20

Bijlage 4b bij RSV A0360

NUMMER:		STANDAARD BATCH:				MONSTER		MICRO-ORGANISME:				
AARD MONSTER: Blanco controle monster		verduunning:				verduunning:		B. subtilis ATCC 6633				
BEPALING: Avoparcine RSV A0360		$4000 \mu\text{g} \text{ --- } 100$ $ $ $\dots \text{ --- } 100$						batch:				
PROJECT NR.:								EXTRACTIE: Aceton/zoutzuur/ water-mengsel				
		AANGENOMEN GEHALTE:										
S ₈	S ₄	S ₂	S ₁	U ₈	U ₄	U ₂	U ₁	↑ d i a m · / o p p · r e m z o n e				
_8	_4	_2	_1	_8	_4	_2	_1					
Opmerking:			Berekend uit formule: log A = A =									
Helling standaardlijn:												
Correlatie coëfficiënt:												
Datum:												
Analist:			Gehalte:						_1	U ₂	_4	_8
Goedgekeurd door:									_1	_2	_4	_8
log. concentratie →												

Batchcontrolestaat Rikilt	Afdeling Microb	BCS 302 Datum 1993-02-01
Stof, oplossing, mengsel, materiaal	Omschrijving Avoparcine standaard (Cynamid)	
Samenstelling, serie	Omschrijving Avoparcine met bekende zuiverheid en activiteit	
Functionaliteitscriteria	Omschrijving	Tolerantie
	<ul style="list-style-type: none"> • Relatieve activiteit tov "oude" batch • Zuiverheid en activiteit Uiterste gebruikperiode Zie Cyamid	1 ± 0,15
Toetsingswijze	Omschrijving	RSV
	<ul style="list-style-type: none"> • Vergelijken met microbiologische activiteit van "oude" en nieuwe batch standaard • Zie Cyamid 	A0360
Toepasbaar bij	RSV A0360	

Lijst: A0360/5
Datum: 1993-05-27