

II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

COMMISSIE

BESCHIKKING VAN DE COMMISSIE

van 14 februari 1991

tot vaststelling van analyse- en testmethoden voor rauwe en voor warmtebehandelde melk

(91/180/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 85/397/EEG van de Raad van 5 augustus 1985 inzake hygiënische en veterinaire rechtelijke problemen bij het intracommunautaire handelsverkeer in warmtebehandelde melk ⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 89/662/EEG ⁽²⁾, en met name op artikel 10, lid 2,

Overwegende dat de Commissie, volgens artikel 10, lid 2, van Richtlijn 85/397/EEG, de analyse- en testmethoden vaststelt die moeten worden gebruikt om te controleren of de normen voor rauwe melk en warmtebehandelde melk in acht worden genomen;

Overwegende dat voor rauwe melk met name methoden moeten worden vastgesteld aan de hand waarvan het gehalte aan kiemen, het gehalte aan cellen en het vriespunt kunnen worden bepaald en de aanwezigheid van antibiotica kan worden geconstateerd;

Overwegende dat voor gepasteuriseerde melk met name methoden moeten worden vastgesteld aan de hand waarvan de afwezigheid van pathogene kiemen, het aantal coliformen, het gehalte aan kiemen, de afwezigheid van fosfatase, de aanwezigheid van peroxydase, de afwezigheid van antibiotica en het vriespunt kunnen worden bepaald of geconstateerd;

Overwegende dat voor gesteriliseerde en voor UHT-melk met name methoden moeten worden vastgesteld aan de hand waarvan het gehalte aan kiemen kan worden bepaald en de afwezigheid van antibiotica kan worden geconstateerd;

Overwegende dat, om technische redenen, in een eerste fase referentiemethoden moeten worden vastgesteld voor de analyses en tests die moeten waarborgen dat bepaalde normen worden nageleefd; dat met name moet worden voortgegaan met het onderzoek naar de toepassing van routinemethoden voor analyses en tests; dat de bevoegde instanties, in afwachting van de resultaten van dat onderzoek, ervoor moeten zorgen dat zodanige routinemethoden worden toegepast dat aan de normen van Richtlijn 85/397/EEG wordt voldaan;

Overwegende dat, met het oog op een uniforme interpretatie van de resultaten, tegelijk met de referentiemethoden voor de analyses en tests, analyseprocédés en betrouwbaarheidscriteria moeten worden bepaald;

Overwegende dat de in deze beschikking voorziene maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Veterinair Comité,

HEEFT DE VOLGENDE BESCHIKKING GEGEVEN:

Artikel 1

De referentiemethoden voor de analyses en tests voor rauwe melk betreffen:

- bepaling van het vriespunt,
- bepaling van het aantal micro-organismen — gehalte aan kiemen bij 30 °C,
- bepaling van het aantal somatische cellen,
- aantonen van antibiotica en sulfonamiden.

⁽¹⁾ PB nr. L 226 van 24. 8. 1985, blz. 13.

⁽²⁾ PB nr. L 395 van 30. 12. 1989, blz. 13.

Artikel 2

De referentiemethoden voor de analyses en tests voor gepasteuriseerde melk betreffen:

- bepaling van het vriespunt,
- bepaling van de fosfataseactiviteit,
- bepaling van de peroxidaseactiviteit,
- bepaling van het aantal micro-organismen — gehalte aan kiemen bij 30 °C,
- bepaling van het aantal micro-organismen — gehalte aan kiemen bij 21 °C,
- bepaling van het aantal micro-organismen van de coli-groep — telling van de kolonies bij 30 °C,
- aantonen van antibiotica en sulfonamiden,
- aantonen van pathogene micro-organismen.

Artikel 3

De referentiemethoden voor de analyses en tests voor UHT-melk en gesteriliseerde melk betreffen:

- bepaling van het vriespunt,
- bepaling van het aantal micro-organismen — gehalte aan kiemen bij 30 °C,
- aantonen van antibiotica en sulfonamiden.

Artikel 4

De betrouwbaarheidscriteria en de referentiemethoden voor de analyses en tests moeten worden toegepast en de monsters worden verzameld overeenkomstig bijlage I.

Artikel 5

De in de artikelen 1, 2 en 3 genoemde referentiemethoden voor de analyses en de tests zijn opgenomen in bijlage II.

Artikel 6

Deze beschikking wordt vóór 31 december 1992 herzien ten einde met de ontwikkelingen op het gebied van wetenschap en techniek rekening te kunnen houden.

Artikel 7

Deze beschikking is gericht tot de Lid-Statens.

Gedaan te Brussel, 14 februari 1991.

Voor de Commissie
Ray MAC SHARRY
Lid van de Commissie

*BIJLAGE I***INHOUD**

	Bladzijde
I. Algemene bepalingen	4
II. Bemonstering van rauwe en warmtebehandelde melk	6

I. ALGEMENE BEPALINGEN

1. Inleiding

Dit hoofdstuk bevat algemene bepalingen ten aanzien van reagentia, apparatuur, weergave van de resultaten, de criteria voor de betrouwbaarheid en onderzoekverslagen. De bevoegde instanties van de Lid-Staten en de controlelaboratoria die de bemonstering en het onderzoek van melk moeten uitvoeren, moeten deze algemene bepalingen naleven.

2. Reagentia

2.1. Water

2.1.1. Waar sprake is van water voor oplossen, verdunnen of spoelen moet gedistilleerd water, gedeïoniseerd water of gedemineraliseerd water van ten minste gelijke zuiverheid worden gebruikt, tenzij anders aangegeven. Voor microbiologische toepassingen dient het vrij te zijn van stoffen die de groei van micro-organismen onder de proefomstandigheden beïnvloeden.

2.1.2. Waar sprake is van „oplossing” of „verdunning” zonder nadere aanduiding, wordt „oplossing in water” of „verdunning met water” bedoeld.

2.2. Chemicaliën

Alle gebruikte chemicaliën dienen van erkende analysekwaliteit te zijn, tenzij anders aangegeven.

3. Apparatuur

3.1. Lijst van apparatuur

De bij de verschillende referentiemethoden opgegeven lijst van apparatuur bevat alleen apparatuur voor een bijzonder gebruiksdoel en apparatuur volgens een bijzondere specificatie.

3.2. Analytische balans

Met analytische balans wordt een balans bedoeld waarop tot 0,1 mg kan worden gewogen.

4. Weergave van resultaten

4.1. Resultaten

Tenzij anders vermeld, dienen de in het analyserapport weergegeven resultaten het rekenkundig gemiddelde te zijn van twee bepalingen waarbij wordt voldaan aan het voor die bepaling vastgelegde herhaalbaarheids criterium (punt 5.1). Als niet aan het herhaalbaarheids criterium wordt voldaan, moet het onderzoek zo mogelijk worden herhaald of moet het resultaat ongeldig worden verklaard.

4.2. Berekening van percentage

Het resultaat dient te worden berekend als een massapercentage van het monster, tenzij anders vermeld.

5. Criteria voor de betrouwbaarheid: herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

5.1. De bij elke methode opgenomen criteria voor de betrouwbaarheid zijn als volgt vastgelegd:

5.1.1. *Herhaalbaarheid (r)* is de waarde waarbeneden het absolute verschil ligt tussen de resultaten die met dezelfde methode onder dezelfde omstandigheden (dezelfde medewerker, dezelfde apparatuur, hetzelfde laboratorium, en kort na elkaar) zijn verkregen bij twee enkelvoudige bepalingen uitgevoerd met identiek monstermateriaal.

5.1.2. *Reproduceerbaarheid (R)* is de waarde waarbeneden het absolute verschil ligt tussen de resultaten die met dezelfde methode onder verschillende omstandigheden (verschillende medewerkers, verschillende apparatuur, verschillende laboratoria en/of op verschillende tijdstippen) zijn verkregen bij twee enkelvoudige bepalingen uitgevoerd met identiek monstermateriaal.

- 5.1.3. Tenzij anders vermeld, geven de in de betreffende passages van elke methode opgenomen waarden van de criteria voor herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid het 95 %-betrouwbaarheidsinterval weer zoals vastgelegd in ISO 5725, tweede uitgave, 1986. Zij zijn berekend uit de resultaten van erkende gezamenlijke onderzoeken, uitgevoerd om de methoden te beoordelen. Voor sommige methoden zijn echter geen gezamenlijke onderzoeken uitgevoerd. In dit geval zijn de waarden voor herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid geschat.
- 5.1.4. De gezamenlijke onderzoeken en studies als bedoeld in punt 5.1.3 moeten worden gepland en uitgevoerd overeenkomstig internationale voorschriften.
6. **Verslag van het onderzoek**
- Het verslag van het onderzoek dient de gebruikte analysemethode en de verkregen resultaten te vermelden. Ter aanvulling dienen details opgegeven te worden van de toegepaste werkwijze, voor zover deze in de analysemethode niet zijn vastgelegd of naar keuze zijn, evenals andere omstandigheden die de verkregen resultaten hebben kunnen beïnvloeden. Het verslag van het onderzoek moet alle noodzakelijke informatie bevatten voor volledige identificatie van het monster.

II. BEMONSTERING VAN RAUWE EN WARMTEBEHANDELDE MELK

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de referentiemethoden voor bemonstering van rauwe en warmtebehandelde melk. Deze methoden voor de bemonstering en voor het transport en de opslag van monsters zijn van toepassing op rauwe melk bij levering door de producent en op rauwe en warmtebehandelde melk in opslag- en transporttanks.

De in de punten 2, 4.4, 5 en 6 opgenomen methoden gelden voor de bemonstering van warmtebehandelde melk voor directe consumptie.

2. Algemeen

De bemonstering van rauwe en warmtebehandelde melk in bussen, tanks e.d. moet worden uitgevoerd door een bekwaam medewerker die een geschikte opleiding heeft gehad alvorens melk te gaan bemonsteren.

Indien dat nodig wordt geacht, instrueren de bevoegde autoriteiten of instrueert het onderzoekslaboratorium het betreffende personeel over bemonstering en bemonsteringstechnieken, om er zo voor te zorgen dat het monster representatief is voor en overeenkomt met de hele partij.

Indien dat nodig wordt geacht, instrueren de bevoegde autoriteiten of instrueert het onderzoekslaboratorium het bemonsteringspersoneel over de aanduidingen die op het monster moeten worden aangebracht om de identiteit daarvan ondubbelzinnig vast te leggen.

3. Bemonsteringsapparatuur

3.1. Algemeen

Bemonsteringsapparatuur dient te zijn vervaardigd van roestvrij staal, of van een ander geschikt materiaal van voldoende sterkte, en dient van een constructie te zijn die geschikt is voor het gestelde doel (menging, bemonstering, enz.). Dompellichamen en roeders voor het mengen van vloeistoffen in tanks moeten een voldoende groot oppervlak hebben voor een juiste menging van het produkt, maar mogen niet leiden tot het ontstaan van ranzigheid. Lepels moeten een stevige steel hebben die lang genoeg is om op elke diepte in een tank een monster te kunnen nemen. Het volume van de lepel mag niet minder zijn dan 50 ml.

Monsterpotten en de deksels daarvan moeten van glas, geschikte metalen of kunststoffen zijn.

De materialen waarvan de bemonsteringsapparatuur (inclusief monsterpotten en deksels) is vervaardigd, mogen in het monster geen enkele verandering veroorzaken die de resultaten van het onderzoek kan beïnvloeden. Alle oppervlakken moeten schoon en droog, glad en vrij van krassen zijn; hoeken moeten afgerond zijn.

3.2. Bemonsteringsapparatuur voor microbiologisch onderzoek

De bemonsteringsapparatuur, inclusief monsterpotten, moet niet alleen voldoen aan de bepalingen in punt 3.1, maar moet ook steriel zijn.

Als dezelfde bemonsteringsapparatuur achtereenvolgens gebruikt wordt voor het nemen van verschillende monsters, moet deze apparatuur na elke bemonstering gereinigd en gesteriliseerd worden in overeenstemming met de door het onderzoekslaboratorium of door de bevoegde instantie vastgestelde instructies of voorschriften, en wel zo dat de samenstelling van opeenvolgende monsters niet wordt beïnvloed.

4. Bemonsteringstechniek

4.1. Algemeen

Ongeacht de uit te voeren onderzoeken, dient de melk vóór de bemonstering manueel of mechanisch grondig te worden gemengd.

Het monster moet direct na de menging worden genomen, als de melk nog in beweging is.

Wanneer uit tanks tegelijkertijd verscheidene melkmonsters voor verschillende onderzoeken worden genomen, moet het monster voor het microbiologische onderzoek het eerst worden genomen.

Het monstervolume moet toereikend zijn voor het onderzoek. Het volume van de gebruikte monsterpotten moet zodanig zijn dat zij door het monster bijna geheel worden gevuld, zodat een goede menging van het monster vóór het onderzoek mogelijk blijft, maar vetafscheiding tijdens het transport wordt vermeden.

4.2. Manuele bemonstering**4.2.1. Bemonstering van melk uit emmers en bussen**

Beweeg een roerder snel op en neer in de emmer of bus om de melk in beweging te brengen en zorg er daarbij voor dat de melk goed wordt gemengd en dat geen room tegen de bovenrand van de bus blijft zitten. Er moet een monster dat representatief is voor de hele partij, worden genomen overeenkomstig punt 4.2.4.

4.2.2. Bemonstering uit melkkoeltanks op boerderijen

Breng de melk mechanisch of manueel in beweging tot een voldoende mate van homogeniteit is bereikt.

Roer met de hand indien het volume aan melk zo klein is dat niet mechanisch kan worden geroerd.

4.2.3. Bemonstering uit een weegbak

Het is van wezenlijk belang dat de melk bij het overbrengen in een weegbak voldoende wordt gemengd. Het kan nodig zijn manueel of mechanisch te roeren om een gelijkmatige verdeling van vet te verkrijgen. Wanneer het volume van de te bemonsteren partij groter is dan de capaciteit van de weegbak, moet overeenkomstig punt 4.2.4 een monster worden genomen dat representatief is voor de hele partij.

4.2.4. Bemonstering van een tank met compartimenten

Wanneer de te bemonsteren hoeveelheid melk zich in meer dan één compartiment bevindt, neem dan uit elk compartiment een representatieve hoeveelheid en noteer de hoeveelheid melk waar elk monster bijhoort. Meng gedeelten van deze representatieve hoeveelheden in een onderlinge verhouding die overeenkomt met de verhouding tussen de hoeveelheden per compartiment waaruit elk monster werd genomen, tenzij de monsters uit elk compartiment apart moeten worden onderzocht. Neem na menging een of meer monsters van deze proportioneel samengestelde mengmonsters.

4.2.5. Bemonstering van grote recipiënten — tanks voor opslag, spoor- en wegtransport**4.2.5.1. Meng de melk goed vóór de bemonstering.**

Mechanisch roeren wordt aanbevolen om de inhoud van grote recipiënten of tanks voor opslag, spoor- of wegtransport te mengen (punt 4.2.5.2).

De mate van menging moet aangepast worden aan de periode waarin de melk heeft stilgestaan. Aangetoond moet worden dat de in een bepaalde situatie toegepaste mengmethode voldoende efficiënt is voor de analyse die moet worden uitgevoerd; de mengefficiëntie is van bijzondere invloed op de overeenstemming tussen analyseresultaten van monsters die genomen zijn of wel uit verschillende delen van de partijen of wel met tussenpozen bij het legen van de tank. Een methode om melk te mengen, kan als efficiënt worden beschouwd als het verschil tussen de vetgehalten van twee onder deze omstandigheden genomen monsters kleiner is dan 0,1 %.

In een grote tank met bodemafvoer kan zich, zelfs na menging, bij het afvoerpunt een kleine hoeveelheid melk bevinden die niet representatief is voor de hele inhoud. Daarom moeten monsters bij voorkeur door een mangat worden genomen. Als uit de afvoer monsters worden genomen, moet ervoor worden gezorgd dat de monsters representatief zijn voor de gehele inhoud door eerst voldoende melk te laten weglopen.

4.2.5.2. Het mengen van de inhoud van grote recipiënten of van tanks voor opslag, spoor- of wegtransport kan worden verkregen:

- door een in de tank ingebouwd roerwerk, aangedreven door een elektromotor;
- door een schroef of andere roerder, aangedreven door een elektromotor en geplaatst op het mangat, waarbij de roerder in de melk hangt;
- in het geval van spoor- of wegtransporttanks, door de melk met de pompen voor het legen van de tanks te recirculeren via een slang in het mangat;
- met zuivere, gefiltreerde perslucht. In dit geval moeten luchtdruk en -volume minimaal zijn om het ontstaan van ranzigheid te voorkomen.

4.3. Automatische of semi-automatische bemonstering

Voor het bemonsteren van rauwe melk bij levering door de producenten mogen automatische of semi-automatische bemonsteringsapparaten worden gebruikt overeenkomstig de voorschriften van het onderzoeklaboratorium of een andere bevoegde instantie.

Die apparatuur moet vóór het gebruik en ook regelmatig tijdens het gebruik op een juiste wijze worden beproefd volgens de voorschriften van de verantwoordelijke instantie. De geschiktheid van de bemonsteringsprocedures moet worden nagegaan ter bepaling van de volgende parameters:

- de kleinste hoeveelheid verzamelde melk die op de juiste wijze kan worden bemonsterd,
- de mate van versleping (die samenhangt met het minimale monstervolume),
- de mogelijkheid om na goed roeren een representatief monster van de te bemonsteren hoeveelheid melk te krijgen.

Voor het gebruik van automatische of semi-automatische bemonsteringsapparatuur kan de verantwoordelijke bevoegde nationale instantie de volgende parameters vastleggen:

- de kleinste hoeveelheid melk waarvan monsters kunnen worden genomen,
- het minimale monstervolume,
- de maximale versleping,
- welke analyses mogen worden uitgevoerd of welke voorzorgen moeten worden genomen.

4.4. *Bemonstering van warmtebehandelde melk in kleinverpakking voor directe consumptie*

Monsters van warmtebehandelde melk in kleinverpakking voor directe consumptie dienen uit volledig gesloten verpakkingseenheden te bestaan. Zo mogelijk moeten in de melkinrichting de monsters uit de verpakkingmachine of uit de gekoelde opslagruimte worden genomen, zo spoedig mogelijk na behandeling. Voor gepasteuriseerde melk moeten de monsters worden genomen van de melk die op de dag van de bemonstering is gepasteuriseerd.

Voor elke soort warmtebehandelde melk (gepasteuriseerd, UHT en gesteriliseerd) wordt een aantal monsters genomen overeenkomstig de uit te voeren onderzoeken en de voorschriften van het onderzoekslaboratorium of een andere bevoegde instantie.

5. **Identificatie van het monster**

Het monster moet worden voorzien van een identificatiecode opdat het gemakkelijk kan worden geïdentificeerd; de code moet worden aangebracht volgens de voorschriften van het onderzoekslaboratorium of de bevoegde instantie, zodat daarmee de identiteit van het monster wordt vastgelegd (punt 2).

6. **Transport en opslag van monsters**

Het onderzoekslaboratorium stelt voorschriften op voor het transport en de bewaring van melkmonsters, alsmede voor de tijd tussen de bemonstering van de melk en de analyse van het melkmonster; het onderzoekslaboratorium houdt daarbij rekening met het soort melk en de toe te passen analysemethode. De voorschriften worden in overleg met de bevoegde nationale instantie vastgesteld.

In de voorschriften moeten de volgende punten worden verwerkt:

- tijdens transport en bewaring moeten voorzorgen worden genomen om blootstelling aan besmettelijke geuren en direct zonlicht te voorkomen. Als de monsterpot lichtdoorlatend is, moet deze op een donkere plaats worden bewaard;
- monsters van rauwe melk voor microbiologisch onderzoek moeten worden vervoerd en bewaard tussen 0 en 4 °C. De tijd tussen bemonstering en analyse moet zo kort mogelijk zijn en in geen geval meer dan 36 uur. De bevoegde instantie mag een bewaar temperatuur tussen 0 en 6 °C aanvaarden als de tijd tussen bemonstering en analyse niet meer is dan 24 uur;
- monsters voor microbiologisch onderzoek van gepasteuriseerde melk moeten worden vervoerd en bewaard tussen 0 en 4 °C. De tijd tussen bemonstering en analyse moet zo kort mogelijk zijn en in geen geval meer dan 24 uur;
- monsters voor microbiologisch onderzoek van andere melk dan rauwe melk en gepasteuriseerde melk moeten in het laboratorium gekoeld worden bewaard en de tijd tussen bemonstering en analyse moet zo kort mogelijk zijn.

Speciale voorzorgen voor een aantal analyses zijn vermeld bij de verschillende methoden.

BIJLAGE II

INHOUD

	<i>Bladzijde</i>
I. Bepaling van het vriespunt	10
II. Bepaling van de fosfataseactiviteit	16
III. Bepaling van de peroxidaseactiviteit	19
IV. Bepaling van het aantal micro-organismen — telplaatmethode bij 30 °C	20
V. Bepaling van het aantal micro-organismen — telplaatmethode bij 21 °C	25
VI. Bepaling van het aantal micro-organismen van de coligroep bij 30 °C	29
VII. Bepaling van het aantal somatische cellen	33
VIII. Aantonen van antibiotica en sulfonamiden	39
IX. Aantonen van pathogene micro-organismen	48

I. BEPALING VAN HET VRIESPUNT

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de referentiemethode voor de bepaling van het vriespunt van rauwe, gepasteuriseerde, UHT-behandelde of gesteriliseerde volle, gedeeltelijk afgeroomde of afgeroomde melk met een apparaat (de thermistorcryoscoop) waarin een thermostatisch geregeld bad elektrisch wordt afgekoeld en een thermistorsonde de kwikthermometer vervangt.

Er zijn twee soorten instrumenten beschikbaar. Het ene instrument „zoekt” het hoogste vriespunt wanneer de vrieskromme een „plateau” heeft bereikt, terwijl het andere om commerciële redenen ingesteld is om af te lezen op een vastgestelde tijd na het begin van het vriezen. Voor deze referentiemethode zijn plateauzoekende instrumenten nodig, omdat er een verschil in vriespunt-krommen kan zijn tussen de ene melk en de andere, en tussen melk en de standaardoplossingen voor ijking. Instrumenten met „vaste tijd”-instelling kunnen worden gebruikt voor metingen bij routineonderzoek.

Het vriespunt kan worden gebruikt om de hoeveelheid aan de melk toegevoegd water te schatten, mits de zuurtegraad van het monster niet hoger is dan 0,18 g melkzuur per 100 ml (punt 7.4).

2. Definitie

Vriespunt van de melk: de uit meting volgens de beschreven werkwijze verkregen waarde, uitgedrukt in *graden Celsius* (°C).

3. Principe

Een te onderzoeken hoeveelheid melk wordt onderkoeld tot de, van het instrument afhankelijke, gewenste temperatuur en dan wordt kristallisatie veroorzaakt door mechanische trilling, waardoor de temperatuur snel stijgt tot een niveau dat overeenkomt met het vriespunt van het monster.

Het instrument wordt geijkt door het zodanig in te stellen dat voor twee standaardoplossingen de juiste waarden worden verkregen bij toepassing van dezelfde werkwijze als voor monsters melk. Onder deze voorwaarden geeft het plateau het vriespunt van de melk in graden Celsius.

4. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting, en in het bijzonder:

4.1. Thermistorcryoscoop

De thermistorcryoscoop bestaat uit een thermostatisch geregeld koelbad, een thermistorsonde (een weerstandsthermometer met halfgeleider) met bijbehorende schakeling en een galvanometer of „afleesinstrument”, een trilroerder en een voorziening om bevroering te veroorzaken, samen met monsterbuizen.

4.1.1. Koelbad

Twee typen koelbad kunnen worden gebruikt.

4.1.1.1. Dompeltype

Een goed geïsoleerd bad met een geschikte koelvloeistof, zodanig geroerd dat het temperatuurverschil tussen gelijk welke twee punten in de vloeistof niet meer bedraagt dan 0,2 °C. De vloeistoftemperatuur mag niet meer dan $\pm 0,5$ °C afwijken van de door de fabrikant vastgelegde nominale waarde.

Belangrijk is dat de vloeistof in het koelbad op een constant niveau wordt gehouden. Het gehele oppervlak van de monsterbuis onder het volumemerkteken moet door de koelvloeistof bedekt zijn.

4.1.1.2. Circulatietype

Een ononderbroken stroom van een geschikte koelvloeistof wordt rondom de monsterbuis gepompt. De temperatuur van de vloeistof mag niet meer dan $\pm 0,5$ °C afwijken van de door de fabrikant vastgelegde nominale waarde.

Een geschikte koelvloeistof bestaat uit een 33 % (v/v) waterige oplossing van ethaan, 1,2-diol (ethyleenglycol).

4.1.2. Thermistor en bijbehorende schakeling

De thermistor dient een glazen sonde te hebben, niet groter dan $1,80 \pm 0,2$ mm in diameter en met een punt waarvan de diameter niet groter is dan 0,31 mm. De tijdsconstante van de thermistor moet minder dan 2 seconden bedragen en de waarde van β (zie opmerking) moet hoog zijn. De bedrijfsspanning, stroomsterkte en dissipatieconstante moeten zodanig zijn dat bij $-0,512$ °C de temperatuur van de thermistor niet meer dan 0,0005 °C boven de temperatuur van zijn omgeving stijgt. De maximale tolerantie voor de weerstand moet $\pm 5\%$ zijn.

Bij gebruik van de sonde in de cryoscoop moet het uiteinde van de glazen punt in de as van de monsterbuis liggen op een punt $44,6 \pm 0,1$ mm onder het bovenende van de buis (zie figuur 1). De gebruiker moet kunnen beschikken over een houder om de sonde in deze positie te kunnen plaatsen.

Opmerking

Met β wordt de temperatuur-weerstandskarakteristiek van de thermistor vastgelegd volgens de formule:

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2},$$

waarin

T = temperatuur in Kelvin,

R = de weerstand in ohm bij temperatuur T,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \text{temperatuurcoëfficiënt.}$$

β is een constante die afhankelijk is van het voor de thermistor gebruikte materiaal. In de huidige praktijk wordt een waarde boven 3 000 aanbevolen.

4.1.3. Meet- en afleesinstrument

4.1.3.1. Meetprincipe.

Het te gebruiken instrument moet werken volgens het principe dat het eerste „plateau” in de vriespuntkromme wordt gezocht. Het plateau is het deel van de kromme waar de temperatuur minstens 20 seconden binnen $\pm 0,002$ °C constant blijft.

4.1.3.2. Handbediening.

De weerstand van de thermistor dient met een Wheatstone brug of een gelijkaardig toestel te worden gecompenseerd, waarbij stabiele weerstanden van de hoogste kwaliteit moeten worden gebruikt met een afwijking van minder dan $\pm 10\%$ en een temperatuurcoëfficiënt lager dan 2×10^{-5} °C.

De variabele mag over haar hele bereik geen afwijking van de lineariteit te zien geven die groter is dan 0,3% van haar maximumwaarde.

Er moet een mogelijkheid zijn om de weerstanden bij calibratie in te stellen.

De meetschaal moet een verdeling hebben die niet groter is dan 0,001 °C.

4.1.3.3. Automatische werking.

Het afleesinstrument moet een oplossend vermogen hebben van ten minste 0,001 °C in het gebied van 0 tot -1 °C.

De stabiliteit van het afleesinstrument en de bijbehorende schakeling moet zo zijn dat opeenvolgende aflezingen van dezelfde temperatuur niet meer dan 0,001 °C verschillen.

De lineariteit van de schakeling moet zo zijn dat als het instrument juist wordt bediend binnen het gehele traject van $-0,400$ tot $-0,600$ °C geen fout van meer dan 0,001 °C wordt veroorzaakt.

4.1.4. Roerstaaf

Voor het roeren van de te onderzoeken hoeveelheid melk wordt een staaf gebruikt van een metaal dat ten opzichte van melk inert is en die een diameter heeft tussen 1 en 1,5 mm.

De amplitude van de roerstaaf moet afgesteld worden; de staaf moet verticaal worden gemonteerd met de onderkant op gelijke hoogte met het uiteinde van de thermistorsonde. Een tolerantie van ongeveer 1,5 mm onder of boven dit punt is toegestaan.

De roerstaaf moet in zijwaartse richting trillen met een door de fabrikant opgegeven amplitude (niet minder dan 1,5 mm) die voldoende is om de temperatuur in de te testen hoeveelheid monster tijdens de bepaling uniform te houden. De roerstaaf mag bij normaal roeren de thermistorsonde of de wand van de buis op geen moment raken.

- 4.1.5. Voorziening om bevrozing te veroorzaken
Dit kan elke voorziening zijn waardoor onmiddellijk na het in werking treden ervan de bevrozing van het monster begint, zodat de temperatuur van de te onderzoeken hoeveelheid tot het vriespunt stijgt. De roerstaaf kan hiertoe worden benut; men kan de trillingsamplitude gedurende 1 tot 2 seconden verhogen zodat de roerstaaf de wand van de monsterbuis raakt.
- 4.1.6. Monsterbuizen
De monsterbuizen (zie figuur 1) moeten van glas zijn met een lengte van $50,8 \pm 0,1$ mm, een uitwendige diameter van $16,0 \pm 0,1$ mm en een inwendige diameter van $13,5 \pm 0,1$ mm. De wanddikte mag over de hele buis niet meer dan 0,1 mm verschillen.
De buizen moeten op 29,8 mm onder de rand (21 mm boven de onderkant van de buis) een merkteken hebben, overeenkomend met een monstervolume van $2,5 \pm 0,1$ ml.
- 4.1.7. Elektriciteitsvoorziening
De voedingsspanning moet in het apparaat of extern gestabiliseerd zijn, zodat geen grotere variatie optreedt dan $\pm 1\%$ van de nominale waarde, wanneer de netspanning met $\pm 6\%$ varieert.
- 4.2. Analytische balans
- 4.3. Maatkolven, 1 000 ml inhoud, klasse A.
- 4.4. Droogstoof, goed geventileerd, waarin een temperatuur van 130 ± 1 °C kan worden gehandhaafd
elektrische oven, geventileerd, waarin een temperatuur van 300 ± 25 °C kan worden gehandhaafd.
- 4.5. Exsiccator
5. Reagentia
- 5.1. In borosilicaatglas gedistilleerd water, gekookt en gekoeld tot 20 ± 2 °C in een kolf met een absorptiebuis voor kooldioxide.
- 5.2. Natriumchloride, analysekwaliteit, fijn gemalen, gedurende vijf uur bij 300 ± 25 °C in een oven gedroogd, of anders gedurende ten minste 24 uur in een stoof bij 130 ± 1 °C gedroogd en tot kamertemperatuur afgekoeld in een exsiccator.
- 5.3. Bereiding van standaardoplossingen
Weeg in een weegflesje de benodigde hoeveelheid (zie tabel 1) droog natriumchloride (punt 5.2) af. Los het op in gedistilleerd water (punt 5.1), breng dit kwantitatief over in een maatkolf van 1 000 ml en vul tot de merkstreep aan met water van 20 ± 2 °C.
Bewaar deze oplossing bij ongeveer 5 °C niet langer dan twee maanden in goed afgesloten polyethyleen flessen van hoogstens 250 ml inhoud.

Tabel 1 — Vriespunt van natriumchlorideoplossingen bij 20 °C

g NaCl/l	°C
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,600

Zwenk en keer vóór gebruik van een standaardoplossing de fles voorzichtig verscheidene malen om om de inhoud grondig te mengen. Een standaardoplossing mag nooit zo heftig worden geschud dat lucht wordt ingeslagen.

Monsters van een standaardoplossing moeten uit de fles worden genomen door de oplossing in een schone droogbeker te gieten, anders gezegd, voor dit doel mogen nooit pipetten worden gebruikt.

Oplossingen uit flessen die voor minder dan een kwart gevuld zijn, mogen niet meer worden gebruikt en evenmin oplossingen die ouder zijn dan twee maanden, als geen fungicide (bij voorbeeld een thiomersaloplossing van 10 g/l) was toegevoegd.

6. Ijking van de thermistorcryoscoop

De cryoscoop moet zo worden opgesteld dat de temperatuur van de omgevingslucht niet meer dan 1 °C verschilt van de temperatuur waarbij de ijking werd uitgevoerd. De cryoscoop mag niet worden blootgesteld aan zonlicht of tocht en een kamertemperatuur boven 26—27 °C.

Zorg ervoor dat de cryoscoop werkt in overeenstemming met de aanwijzingen van de fabrikant en ten minste twaalf uur voordat de ijking is aangezet. Controleer de plaats van de sonde, de trillingsamplitude van de roerstaaf en de temperatuur van de koelvloeistoffen.

Kies twee standaardoplossingen (zie tabel 1) waarvan het vriespunt respectievelijk dicht boven en dicht onder het verwachte vriespunt van het te onderzoeken monster melk ligt. Het verschil in vriespunt tussen de twee oplossingen moet liefst niet kleiner dan -0,100 °C zijn.

(In bepaalde, tegenwoordig verkrijgbare cryoscopen is de schakeling van de thermistor ontworpen om te worden afgesteld bij een specifieke waarde van het vriespunt binnen het meettraject van het instrument. In deze gevallen maakt het gebruik van een standaardoplossing met dat vriespunt als één van de ijkoplossingen de calibratieprocedure eenvoudiger en dient de fabrikant deze waarde op te geven.)

Pipetteer $2,5 \pm 0,1$ ml van één standaardoplossing in een schone, droge monsterbuis en stel de cryoscoop in werking.

Opmerking

De monsterbuizen die bij ijking worden gebruikt moeten van dezelfde soort glas gemaakt zijn als die welke bij het onderzoek van het melkmonster worden gebruikt en zij moeten ook op dezelfde tijd gewassen en gespoeld zijn met gedemineraliseerd water. De temperatuur van de standaardoplossingen moet gelijk zijn aan die van de monsters melk.

Stel de knoppen voor ijking in volgens aanwijzing van de fabrikant tot de aflezing van de cryoscoop dezelfde waarde geeft als het vriespunt van de standaardoplossing. Herhaal de gang van zaken met de andere standaardoplossing en ga zo afwisselend door totdat opeenvolgende aflezingen voor elke oplossing de juiste waarde voor het vriespunt per oplossing geven zonder verdere bijstelling van de calibratieknoppen. De cryoscoop is dan klaar voor gebruik en zal rechtstreeks het vriespunt van het monster melk aangeven zonder dat enige correctie nodig is.

7. Voorbehandeling van het monster

7.1. Bewaar zo nodig de monsters bij een temperatuur tussen 0 en 5 °C.

7.2. Verwijder eventuele zichtbare deeltjes of vast botervet uit het monster, zo nodig door het te filtreren in een schone droge recipiënt en meng het monster voorzichtig. Het eventueel te gebruiken filter moet inert zijn voor melk en moet bij de laboratoriumtemperatuur goed werken.

7.3. De melk kan onderzocht worden bij de temperatuur (tussen 0 en 5 °C), waarbij zij is bewaard, of men kan de melk op de temperatuur van het laboratorium laten komen vlak voor het begin van het onderzoek. Het is echter noodzakelijk dat de standaardoplossingen en de monsters melk bij gebruik dezelfde temperatuur hebben.

7.4. Bepaal de titreerbare zuurtegraad van de melk zo goed mogelijk tegelijkertijd met de vriespuntbepaling. Monsters met een zuurtegraad boven 0,18 g melkzuur per 100 ml kunnen niet worden onderzocht.

7.5. UHT-behandelde melk en gesteriliseerde melk moeten voor onderzoek minstens 20 minuten in een open recipiënt staan.

8. Werkwijze**8.1. Controle vooraf**

Controleer dat het niveau en de temperatuur van de koelvloeistof in overeenstemming zijn met de aanwijzingen van de fabrikant en dat de thermistorsonde zich in een lege monsterbuis in de juiste stand bevindt. Schakel de cryoscoop in en zorg ervoor dat de koelvloeistof goed wordt geroerd of rondgepompt, al naar gelang van het geval. Controleer, nadat de cryoscoop ten minste twaalf uur aanstaat, de temperatuur van de koelvloeistof en de stand en trillingsamplitude van de roerstaaf.

8.2. Routinecontrole van de ijking

Meet vóór elke testserie het vriespunt van een standaard natriumchlorideoplossing (bij voorbeeld een oplossing met als vriespunt $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$) totdat twee opeenvolgende bepalingen geen groter verschil geven dan $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als het gemiddelde van deze waarden meer dan $0,002\text{ }^{\circ}\text{C}$ verschilt van het vriespunt van de standaardoplossing, ijk de cryoscoop dan opnieuw zoals beschreven in punt 6.

Voer de routinecontrole van de ijking ten minste elk uur uit bij continu gebruik van de cryoscoop. Houd rekening met de aanwijzingen van de fabrikant.

8.3. Bepaling van het vriespunt van de melk

Keer en draai de fles met het monster voorzichtig verscheidene malen om om de inhoud te mengen. Een monster mag nooit zo heftig worden geschud dat lucht wordt ingeslagen.

Giet $2,5 \pm 0,1$ ml melk in een schone en droge monsterbuis en verwijder een eventuele overmaat met een pipet. Zorg ervoor dat de sonde en de roerstaaf schoon en droog zijn en veeg deze zo nodig van onder naar boven zorgvuldig droog met zacht, schoon en niet pluizend papier.

Plaats de monsterbuis in de geijekte cryoscoop volgens de aanwijzingen van de fabrikant. De melk zal afgekoeld worden en binnen $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ van een door de fabrikant opgegeven temperatuur zal het bevroren beginnen.

(Bij sommige automatische instrumenten kan deze temperatuur digitaal worden afgelezen; bij handbediende instrumenten kan de noodzakelijke precisie worden bereikt door te controleren of het bevroren begint wanneer de wijzer of haarlijn van de galvanometer samenvalt met het juiste merkteken.)

Laat, als om welke reden dan ook het bevroren begint vóór of na het opgegeven temperatuurgebied, de proef vervallen en herhaal de proef met een andere te onderzoeken hoeveelheid melk. Als het monster voor de herhaalde proef ook vóór de opgegeven temperatuur bevroert, moet nog een hoeveelheid van het monster verwarmd worden tot $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vijf minuten op die temperatuur worden gehouden om kristallijn vet te laten smelten.

Koel dan weer tot de onderzoektemperatuur en onderzoek onmiddellijk. De temperatuur van de melk zal na het begin van het bevroren snel stijgen tot een waarde die enige tijd vrijwel constant blijft en zal daarna weer beginnen te dalen. Het vriespunt komt overeen met de hoogste bereikte temperatuur in deze periode en deze waarde dient te worden genoteerd.

Opmerking

Van monster tot monster zal er een verschil zijn in de periode met constante temperatuur en in de tijd tussen het begin van het bevroren en het bereiken van de hoogste temperatuur: deze periode en deze tijd zullen voor water en standaard natriumchloride-oplossingen aanzienlijk korter zijn dan voor melk. Het is van essentieel belang dat de hoogste temperatuur wordt vastgesteld.

Verwijder, wanneer de meting tot voldoening is uitgevoerd, de buis, spoel met water, droog de thermistorsonde en roerstaaf dan van onder naar boven met zacht, schoon en niet pluizend papier en voer een dublobepaling uit met een volgende hoeveelheid van het monster melk.

Als het verschil tussen de geconstateerde vriespunten groter is dan de vastgelegde herhaalbaarheidswaarde ($0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$), voer dan een dublobepaling uit met een nieuw proefmonster. Als het verschil tussen die twee bepalingen niet groter is dan $0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$, moeten de betrokken vriespuntwaarden worden genoteerd en worden gebruikt voor de berekening van het eindresultaat.

8.4. Koelen van de sonde

Zet na gebruik van het instrument een lege monsterbuis in de monsterhouder en laat het meetgedeelte zakken om de sonde koel te houden. (Bij bepaalde uitvoeringen van de cryoscoop kan dit wellicht niet; het is in zulke gevallen van belang ervoor te zorgen dat de sonde voldoende gekoeld is vóór het uitvoeren van metingen, bij voorbeeld door verscheidene dummybepalingen uit te voeren tot conforme afleeswaarden worden verkregen.)

9. Weergave van de resultaten

9.1. Berekening

Bereken het gemiddelde van de vriespuntwaarden verkregen uit goede duplobepalingen afgerond op de derde decimaal, als uit de routinecontrole van de ijking is gebleken dat deze goed was.

Als de som van twee goede duplowaarden een oneven getal is, moet het gemiddelde worden afgerond op de naastliggende even waarde volgens het voorbeeld hieronder:

Vriespunt (°C)

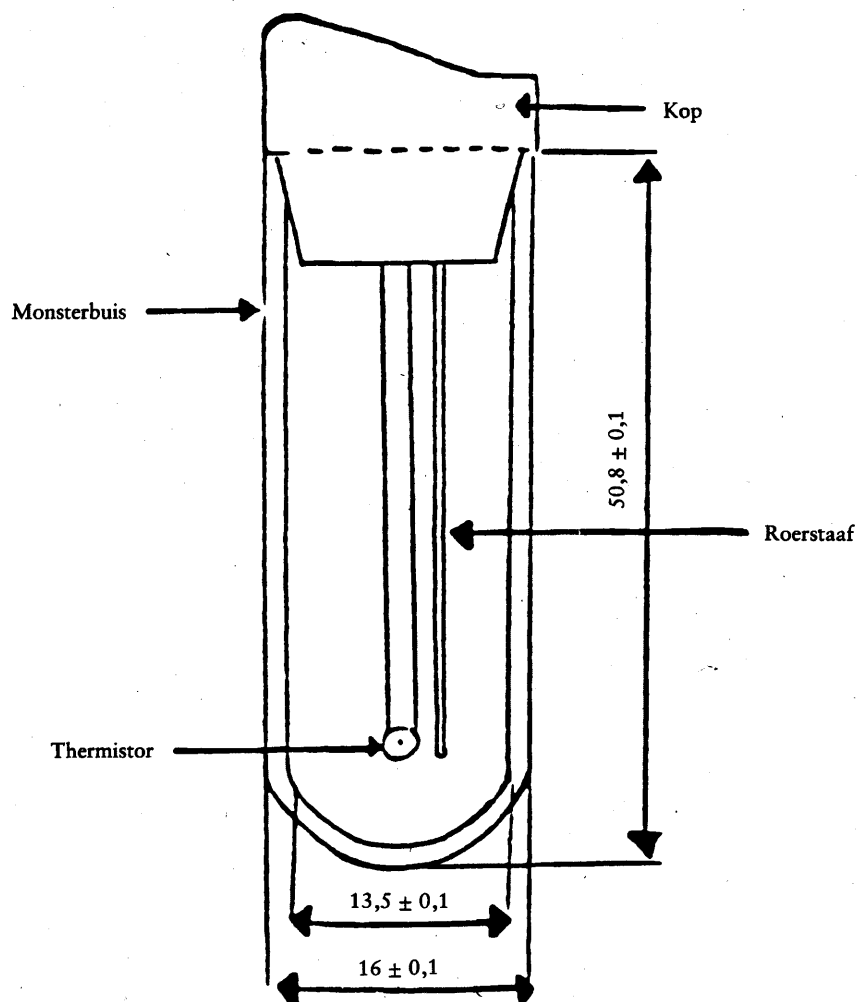
Duplowaarden		Gemiddelde
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

9.2. Precisie

9.2.1. Herhaalbaarheid (r): 0,004 °C.

9.2.2. Reproduceerbaarheid (R): 0,006 °C.

Detail van de thermistorcryoscoop in punt 4.1 (stand van monsterbuis ten opzichte van de thermistor en roerstaaf)



Alle afmetingen in mm

II. BEPALING VAN DE FOSFATASEACTIVITEIT

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de referentiemethode ter bepaling van de fosfataseactiviteit in gepasteuriseerde melk.

2. Definitie

2.1. De *fosfataseactiviteit* is een maat voor de hoeveelheid actieve alkalische fosfatase in het produkt, uitgedrukt als de hoeveelheid fenol, in microgram, die onder de in de methode beschreven omstandigheden door 1 ml gepasteuriseerde melk wordt vrijgemaakt.

2.2. Alle melk met een fosfataseactiviteit lager dan 4 µg/ml wordt als fosfatase-negatief beschouwd.

3. Principe

De fosfataseactiviteit wordt bepaald aan de hand van de hoeveelheid fenol die vrijgemaakt wordt uit het aan het monster toegevoegde dinatriumfenylfosfaat. Het vrijgemaakte fenol reageert met dibroomchinonchlorimide onder de vorming van dibroomindofenol (met een blauwe kleur) dat bij 610 nm colorimetrisch wordt bepaald. Er wordt een vergelijking gemaakt met een monster waarin het fosfatase-enzym vernietigd is.

4. Reagentia

4.1. Bariumboraat-hydroxidebuffer

4.1.1. Los 50,0 g bariumhydroxide ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) (carbonaatvrij) op in water en vul aan tot 1 000 ml.

4.1.2. Los 22,0 g boorzuur (H_3BO_3) op in water en vul aan tot 1 000 ml.

4.1.3. Verwarm 500 ml van elke oplossing tot 50 °C, meng de oplossingen, roer, koel snel af tot ongeveer 20 °C, breng zo nodig de pH op $10,6 \pm 0,1$ door toevoeging van oplossing in punt 4.1.1 of punt 4.1.2. Filtreer. Bewaar de oplossing in een hermetisch afgesloten fles.

4.1.4. Verdun de oplossing voor gebruik met een zelfde volume water.

4.2. Kleurvormingsbuffer

Los 6,0 g natriummetaboraat (NaBO_2) of 12,6 g ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 20,0 g natriumchloride (NaCl) op in water en vul aan tot 1 000 ml.

4.3. Verdunde kleurbuffer

Verdun 10 ml van het kleurreagens (punt 4.2) tot 100 ml met water.

4.4. Gebufferd substraat

Los 0,1 g gedroogd fenolvrij dinatriumfenylfosfaat op in 100 ml buffer (punt 4.1.3) of los 0,5 g dinatriumfenylfosfaat op in 4,5 ml kleurvormingsbuffer (punt 4.2), voeg twee druppels BQC-oplossing (punt 4.6) toe en laat het 30 minuten staan bij kamertemperatuur. Extraheer de eventueel gevormde kleur met 2,5 ml butanol-1 en laat dit staan totdat de butanol-1 zich afscheidt. Verwijder de butanol-1 en gooi deze weg. Herhaal zo nodig deze extractie.

De oplossing kan enkele dagen in een koelkast worden bewaard; voer vóór gebruik opnieuw de kleurreactie uit en extraheer. Bereid direct vóór gebruik het gebufferde substraat door 1 ml van deze oplossing tot 100 ml te verdunnen met de bariumboraat-hydroxidebuffer (punt 4.1.3).

4.5. Zink-koperprecipitaans

Los 3,0 g zinksulfaat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 0,6 g koper(II)sulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) op in water en vul aan tot 100 ml.

4.6. 2,6-dibroomchinonchlorimide-oplossing (BQC-oplossing)

Los 40 ± 1 mg 2,6-dibroomchinonchlorimide (BQC) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$) op in 10 ml 96 % (v/v) ethanol.

Bewaar de oplossing in een donkergekleurde fles in de koelkast. Gooi de oplossing weg als deze verkleurd of meer dan een maand oud is.

4.7. *Koper(II)sulfaatoplossing*

Los 0,05 g koper(II)sulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) op in water en vul aan tot 100 ml.

4.8. *Standaard-fenoloplossing*

4.8.1. Weeg 200 ± 2 mg zuiver watervrij fenol af, breng dit over in een maatkolf van 100 ml, vul aan met water tot de maatstreep. Deze voorraadoplossing blijft gedurende verscheidene maanden stabiel in de koelkast.

4.8.2. Verdun 10 ml van de voorraadoplossing met water tot 100 ml en meng. 1 ml bevat $200 \mu\text{g}$ fenol.

5. **Apparatuur en glaswerk**

Opmerkingen

- a) Al het glaswerk, de stoppen en de hulpmiddelen voor bemonstering moeten zorgvuldig worden gereinigd. Aanbevolen wordt met pas gekookt gedistilleerd water te spoelen of te stomen.
- b) Bepaalde soorten stoppen van kunststof kunnen verontreiniging met fenol veroorzaken en mogen niet worden gebruikt.

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting en in het bijzonder:

5.1. *Analytische balans*

5.2. *Waterbad*, instelbaar op 37 ± 1 °C.

5.3. *Spectrofotometer*, geschikt voor metingen bij een golflengte van 610 nm.

5.4. *Reageerbuisen*, 16 of 18 mm $\times$ 150 mm, bij voorkeur met een merkstreep op 5 en 10 ml.

5.5. *Pipetten*

5.6. *Glazen trechters* van een geschikte afmeting, bij voorbeeld met een diameter van 5 cm.

5.7. *Vouwfilters* met een diameter van ten minste 9 cm en een matige filtreersnelheid.

5.8. *Maatkolven* voor de bereiding van de standaardoplossingen.

6. **Werkwijze**

Opmerkingen

- a) Vermijd direct zonlicht bij de bepaling.
- b) Besmetting met speeksel of transpiratievocht kan vals-positieve resultaten geven en moet dus worden vermeden. Daarom moet bijzondere aandacht worden besteed aan het pipetteren.

6.1. *Voorbehandeling van het monster*

6.1.1. Voer het onderzoek bij voorkeur onmiddellijk na de bemonstering uit. Bewaar het monster anders in de koelkast, maar niet langer dan twee dagen.

6.2. *Te onderzoeken hoeveelheid analysemonster*

Pipetteer in elke van twee reageerbuisen (punt 5.4) 1 ml van het monster, waarbij één buis ter controle of als blanco dient.

6.3. *Bepaling*

6.3.1. Verwarm de blanco gedurende twee minuten in kokend water; bedek de reageerbuis en de beker kokend water met aluminiumfolie om ervoor te zorgen dat de hele buis wordt verwarmd. Koel snel af tot kamertemperatuur.

6.3.2. Behandel blanco en monster gedurende de rest van de methode op gelijke wijze. Voeg 10 ml van de gebufferde substraatoplossing (punt 4.4) toe en meng.

- 6.3.3. Bebroed de monsters onmiddellijk gedurende 60 minuten in het waterbad (punt 5.2) en meng af en toe de inhoud (ten minste viermaal).
- 6.3.4. Verhit gedurende twee minuten in kokend water op dezelfde wijze als in punt 6.3.1. Koel snel af tot kamertemperatuur.
- 6.3.5. Voeg aan elke buis 1 ml van het zink-koperprecipitaat (punt 4.5) toe en meng grondig.
- 6.3.6. Filtreer door droog filterpapier, giet de eerste 2 ml weg, filtreer zo nodig nogmaals totdat het filtraat volkomen helder is en verzamel 5 ml in een reageerbuis.
- 6.3.7. Voeg 5 ml van de kleurvormingsbuffer (punt 4.2) toe.
- 6.3.8. Voeg 0,1 ml BQC-oplossing (punt 4.6) toe, meng en laat gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur staan.
- 6.3.9. Meet in de spectrofotometer (punt 5.3) de absorptie ten opzichte van de controle of blanco bij een golflengte van 610 nm.
- 6.3.10. Herhaal de bepaling met een voldoende verdund monster als de absorptie volgens punt 6.3.9 groter is dan de absorptie van de standaard met 20 µg fenol per buis, gemeten volgens punt 6.4.4.
Bereid deze verdunde oplossing door één volumedeel van het te onderzoeken monster te mengen met een passende hoeveelheid van een deel van hetzelfde monster dat zorgvuldig is gekookt om de fosfatase te inactiveren.
- 6.4. *Opstelling van de ijcurve*
- 6.4.1. Bereid, uitgaande van de standaardfenoloplossing (punt 4.8.2), een serie verdunningen met 0 (controle of blanco), 2, 5, 10 of 20 µg fenol per milliliter en pipetteer in vijf verschillende reageerbuizen 1 ml water en 1 ml van de vier fenolhoudende ijkoplossingen.
- 6.4.2. Voeg aan elke reageerbuis 1 ml koper(II)sulfaatoplossing (punt 4.7), 5 ml verdunde kleurbuffer (punt 4.3), 3 ml water en 0,1 ml BQC-oplossing (punt 4.6) toe; meng.
- 6.4.3. Laat gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur staan.
- 6.4.4. Meet in de spectrofotometer de absorptie ten opzichte van de controle of blanco bij een golflengte van 610 nm.
- 6.4.5. Bereken met de methode van de kleinste kwadraten de regressielijn uit de verkregen absorptiewaarden (punt 6.4.4) voor elke toegevoegde hoeveelheid fenol (punt 6.4.1).
7. **Weergave van de resultaten**
- 7.1. *Berekening en formule*
- 7.1.1. Bereken uit de afgelezen absorptie (punt 6.3.9) de hoeveelheid fenol met behulp van de verkregen regressielijn (punt 6.4.5).
- 7.1.2. Bereken de fosfataseactiviteit, uitgedrukt in microgram fenol per milliliter gepasteuriseerde melk met de volgende formule:
$$\text{Fosfataseactiviteit} = 2,4 \times A \times D$$

waarin
A = de hoeveelheid fenol in microgram volgens punt 7.1.1;
D = de verdunningsfactor van de verdunning volgens punt 6.3.10 (in het geval dat niet is verdund, geldt D = 1).
De factor 2,4 is de verdunningsfactor ($5/12$) van 1 ml monster — zie punt 6.2 in combinatie met de punten 6.3.2, 6.3.5 en 6.3.6.
- 7.2. *Precisie*
- 7.2.1. Herhaalbaarheid (r): 2 µg fenol/ml.
- 7.2.2. Reproduceerbaarheid (R): 3 µg (voorlopig) fenol/ml.
- 7.2.3. Als een verdunning wordt toegepast volgens punt 6.3.10, heeft de in de punten 7.2.1 en 7.2.2 vermelde grenswaarde betrekking op de resultaten van het verdunde monster.

III. BEPALING VAN DE PEROXIDASEACTIVITEIT

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de referentiemethode voor de bepaling van de aanwezigheid of afwezigheid van het enzym peroxidase in melk, met het oog op controle van de pasteurisatie.

2. Definitie

Positieve peroxidase-reactie

Als de melk op de juiste wijze is gepasteuriseerd, ontstaat binnen 30 seconden na menging een blauwe kleur.

Negatieve peroxidase-reactie

Er ontstaat geen kleur binnen 30 seconden na de menging.

3. Principe

Het enzym peroxidase ontbindt waterstofperoxide. De vrijgekomen atomaire zuurstof oxideert het kleurloze 1,4-fenyleendiamine tot het paarse indofenol (reactie van Storch). De kleurintensiteit is evenredig met de enzymconcentratie.

4. Reagentia

4.1. 1,4-fenyleendiamine-oplossing

Los 2 g 1,4-fenyleendiamine ($C_6H_8N_2$) op in warm water (50 °C) en vul aan tot 100 ml. Bewaar de oplossing in een donkerbruine fles met een glazen stop op een koele donkere plaats. Na bereiding vormt een oplossing van 1,4-fenyleendiamine in één tot twee dagen een neerslag: zij moet dan worden weggegooid.

4.2. Waterstofperoxideoplossing

Verdun 9 ml 30 % waterstofperoxide in water tot 100 ml. Voeg 1 ml geconcentreerd zwavelzuur per liter oplossing toe ter stabilisering.

De waterstofperoxideoplossing is een maand stabiel als deze op een koele, droge plaats wordt bewaard in een fles met glazen stop, waardoor elk contact met organische verbindingen wordt voorkomen.

5. Werkwijze

5.1. Breng 5 ml van het melkmonster in een schone reageerbuis met geschikte sluiting.

5.2. Voeg 5 ml 1,4-fenyleendiamineoplossing (punt 4.1) toe.

5.3. Voeg twee druppels waterstofperoxideoplossing (punt 4.2) toe.

5.4. Bekijk binnen 30 seconden na het mengen of de kleur is ontstaan. Als de blauwe kleur later ontstaat dan 30 seconden na toevoeging van de reagentia, geeft de reactie geen uitsluitsel.

IV. BEPALING VAN HET AANTAL MICRO-ORGANISMEN — TELPLAATMETHODE BIJ 30 °C

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de referentiemethode voor de bepaling van het aantal micro-organismen door middel van een telplaatmethode bij 30 °C.

De methode is toepasbaar bij rauwe melk, gepasteuriseerde melk en gedurende 15 dagen bij 30 °C gepreïncubeerde UHT en gesteriliseerde melk.

2. Definitie

De term „micro-organismen” betekent: organismen die bij aërobe bebroeding onder de beschreven omstandigheden telbare kolonies vormen.

3. Principe

Een bekend volume van de melk wordt in petrischalen gemengd met het voedingsmedium en gedurende 72 uur bij 30 °C bebroed. De kolonies worden geteld en het aantal micro-organismen per 1 ml rauwe of gepasteuriseerde melk of per 0,1 ml gepreïncubeerde UHT of gesteriliseerde melk wordt berekend.

4. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting en in het bijzonder:

4.1. Apparatuur

4.1.1. Hete-luchtstoof, instelbaar op 170 tot 175 °C.

4.1.2. Autoclaaf, instelbaar op 121 ± 1 °C.

4.1.3. Broedstoof, waarin op elk plaats een temperatuur van 30 ± 1 °C kan worden gehandhaafd.

4.1.4. pH-meter, met temperatuurcompensatie en nauwkeurig tot op $\pm 0,1$ pH-eenheid.

4.1.5. Waterbad, instelbaar op 45 ± 1 °C.

4.1.6. Loep, vergroting 2-4×.

4.1.7. Loep, vergroting 8-10×.

4.1.8. Telapparaat

4.1.9. Menger, voor het mengen van 1 ml van het melkmonster of decimale verdunningen daarvan met 9 ml verdunningsvloeistof, werkend door middel van excentrische rotatie van de inhoud van de reageerbuis.

4.2. Glaswerk

4.2.1. Reageerbuizen, met geschikte doppen en groot genoeg voor 10 ml van de eerste verdunning of van volgende decimale verdunningen en voldoende kopruimte om te mengen.

4.2.2. Kolven, met een inhoud van 150 tot 250 ml of buizen van ongeveer 20 ml om het voedingsmedium in te bewaren.

4.2.3. Pipetten (met wattenprop), van glas of steriel synthetisch materiaal met gave punt, een nominale inhoud van 1 ml en een uitstroomopening van 1,75 tot 3 mm.

4.2.4. Petrischalen, van helder, ongekleurd glas of steriel synthetisch materiaal met een inwendige diameter van ongeveer 90—100 mm. De inwendige hoogte moet ten minste 10 mm zijn. De bodem mag geen onregelmatigheden hebben die bij het tellen van de kolonies kunnen storen.

4.2.5. Sterilisatie van glaswerk

Glaswerk moet volgens één van de volgende methoden worden gesteriliseerd:

a) door verhitting in een hete-luchtstoof (punt 4.1.1) gedurende ten minste 1 uur op 170 tot 175 °C;

b) door verhitting in een autoclaaf (punt 4.1.2) gedurende ten minste 20 minuten op 121 ± 1 °C.

In de autoclaaf moet voor een voldoende stoomverdeling worden gezorgd; als het glaswerk bij voorbeeld in bakken wordt gesteriliseerd, mogen deze niet volledig worden afgesloten en moeten de doppen van de kolven loszitten.

Het in de autoclaaf gesteriliseerde glaswerk moet worden gedroogd door afzuiging van de stoom.

Pipetten moeten in een hete-luchtstoof worden gesteriliseerd (punt 4.1.1).

5. Voedingsmedium — „Milk Plate Count Agar”

5.1. Samenstelling

Gistextract	2,5 g
Trypton	5,0 g
D(+) -glucose of dextrose	1,0 g
Magere-melkpoeder	1,0 g
Agar	10 tot 15 g, afhankelijk van de geleereigenschappen van de gebruikte agar
Water	1 000 ml.

Het magere-melkpoeder moet vrij zijn van groeiremmende stoffen. Dit moet worden vastgesteld door vergelijkende proeven met magere-melkpoeder waarvan bekend is dat het geen groeiremmende stoffen bevat.

Bereiding

Suspendeer en los de bestanddelen in de volgende volgorde in het water op: gistextract, trypton, glucose en ten slotte magere-melkpoeder. Verwarming van de suspensie zal het oplossen versnellen. Voeg de agar toe en breng onder voortdurend roeren aan de kook totdat de agar volledig is opgelost, of stoom gedurende ongeveer 30 minuten.

Filtreer zo nodig door filtreerpapier.

Controleer de pH met een pH-meter (punt 4.1.4) en corrigeer de pH zo nodig met een oplossing van natriumhydroxide of zoutzuur (ten minste 0,1 mol/l), zodat na sterilisatie de pH $6,9 \pm 0,1$ gedraagt bij 25 °C.

5.2. Verdeling, sterilisatie en bewaring van het voedingsmedium

Verdeel het medium (punt 5.1) in hoeveelheden van 100 tot 150 ml in kolven of van 12 tot 15 ml in buizen (punt 4.2.2). Sluit kolven en buizen af.

Steriliseer gedurende 15 minuten in de autoclaaf (punt 4.1.2) bij 121 ± 1 °C.

Controleer de pH van het medium.

Bewaar het medium, als het niet direct wordt gebruikt, in het donker bij een temperatuur tussen 1 en 5 °C, doch niet langer dan één maand na de bereiding.

5.3. In de handel verkrijgbaar gedroogd voedingsmedium

Het voedingsmedium (punt 5.1) kan worden bereid uit in de handel verkrijgbaar gedroogd medium. Volg de aanwijzingen van de fabrikant op, maar voeg vóór het oplossen magere melkpoeder toe als dit er geen bestanddeel van vormt.

Stel de pH in op $6,9 \pm 0,1$ bij 25 °C, zoals in punt 5.1 is beschreven, en verdeel, steriliseer en bewaar het medium volgens punt 5.2.

6. Verdunningsvloeistoffen

6.1. Pepton/zoutoplossing

Samenstelling

Pepton	1,0 g
Natriumchloride (NaCl)	8,5 g
Water	1 000 ml.

Bereiding

Los de bestanddelen op in water en verwarm zo nodig.

Controleer de pH met een pH-meter (punt 4.1.4) en stel zo nodig de pH in zodat deze na sterilisatie $7,0 \pm 0,1$ is bij 25 °C; gebruik hiervoor een oplossing (ten minste 0,1 mol/l) van natriumhydroxide of zoutzuur.

6.2. *Verdeling, sterilisatie en bewaring van de verdunningsvloeistof*

Verdeel de verdunningsvloeistof (punt 6.1) in reageerbuizen (punt 4.2.1), zodat na sterilisatie elke buis een hoeveelheid van $9,0 \pm 0,2$ ml verdunningsvloeistof bevat. Sluit de buizen af.

Steriliseer deze gedurende 15 minuten in de autoclaaf (punt 4.1.2) op 121 ± 1 °C.

Controleer de pH van de verdunningsvloeistof.

Bewaar de verdunningsvloeistof, als deze niet direct wordt gebruikt, in het donker bij een temperatuur tussen 1 en 5 °C, maar niet langer dan één maand na de bereiding.

6.3. *In de handel verkrijgbare gedroogde verdunningsvloeistoffen.*

De verdunningsvloeistof (punt 6.1) kan worden bereid uit in de handel verkrijgbare gedroogde tabletten of poeders. Volg de aanwijzingen van de fabrikant. Stel de pH in zoals in punt 6.1 is beschreven en verdeel, steriliseer en bewaar de verdunningsvloeistoffen volgens punt 6.2.

7. **Werkwijze**

7.1. *Smelten van het medium*

Smelt vóór het begin van het microbiologische onderzoek de benodigde hoeveelheid van het medium snel en koel het medium tot 45 ± 1 °C in een waterbad (punt 4.1.5).

7.2. *Voorbehandeling van het melkmonster*

Meng de melk grondig om de micro-organismen zo gelijkmatig mogelijk te verdelen door de monsterpot snel 25 keer om te keren. Vermijd de vorming van schuim en laat ontstaan schuim oplossen. Tussen het mengen en het nemen van een te onderzoeken hoeveelheid mogen niet meer dan drie minuten verstrijken.

7.3. *Bereiding van de eerste verdunning (10^{-1}) (rauwe en gepasteuriseerde melk)*

Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml van het monster (punt 7.2) rauwe of gepasteuriseerde melk over in 9 ml verdunningsvloeistof (punt 6.1) en vermijd daarbij contact tussen pipet en verdunningsvloeistof. De temperatuur van de verdunningsvloeistof moet ongeveer gelijk zijn aan die van het monster melk. Meng deze eerste verdunning gedurende 5 tot 10 seconden zorgvuldig met de menger (punt 4.1.9).

Op deze wijze wordt een eerste verdunning van 10^{-1} verkregen.

7.4. *Bereiding van verdere decimale verdunningen (rauwe en gepasteuriseerde melk)*

Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml van de eerste verdunning (punt 7.3) over in 9 ml verdunningsvloeistof (punt 6.1) volgens de aanwijzingen in punt 7.3.

Zo wordt de 10^{-2} -verdunning verkregen.

Herhaal deze handelingen om verdere decimale verdunningen te maken totdat naar verwachting een geschikt aantal micro-organismen wordt verkregen (punt 8.1.1).

7.5. *Enten van de petrischalen*

7.5.1. **Rauwe melk:** Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml van het monster en/of de gewenste verdunning in een schaal (punt 4.2.4). Ten minste twee verdunningen moeten worden onderzocht. Ent met elke gekozen verdunning (punt 8.1.1) één schaal.

7.5.2. **Gepasteuriseerde melk:** Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml van het monster en/of de gewenste verdunning in een schaal (punt 4.2.4). Ten minste twee verdunningen moeten worden onderzocht. Ent met elke gekozen verdunning (punt 8.1.1) twee schalen.

7.5.3. **UHT- en gesteriliseerde melk** (onderzocht na 15 dagen bebroeden bij 30 °C — bijlage A, hoofdstuk VII, punt 5, van Richtlijn 85/397/EEG).

Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 0,1 ml van het melkmonster (punt 7.2) over in een schaal (punt 4.2.4). Ent twee schalen.

7.6. *Gieten*

Giet 15 tot 18 ml medium (punt 7.1) in elke geënte schaal.

Meng, na het gieten, direct door de petrischaal voldoende te zwenken om na bebroeding gelijkmatig verdeelde kolonies te krijgen.

Tussen de voorbehandeling van het monster melk en, afhankelijk van de soort melk, het mengen van de te onderzoeken hoeveelheid of de verdunning met het medium mogen niet meer dan 15 minuten verlopen.

Laat stollen op een schoon en koel horizontaal oppervlak.

7.7. *Bebroeden van petrischalen*

Breng de schalen in de broedstoof (punt 4.1.3). Bebroed de schalen met de bodem naar boven. Zet niet meer dan zes schalen op elkaar. Gestapelde schalen mogen elkaar en de wand en bovenkant van de stoof niet raken.

Bebroed 72 ± 2 uur bij 30 ± 1 °C.

7.8. *Telling van de kolonies*

Tel de kolonies in de platen met niet meer dan 300 kolonies.

Onderzoek de platen in indirect licht. Ter vereenvoudiging van het tellen kan een geschikte loop (punt 4.1.6) en/of een telapparaat (punt 4.1.8) worden gebruikt. Verwar bij het tellen geen vaste deeltjes in de schalen met zeer kleine kolonies. Onderzoek waar nodig twijfelachtige deeltjes zorgvuldig met een sterker vergrotende loop (punt 4.1.7) om kolonies van vreemde deeltjes te kunnen onderscheiden.

Spreidende kolonies worden als een enkele kolonie beschouwd. Tel, als minder dan een kwart van de plaat door kolonies is overgroeid, de kolonies op het resterende deel van de plaat en herleid dit resultaat tot de totale oppervlakte van de plaat. Laat de plaat buiten beschouwing als meer dan een kwart van de plaat door kolonies is overgroeid.

8. *Berekening en weergave van de resultaten*8.1. *Rauwe en gepasteuriseerde melk*

8.1.1. Gebruik de uitkomsten van alle platen met tussen de tien en 300 kolonies (punten 8.1.3 en 8.1.4).

8.1.2. Het aantal micro-organismen per ml rauwe of gepasteuriseerde melk wordt gegeven door de formule:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

waarin:

$\sum C$ = de som van alle volgens punt 8.1.1 getelde kolonies,

$(n_1 + 0,1 n_2) d$ = het volume van het in de schalen gebrachte monster, waarin

n_1 = het aantal getelde platen met de eerste verdunning,

n_2 = het aantal getelde platen met de tweede verdunning,

d = de verdunningsfactor waarbij de eerste telling werd uitgevoerd.

Het getal wordt afgerond op de eerste twee cijfers. Indien het af te ronden cijfer een 5 is, rond dan zo af dat het cijfer links ervan even blijft of wordt.

Voorbeeld (gepasteuriseerde melk):

Verdunning 10^{-2} : 278 en 290 kolonies

Verdunning 10^{-3} : 33 en 28 kolonies

$$\begin{aligned} \text{Aantal/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4. \end{aligned}$$

- 8.1.3. Als alle tellingen een lagere uitkomst geven dan 10, geef dan het aantal micro-organismen per millimeter op als „minder dan $10 \times d$ per ml”; „d” is hierbij de reciproke van de laagste verdunningsfactor.
- 8.1.4. Als alle tellingen hoger zijn dan 300 kolonies, maar telling mogelijk is, bereken dan een geschat aantal en vermenigvuldig dat met de reciproke van de verdunningsfactor. Rapporteer het resultaat als „geschat aantal micro-organismen per ml”.
- 8.2. *UHT- en gesteriliseerde melk*
- Als meer dan tien kolonies per plaat met 0,1 ml worden geteld, is niet aan de normen van Richtlijn 85/397/EEG voldaan.
9. **Precisie**
- Er zijn geen resultaten beschikbaar van internationaal erkende gezamenlijke onderzoeken.

V. BEPALING VAN HET AANTAL MICRO-ORGANISMEN — TELPLAATMETHODE BIJ 21 °C

1. Onderwerp en toepassingsgebied

De procedure beschrijft de referentiemethode voor de bepaling van het aantal micro-organismen door middel van een telplaatmethode bij 21 °C, en wel in gepasteuriseerde melk na vijf dagen bebroeding van de melk bij 6 °C, om de mate van besmetting te bepalen van de gepasteuriseerde melk met psychrotrofe micro-organismen die zich in melk bij 6 °C vermenigvuldigen.

2. Definitie

De term „micro-organismen” betekent: organismen die bij aërobe bebroeding onder de beschreven omstandigheden telbare kolonies vormen.

3. Principe

De gepasteuriseerde melk wordt vijf dagen bij 6 °C bebroed. Een bekend volume van de melk wordt in petrischalen gemengd met het voedingsmedium en gedurende 25 uur bij 21 °C bebroed. De kolonies worden geteld en het aantal micro-organismen per 1 ml gepasteuriseerde melk wordt berekend.

4. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting, en in het bijzonder:

4.1. Apparatuur

4.1.1. Hete luchtstoof, instelbaar op 170 °C tot 175 °C.

4.1.2. Autoclaaf, instelbaar op 121 ± 1 °C.

4.1.3. Broedstoven, waarin op elke plaats een temperatuur kan worden gehandhaafd van

a) $6 \pm 0,2$ °C

b) 21 ± 1 °C.

4.1.4. pH-meter, met temperatuurcompensatie en nauwkeurig tot op $\pm 0,1$ pH-eenheid.

4.1.5. Waterbad, instelbaar op 45 ± 1 °C.

4.1.6. Loep, vergroting 2-4 $\times$.

4.1.7. Loep, vergroting 8-10 $\times$.

4.1.8. Telapparaat

4.1.9. Menger, voor het mengen van 1 ml van het melkmonster of decimale verdunningen daarvan met 9 ml verdunningsvloeistof, werkend door middel van excentrische rotatie van de inhoud van de reageerbuis.

4.2. Glaswerk

4.2.1. Reageerbuizen, met geschikte doppen en groot genoeg voor 10 ml van de eerste verdunning of van volgende decimale verdunningen en voldoende kopruimte om te mengen.

4.2.2. Kolven, met een inhoud van 150 tot 250 ml of buizen van ongeveer 20 ml om het voedingsmedium in te bewaren.

4.2.3. Pipetten (met wattenprop), van glas of steriel synthetisch materiaal met gave punt, een nominale inhoud van 1 ml en een uitstroombuiging van 1,75 tot 3 mm.

4.2.4. Petrischalen, van helder, ongekeurd glas of steriel synthetisch materiaal met een inwendige diameter van ongeveer 90 tot 100 mm. De inwendige hoogte moet ten minste 10 mm zijn. De bodem mag geen onregelmatigheden hebben die bij het tellen van de kolonies kunnen storen.

4.2.5. Sterilisatie van glaswerk

Glaswerk moet volgens één van de volgende methoden worden gesteriliseerd:

a) door verhitting in een hete-luchtstoof (punt 4.1.1) gedurende ten minste één uur op 170 tot 175 °C;

b) door verhitting in een autoclaaf (punt 4.1.2) gedurende ten minste 20 minuten op 121 ± 1 °C.

In de autoclaaf moet voor een goede stoomverdeling worden gezorgd; als het glaswerk bij voorbeeld in bakken wordt gesteriliseerd, mogen deze niet worden afgesloten en moeten de doppen van de kolven loszitten.

Het in de autoclaaf gesteriliseerde glaswerk moet worden gedroogd door afzuiging van de stoom.

Pipetten moeten in een hete-luchtstoof worden gesteriliseerd (punt 4.1.1).

5. Voedingsmedium — „Milk Plate Count Agar”

5.1. Samenstelling

Gistextract	2,5 g
Trypton	5,0 g
D(+) -glucose of dextrose	1,0 g
Magere melkpoeder	1,0 g
Agar	10 tot 15 g, afhankelijk van de geleereigenschappen van de gebruikte agar
Water	1 000 ml.

Het magere-melkpoeder moet vrij zijn van groeiremmende stoffen. Dit moet worden vastgesteld door vergelijkende proeven met magere-melkpoeder waarvan bekend is dat het geen groeiremmende stoffen bevat.

Bereiding

Suspendeer en los de bestanddelen in de volgende volgorde in het water op: gistextract, trypton, glucose en ten slotte magere-melkpoeder. Verwarming van de suspensie zal het oplossen versnellen. Voeg de agar toe en breng onder voortdurend roeren aan de kook totdat de agar volledig is opgelost, of stoom gedurende ongeveer 30 minuten.

Filtreer zo nodig door filtreerpapier.

Controleer de pH met een pH-meter (punt 4.1.4) en corrigeer de pH zo nodig met een oplossing (ten minste 0,1 mol/l) van natriumhydroxide of zoutzuur, zodat na sterilisatie de pH $6,9 \pm 0,1$ bij 25 °C bedraagt.

5.2. Verdeling, sterilisatie en bewaring van het voedingsmedium

Verdeel het medium (punt 5.1) in hoeveelheden van 100 tot 150 ml in kolven of van 12 tot 15 ml in buizen (punt 4.2.2). Sluit kolven en buizen af.

Steriliseer gedurende 15 minuten in de autoclaaf (punt 4.1.2) bij 121 ± 1 °C.

Controleer de pH van het medium.

Bewaar het medium, als het niet direct wordt gebruikt, in het donker bij een temperatuur tussen 1 en 5 °C, doch niet langer dan één maand na de bereiding.

5.3. In de handel verkrijgbaar gedroogd voedingsmedium

Het voedingsmedium (punt 5.1) kan worden bereid uit in de handel verkrijgbaar gedroogd medium. Volg de aanwijzingen van de fabrikant op, maar voeg vóór het oplossen magere-melkpoeder toe als dit er geen bestanddeel van vormt.

Stel de pH in op $6,9 \pm 0,1$ bij 25 °C, zoals in punt 5.1 is beschreven, en verdeel, steriliseer en bewaar het medium volgens punt 5.2.

6. Verdunningsvloeistoffen

6.1. Pepton/zoutoplossing

Samenstelling

Pepton	1,0 g
Natriumchloride (NaCl)	8,5 g
Water	1 000 ml.

Bereiding

Los de bestanddelen op in water en verwarm zo nodig.

Controleer de pH met een pH-meter (punt 4.1.4) en corrigeer zo nodig de pH zodat deze na sterilisatie $7,0 \pm 0,1$ is bij 25 °C; gebruik hiervoor een oplossing (ten minste 0,1 mol/l) van natriumhydroxide of zoutzuur.

6.2. *Verdeling, sterilisatie en bewaring van de verdunningsvloeistof*

Verdeel de verdunningsvloeistof (punt 6.1) in reageerbuizen (punt 4.2.1), zodat na sterilisatie elke buis een hoeveelheid van $9,0 \pm 0,2$ ml verdunningsvloeistof bevat. Sluit de buizen af.

Steriliseer deze gedurende 15 minuten in de autoclaaf (punt 4.1.2) op 121 ± 1 °C.

Controleer de pH van de verdunningsvloeistof.

Bewaar de verdunningsvloeistof, als deze niet direct wordt gebruikt, in het donker bij een temperatuur tussen 1 en 5 °C, maar niet langer dan één maand na de bereiding.

6.3. *In de handel verkrijgbare gedroogde verdunningsvloeistoffen*

De verdunningsvloeistof (punt 6.1) kan worden bereid uit in de handel verkrijgbare gedroogde tabletten of poeders. Volg de aanwijzingen van de fabrikant op. Stel de pH in zoals dit in punt 6.1 is beschreven en verdeel, steriliseer en bewaar de verdunningsvloeistoffen volgens punt 6.2.

7. **Werkwijze**

7.1. *Smelten van het medium*

Smelt vóór het begin van het microbiologische onderzoek de benodigde hoeveelheid van het medium snel en koel het medium tot 45 ± 1 °C in een waterbad (punt 4.1.5).

7.2. *Voorbehandeling van het melkmonster*

7.2.1. Bebroed een ongeopend pak gepasteuriseerde melk of, als dat onmogelijk is, een representatief monster van ten minste 100 ml gedurende 120 ± 2 uur bij $6 \pm 0,5$ °C in een broedstof (punt 4.1.3, onder a)).

7.2.2. Meng na bebroeding de melk grondig om de micro-organismen zo gelijkmatig mogelijk te verdelen door de monsterpot snel 25 keer om te keren. Vermijd de vorming van schuim en laat ontstaan schuim oplossen. Tussen het mengen en het nemen van een te onderzoeken hoeveelheid mogen niet meer dan drie minuten verstrijken.

7.3. *Bereiding van de eerste verdunning (10^{-1})*

Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml van het monster (punt 7.2.2) over in 9 ml verdunningsvloeistof (punt 6.1) en vermijd daarbij contact tussen pipet en verdunningsvloeistof. De temperatuur van de verdunningsvloeistof moet ongeveer gelijk zijn aan die van het monster melk. Meng deze eerste verdunning gedurende 5 tot 10 seconden zorgvuldig met de menger (punt 4.1.9).

Op deze wijze wordt een eerste verdunning van 10^{-1} verkregen.

7.4. *Bereiding van verdere decimale verdunningen*

Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml van de eerste verdunning (punt 7.3) over in 9 ml verdunningsvloeistof (punt 6.1) volgens de aanwijzingen in punt 7.3.

Zo wordt de 10^{-2} verdunning verkregen.

Herhaal deze handelingen om verdere decimale verdunningen te maken totdat naar verwachting een geschikt aantal micro-organismen wordt verkregen (punt 8.1).

7.5. *Enten van de petrischalen*

Breng met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml van het monster en/of de gewenste decimale verdunning over in een schaal (punt 4.2.4). Ten minste twee verdunningen moeten worden onderzocht. Ent met elke gekozen verdunning twee schalen (punt 8.1).

7.6. *Gieten*

Giet ongeveer 15 tot 18 ml medium (punt 7.1) in elke geënte schaal.

Meng, na het gieten, direct door de petrischaal voldoende te zwenken om na bebroeding gelijkmatig verdeelde kolonies te krijgen.

Tussen het einde van de voorbehandeling van het melkmonster en het mengen van het inoculum met het medium mogen niet meer dan 15 minuten verlopen.

Laat stollen op een schoon en koel horizontaal oppervlak.

7.7. *Bebroeden van petrischalen*

Breng de schalen in de broedstoof (punt 4.1.3, onder b)). Bebroed de schalen met de bodem naar boven. Zet niet meer dan zes schalen op elkaar. Gestapelde schalen mogen elkaar en de wand en bovenkant van de stoof niet raken.

Bebroed 25 uur bij $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.8. *Telling van de kolonies*

Tel de kolonies in de petriplaten met niet meer dan 300 kolonies.

Onderzoek de platen in indirect licht. Ter vereenvoudiging van het tellen kan een geschikte loop (punt 4.1.6) en/of een telapparaat (punt 4.1.8) worden gebruikt. Verwar bij het tellen geen vaste deeltjes in de schalen met zeer kleine kolonies. Onderzoek waar nodig twijfelachtige deeltjes zorgvuldig met een sterker vergrotende loop (punt 4.1.7) om kolonies van vreemde deeltjes te kunnen onderscheiden.

Spreidende kolonies worden als een enkele kolonie beschouwd. Tel, als minder dan een kwart van de plaat door kolonies is overgroeid, de kolonies op het resterende deel van de plaat en herleid dit resultaat tot de totale oppervlakte van de plaat. Laat de plaat buiten beschouwing als meer dan een kwart van de plaat door kolonies is overgroeid.

8. *Berekening en weergave van de resultaten*

8.1. Gebruik de uitkomsten van alle platen met tussen de tien en 300 kolonies (zie de punten 8.3 en 8.4).

8.2. Het aantal micro-organismen per ml gepasteuriseerde melk wordt gegeven door de formule:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

waarin

$\sum C$ = de som van alle volgens punt 8.1 getelde kolonies,
 $(n_1 + 0,1 n_2) d$ = het volume van het in de schalen gebrachte monster, waarin
 n_1 = het aantal getelde platen met de eerste verdunning,
 n_2 = het aantal getelde platen met de tweede verdunning,
 d = de verdunningsfactor waarbij de eerste telling werd uitgevoerd.

Het getal wordt afgerond op de eerste twee cijfers. Indien het af te ronden cijfer een 5 is, rond dan zó af dat het cijfer links ervan even blijft of wordt.

Voorbeeld

Verdunning 10^{-2} : 278 en 290 kolonies

Verdunning 10^{-3} : 33 en 28 kolonies

$$\begin{aligned} \text{Aantal/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4. \end{aligned}$$

8.3. Als alle tellingen een lagere uitkomst geven dan 10, geef dan het aantal micro-organismen per millimeter op als „minder dan $10 \times d$ per ml”; „d” is hierbij de reciproke van de laagste verdunningsfactor.

8.4. Als alle tellingen hoger zijn dan 300 kolonies, maar telling mogelijk is, bereken dan een geschat aantal en vermenigvuldig dat met de reciproke van de verdunningsfactor. Rapporteer het resultaat als „geschat aantal micro-organismen per ml”.

9. *Precisie*

Er zijn geen resultaten beschikbaar van internationaal erkende gezamenlijke onderzoeken.

VI. BEPALING VAN HET AANTAL MICRO-ORGANISMEN VAN DE COLIGROEP BIJ 30 °C

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de referentiemethode voor de bepaling van het aantal micro-organismen van de coligroep in gepasteuriseerde melk door middel van een telplaatmethode bij 30 °C.

2. Definitie

Met de term „micro-organismen van de coligroep” worden bacteriën bedoeld die bij 30 °C kenmerkende of niet kenmerkende kolonies vormen en lactose fermenteren onder de vorming van gas onder de beschreven omstandigheden.

3. Principe

Een bekend volume van de melk wordt met het voedingsmedium in petrischalen gemengd en gedurende 24 uur bij 30 °C bebroed. De kenmerkende kolonies worden geteld en zo nodig wordt de identiteit van de niet-kenmerkende kolonies vastgesteld door onderzoek naar het vermogen tot fermentatie van lactose. Het aantal micro-organismen van de coligroep per 1 ml gepasteuriseerde melk wordt vervolgens berekend.

4. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting, en in het bijzonder:

4.1. Apparatuur

4.1.1. Hete-luchtstoof, instelbaar op 170 tot 175 °C.

4.1.2. Autoclaaf, instelbaar op 121 ± 1 °C.

4.1.3. Broedstoof, waarin overal een temperatuur van 30 ± 1 °C kan worden gehandhaafd.

4.1.4. pH-meter, met temperatuurcompensatie en nauwkeurig tot op $\pm 0,1$ pH-eenheid.

4.1.5. Waterbad, instelbaar op 45 ± 1 °C.

4.1.6. Naald, van platina-iridium of nikkelchroomdraad.

4.2. Glaswerk

4.2.1. Reageerbuizen, met passende stoppen en een inhoud van 20 ml voor het medium bij de bevestigingsproef (punt 5.2) en Durhambuizen van geschikte afmetingen voor gebruik in de reageerbuizen.

4.2.2. Kolven, van 150 tot 250 ml voor het vaste selectieve medium (punt 5.1).

4.2.3. Pipetten (met wattenprop), van glas of steriel synthetisch materiaal met gave punt, een nominale inhoud van 1 tot 10 ml en een uitstroomopening van 1,75 tot 3 mm diameter.

4.2.4. Petrischalen, van helder, ongekleurd glas of van steriel synthetisch materiaal met een inwendige diameter van ongeveer 90 tot 100 mm voor de onderste schaal. De inwendige hoogte moet ten minste 10 mm zijn. De bodem mag geen onregelmatigheden hebben die bij het tellen van kolonies kunnen storen.

4.2.5. Sterilisatie van glaswerk

Glaswerk moet volgens één van de volgende methoden worden gesteriliseerd:

a) door verhitting in een hete-luchtstoof (punt 4.1.1) gedurende ten minste één uur bij 170 tot 175 °C;

b) door verhitting in een autoclaaf (punt 4.1.2) gedurende ten minste 20 minuten bij 121 ± 1 °C.

In de autoclaaf moet voor een goede stoomverdeling worden gezorgd; als het glaswerk bij voorbeeld in bakken wordt gesteriliseerd, mogen deze niet worden afgesloten en moeten de doppen van de kolven en de flessen loszitten.

Het in de autoclaaf gesteriliseerde glaswerk moet worden gedroogd door afzuiging van de stoom.

Pipetten moeten in een hete-luchtstoof worden gesteriliseerd (punt 4.1.1).

5. Voedingsmedia**5.1. *Violet-rood-gal-lactose* (agar) (VRGL-agar) — vast selectief medium****Samenstelling**

Pepton	7 g
Gistextract	3 g
Lactose ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g
Natriumchloride (NaCl)	5 g
Galzouten	1,5 g
Neutraalrood	0,03 g
Kristalviolet	0,002 g
Agar	10 tot 15 g, afhankelijk van de geleereigenschappen van de gebruikte agar
Water	1 000 ml.

Bereiding

Suspendeer en los de bestanddelen in het water op en laat het mengsel verscheidene minuten staan. Meng dan intensief.

Controleer de pH met een pH-meter (punt 4.1.4) en corrigeer de pH zo nodig zodat deze na koken $7,4 \pm 0,1$ bedraagt bij $25^\circ C$, en gebruik daartoe een oplossing (ten minste $0,1 \text{ mol/l}$) van natriumchloride of zoutzuur.

Breng snel aan de kook en zwenk daarbij van tijd tot tijd. Verdeel het medium onmiddellijk in hoeveelheden van 100 tot 150 ml in steriele kolven (punt 4.2.2). Koel het medium in een waterbad (punt 4.1.5) tot $45 \pm 1^\circ C$.

Op het tijdstip dat het medium gebruikt wordt, moet worden gecontroleerd of het steriel is (punt 6.4).

Gebruik het medium binnen drie uur na bereiding.

5.2. *Briljantgroen-gal-lactose-bouillon* — bevestigingsmedium**Samenstelling**

Pepton	10 g
Lactose ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g
Gedroogde ossegal	20 g
Briljantgroen	0,0133 g
Water	1 000 ml.

Bereiding

Los de bestanddelen op door ze te koken in water.

Controleer de pH met een pH-meter (punt 4.1.4) en corrigeer de pH zo nodig zodat deze na sterilisatie $7,2 \pm 0,1$ bedraagt bij $25^\circ C$; gebruik daartoe een oplossing (ten minste $0,1 \text{ mol/l}$) van natriumhydroxide of zoutzuur.

Verdeel het medium in hoeveelheden van 10 ml in reageerbuizen (punt 4.2.1) voorzien van Durhambuizen. Sluit de buizen af.

Steriliseer 15 minuten in de autoclaaf (punt 4.1.2) bij $121 \pm 1^\circ C$.

De Durhambuizen mogen na sterilisatie geen luchtballen bevatten.

Controleer de pH van het medium.

Als het medium niet direct wordt gebruikt, bewaar het dan in het donker bij een temperatuur tussen 0 en $5^\circ C$, maar niet langer dan één maand na de bereiding.

5.3. *In de handel verkrijgbare gedroogde voedingsmedia*

De voedingsmedia (punten 5.1 en 5.2) kunnen worden bereid uit in de handel verkrijgbare gedroogde media. Volg de aanwijzingen van de fabrikant. Stel de pH in en verdeel, kook of steriliseer de media en bewaar deze zoals beschreven in de punten 5.1 en 5.2.

6. Werkwijze**6.1. *Het medium***

Gebruik het medium (VRGL-agar) volgens punt 5.1.

6.2. *Voorbehandeling van het melkmonster*

Meng het melkmonster grondig, zodat de micro-organismen zo gelijkmatig mogelijk zijn verdeeld, door de monsterpot snel 25 keer om te keren. Vermijd de vorming van schuim en laat ontstaan schuim oplossen. Tussen het mengen en het nemen van de te onderzoeken hoeveelheden mogen niet meer dan drie minuten verstrijken.

6.3. *Enten van de petrischalen*

Er wordt geënt met 3 ml van het melkmonster (punt 6.2) door achtereenvolgens met een steriele pipet (punt 4.2.3) 1 ml melk over te brengen in elk van drie schalen (punt 4.2.4).

6.4. *Gieten*

Giet de VRGL-agar (punt 6.1) in elke geënte schaal in hoeveelheden van ongeveer 12 ml.

Meng, direct na het gieten, door de petrischaal voldoende vaak te zwenken om na bebroeding gelijkmatig verdeelde kolonies te krijgen.

Tussen het einde van de voorbehandeling van het melkmonster en het mengen van de te onderzoeken hoeveelheid met het medium mogen niet meer dan 15 minuten verlopen.

Maak, met het oog op de steriliteit en ter controle, een niet-geënte schaal met 12 ml van dezelfde VRGL-agar die voor de geënte schalen is gebruikt.

Laat stollen op een schoon en koel horizontaal oppervlak.

Giet na volledige stolling ten minste 4 ml VRGL-agar (punt 6.1) op het oppervlak van het geënte medium.

Laat stollen.

6.5. *Bebroeding van de petrischalen*

Breng de schalen in de broedstof (punt 4.1.3). Bebroed de schaal met de boden naar boven. Zet niet meer dan zes schalen op elkaar. Gestapelde schalen mogen elkaar en de wanden en bovenkant van de broedstof niet raken.

Bebroed gedurende 24 ± 2 uur bij 30 ± 1 °C.

6.6. *Telling van de kolonies*

6.6.1. Tel de kolonies in de petriplaten met niet meer dan 150 kolonies. Tel de donkerrood gekleurde kolonies met een diameter van ten minste 0,5 mm, al dan niet omgeven door neergeslagen materiaal, kenmerkend voor micro-organismen van de coligroep.

6.6.2. Voer een bevestigingsproef (punt 6.7) uit, als sommige of alle kolonies niet de kenmerkende eigenschappen hebben (bij voorbeeld verschillen van de typische kolonies wat betreft kleur, afmeting of de vorming van neerslag).

6.7. *Bevestigingsonderzoek*

Voer op grond van de aanwijzingen in punt 6.6.2 een bevestigingsonderzoek uit op een voldoende aantal (bij voorbeeld drie tot vijf) niet-karakteristieke kolonies door enting in buizen met briljantgroen-gal-lactose-bouillon (punt 5.2) met behulp van een naald (punt 4.1.6). Bebroed de buizen gedurende 24 ± 2 uur bij 30 ± 1 °C.

Beschouw de productie van gas in de Durhambuis als de bevestiging dat de betreffende kolonie er een was van de coligroep.

7. *Berekening en weergave van de resultaten*

7.1. Gebruik de tellingen (punt 7.4) van platen met niet meer dan 150 kolonies.

7.2. Bereken, indien een bevestigingsonderzoek is uitgevoerd, het aantal kolonies van micro-organismen van de coligroep uit het percentage bevestigde kolonies van micro-organismen van de coligroep.

7.3. Het aantal micro-organismen van de coligroep per 1 ml gepasteuriseerde melk wordt gegeven door de formule:

$$\frac{\sum C}{n}$$

waarin

ΣC = het totale aantal kolonies van micro-organismen van de coligroep (punt 7.1 in samenhang met punt 7.2) dat bij het onderzoek van het monster melk (3 ml) werd gevonden,

n = het aantal milliliter onderzocht monster (punt 6.3.1) (3 ml).

Het getal wordt afgerond op de eerste twee cijfers, als er meer dan 100 kolonies zijn. Als het af te ronden cijfer een 5 is, rond dan zó af dat het cijfer links daarvan even blijft of wordt.

Als er alleen tellingen met meer dan 150 kolonies zijn, rapporteer dan het resultaat als het „geschatte aantal micro-organismen van de coligroep per 1 ml”.

8.

Precisie

Er zijn geen resultaten beschikbaar van internationaal erkende gezamenlijke onderzoeken.

VII. BEPALING VAN HET AANTAL SOMATISCHE CELLEN

Deze procedure beschrijft twee methoden als referentiemethoden voor de bepaling van het aantal somatische cellen:

- A. De microscopische methode.
- B. De fluoro-opto-elektronische methode.

*A. Microscopische methode***1. Onderwerp en toepassingsgebied**

Deze procedure beschrijft de referentiemethode voor de bepaling van het aantal somatische cellen in rauwe melk.

Deze procedure beschrijft de methode voor de bepaling van het aantal cellen in een melkmonster met het oog op de ijking en de controle van de nauwkeurigheid van de fluorescentiemethode (deel B, punt 1).

2. Definitie

Bij deze methode worden bedoeld met somatische cellen die cellen, bij voorbeeld leucocyten en epitheelcellen, waarvan de kernen met methyleenblauw duidelijk kunnen worden gekleurd.

3. Principe

0,01 ml melk wordt verdeeld over 1 cm² van een objectglaasje. De film wordt gedroogd en gekleurd. De telling gebeurt met behulp van een microscoop. Het aantal somatische cellen wordt geteld over een bepaald oppervlak en vermenigvuldigd met een omrekeningsfactor om het aantal cellen/ml te bepalen.

4. Reagentia

De chemicaliën moeten van analysekwaliteit zijn.

*Kleurstofoplossing**Samenstelling*

Methyleenblauw	0,6 g
Ethanol — 99 %	54 ml
1,1,1-trichloorethaan of tetrachloorethaan	40 ml
Ijsazijn	6 ml.

Waarschuwing

Tetrachloorethaan is giftig. Bij gebruik daarvan moeten bereiding en toepassing worden uitgevoerd in een zuurkast.

Bereiding

Meng de ethanol en 1,1,1-trichloorethaan of tetrachloorethaan in een fles en verhit in een waterbad tot 60—70 °C. Voeg het methyleenblauw toe, meng zorgvuldig, koel 12 tot 24 uur in een koelkast tot 4 °C en voeg de ijsazijn toe. Filtreer door een filter met een porieafmeting van 10 tot 12 micron of minder en bewaar de kleuroplossing in een luchtdichte fles. Filtreer voor gebruik opnieuw, als zich deeltjes hebben gevormd of er neerslag is ontstaan.

5. Apparatuur en glaswerk

5.1. *Microscoop*, met een vergroting van 500 tot 1 000 x.

5.2. *Micro-injectiespuit*, van 0,01 ml met een nauwkeurigheid van ten minste $\pm 2\%$.

- 5.3. *Objectglasje*, met een gemerkt oppervlak van 20 mm × 5 mm voor de vloeistoffilm, of een standaardglasje met een mal van 20 mm × 5 mm voor de film.
- 5.4. *Verwarmingsplaat*, waterpas opgesteld (30 tot 50 °C), voor het drogen van de objectglasjes.
- 5.5. *Ventilator* (haardroger), voor het drogen van de vloeistoflaag.
- 5.6. *Waterbad*, instelbaar bij 30 tot 40 °C om het melkmonster te verwarmen.
- 5.7. *Objectglasje met micrometer*, met een verdeling op 0,01 mm.

6. **Werkwijze**

6.1. *Melkmonser*

Het melkmonster moet binnen zes uur na monsterneming worden onderzocht. De temperatuur bij bewaren mag niet boven 6 °C uitkomen. Bevriezing moet worden vermeden.

6.2. *Voorbehandeling van het monster in het laboratorium*

Verwarm het monster in een waterbad (punt 5.6) tot 30—40 °C. Meng dan zorgvuldig. Koel af tot de ijktemperatuur van de micro-injectiespuit (punt 5.2), bij voorbeeld 20 °C.

6.3. *Voorbehandeling van de objectglasjes*

Maak de glaasjes (punt 5.3) schoon, bij voorbeeld met ethanol, droog hen met stofvrij papier af, houd hen even in een vlam en koel hen af. Bewaar de plaatjes in een doos om contaminatie met stof te vermijden.

6.4. *Vervaardiging van de film*

Neem met een micro-injectiespuit (punt 5.2) 0,01 ml melk uit het op bovenstaande wijze voorbehandelde monster. Maak de buitenkant van de spuit, die in contact is geweest met melk, zorgvuldig schoon. Breng met de spuit het monster op het glaasje (punt 5.3), het eerst langs de omtrek van de figuur (20 mm × 5 mm). Vul daarna het oppervlak zo gelijkmatig mogelijk op. Droog de film op een waterpas opgestelde verwarmingsplaat (punt 5.4) totdat hij volkomen droog is.

Van elk melkmonster moeten ten minste twee films vervaardigd en onderzocht worden.

6.5. *Kleuring van de films*

Dompel de glaasjes met de film tien minuten lang in de kleurstofoplossing (punt 4). Droog hen, zo nodig met behulp van de ventilator (5.5). Dompel de films in kraanwater tot alle overmaat aan kleurstof weggespoeld is. Droog dan opnieuw en bewaar hen stofvrij.

6.6. *Ijking van het microscoopveld*

Bepaal afhankelijk van de gekozen vergroting (500 tot 1 000 ×) de doorsnede van het microscoopveld met behulp van het objectglasje met micrometer (punt 5.7).

7. **Telling en berekening**

7.1. *Telling van de cellen*

Gebruik een microscoop (punt 5.1). In plaats van cellen worden alleen celkernen geteld. Deze zijn goed te herkennen en voor de telling moet minstens de helft van de celkern in het gezichtsveld van de microscoop zichtbaar zijn. Tel banen of vlakken in het middelste derde deel van de film en vermijd bij het tellen banen of vlakken langs de randen van de film. Ter controle op de zorgvuldigheid van de vervaardiging van de films, en dus van de betrouwbaarheid van de resultaten, moet minstens eenmaal per maand een telling worden uitgevoerd van verschillende delen van de film. De telling mag ook gebeuren door telling via een zodanige systematiek dat alle delen van de film gelijk vertegenwoordigd zijn.

7.2. *Minimumaantal te tellen cellen*

Daar de telling van somatische cellen met de microscoop ook gebruikt kan worden voor standaardisering van automatische en mechanische telprocedures, mag de variatiecoëfficiënt van tellingen van identieke monsters niet hoger zijn dan die van elektronische instrumenten. De variatiecoëfficiënt voor een monster melk met 400 000 tot 600 000 cellen/ml mag niet groter zijn dan 5%.

Het aantal somatische cellen dat in elk monster moet worden geteld, dient, in overeenstemming met de karakteristieken van de Poisson-verdeling, ten minste 400 te zijn om deze herhaalbaarheid te bereiken.

Bij de Poisson-verdeling wordt verondersteld dat:

$$M = V = s^2$$

waarin

M = de gemiddelde waarde,

V = de variantie,

s = de standaarddeviatie.

De variatiecoëfficiënt is

$$CV = \frac{s \times 100 \%}{M} \text{ of } CV = \frac{100 \%}{s} \text{ of } CV = \frac{100 \%}{\sqrt{M}}$$

waarin M (gemiddelde) het aantal deeltjes (cellen) aangeeft dat is geteld (d.w.z. 400 als CV = 5 %).

7.3. *Berekening van de omrekeningsfactor*

Bij het gebruik van 0,01 ml melk wordt de omrekeningsfactor volgens punt 7.3.1 of punt 7.3.1 berekend.

7.3.1. Het tellen van banen over de film

De lengte van de te tellen banen is 5 mm. De breedte van een baan komt overeen met de diameter van het gezichtsveld in de microscoop, bepaald met de micrometerverdeling (punt 5.7).

$$\text{Omrekeningsfactor} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

waarin

d = de diameter in mm van het gezichtsveld in de microscoop, bepaald met de micrometerverdeling (punt 5.7),

b = het aantal volledig getelde banen.

7.3.2. Het tellen van vlakken in het middelste derde deel van de film of met een raster

$$\text{Omrekeningsfactor} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12\,732}{d^2 \times s}$$

waarin

d = de diameter in mm van het gezichtsveld in de microscoop, bepaald met de micrometerverdeling (punt 5.7),

s = het aantal getelde vlakken.

7.4. *Berekening van het celgetal*

Het aantal getelde somatische cellen (punten 7.1 en 7.2) wordt vermenigvuldigd met de omrekeningsfactor (punt 7.3) en dat geeft het aantal cellen per ml melk.

7.5. *Precisie*

De variatiecoëfficiënt (punt 7.2) mag niet meer bedragen dan 5 %.

Er zijn geen resultaten beschikbaar van internationaal erkende gezamenlijke onderzoeken.

B. *Fluoro-opto-elektronische methode*

1. *Onderwerp en toepassingsgebied*

Deze procedure beschrijft de referentiemethode die na de juiste ijking (deel A, punt 1) kan worden gebruikt om somatische cellen in rauwe melk te tellen — met of zonder chemische conservering.

2. Definitie

Voor deze methode worden met de term „somatische cellen” bedoeld deeltjes met een minieme fluorescentie-intensiteit als gevolg van kleuring van het DNA in de kern van somatische cellen.

3. Beginsel

Een deel van het monster (bij voorbeeld 0,2 ml) wordt grondig gemengd met buffer- en kleurstofoplossing. Een deel van het mengsel wordt overgebracht als een dunne film op een draaiende schijf die dient als een objectvlak voor de microscoop.

Elke cel levert een elektrisch signaal dat versterkt en geregistreerd wordt. Het aantal somatische cellen wordt weergegeven in duizend-tallen per ml.

4. Reagentia

Tenzij anders vermeld, moeten chemicaliën van analysekwaliteit worden gebruikt. Water moet of wel gedistilleerd of gedeïoniseerd of wel van gelijkaardige zuiverheid zijn.

4.1. Bufferoplossing**Samenstelling**

Kaliumwaterstofftalaat	51,0 g
Kaliumhydroxide	13,75 g
Polyethyleenglycol-mono-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether (bij voorbeeld Triton X-100), 1 volume %	10 ml.
pH 5,7—5,9. Aanvullen tot 10 000 ml met water.	

Bereiding

De afzonderlijke bestanddelen worden gemengd. Niet langer dan zeven dagen luchtdicht bewaren.

4.2. Kleurstofoplossing (voorraadoplossing)**Samenstelling**

Ethidiumbromide	1,0 g.
Aanvullen met water tot 1 000 ml.	

Bereiding

Ethidiumbromide wordt in water opgelost. Niet langer dan twee maanden bewaren in een luchtdichte donkere fles.

4.3. Kleurstofoplossing (gebruiksoplossing)

20 ml voorraadoplossing (punt 4.2) wordt gemengd met bufferoplossing (punt 4.1) tot 1 000 ml. Deze mag niet langer dan zeven dagen worden gebruikt.

4.4. Reinigingsoplossing**Samenstelling**

Bufferoplossing (punt 4.1)	10 ml
Polyethyleenglycol-mono-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether (bij voorbeeld Triton X-100), 1 volume %	10 ml
Ammonia, 25 volume %	25 ml.
Aanvullen met water tot 10 000 ml.	

Bereiding

De afzonderlijke bestanddelen worden gemengd. Niet langer dan 30 dagen bewaren.

5. Apparatuur en glaswerk**5.1. Telapparaat, werkend volgens het fluorescentie-optische principe.****Opmerking**

Het apparaat moet vóór gebruik worden geijkt. Het verband tussen het aantal te tellen deeltjes en de drempel waarboven de telling wordt uitgevoerd, wordt op deze manier bepaald. De ijking van het apparaat wordt volgens de aanwijzingen van de fabrikant uitgevoerd met monsters waarvan het celgetal werd bepaald met de microscopische methode (deel A).

- 5.2. Waterbad, met circulatie, instelbaar op 40 ± 1 °C.
- 5.3. Reageerbuis, met geschikte sluiting, ongeveer 15 ml.
6. Melkmonster
- 6.1. Het monster moet bij lage temperatuur in een reageerbuis (punt 5.3) worden bewaard. Het monster mag, als het niet chemisch geconserveerd is, niet binnen de eerste 24 uur na het melken worden geteld, omdat het resultaat dan te laag uitvalt. De temperatuur bij bewaren mag niet hoger zijn dan 6 °C.
- 6.2. Conservering
- Chemische conservering moet binnen 24 uur worden uitgevoerd. Conservering moet zo spoedig mogelijk na bemonstering worden uitgevoerd.
- 6.2.1. Chemische conservering van het monster kan gebeuren door toevoeging van één van de volgende conserveringsmiddelen:
- Orthoboorzuur
De uiteindelijke concentratie orthoboorzuur in het monster mag niet hoger zijn dan 0,6 g/100 ml. Een aldus geconserveerd monster kan nog eens 24 uur bij 6 tot 12 °C worden bewaard.
 - Kaliumdichromaat
De uiteindelijke concentratie kaliumdichromaat mag niet hoger zijn dan 0,2 g/100 ml. Aldus geconserveerde monsters kunnen nog eens 72 uur worden bewaard bij 6 tot 12 °C.
 - Natriumazide
Het monster kan met natriumazide in een uiteindelijke concentratie van 0,024 g/100 ml worden geconserveerd, mits het monster onmiddellijk na bemonstering tot 6 à 12 °C wordt gekoeld en binnen 48 uur na bemonstering wordt geteld.
 - Bronopol
Het monster kan geconserveerd worden met bronopol in een uiteindelijke concentratie van 0,05 g/100 ml, mits het monster direct na bemonstering tot 6 à 12 °C wordt gekoeld en binnen 72 uur na bemonstering wordt geteld.
- 6.2.2. Een monster dat al met orthoboorzuur is geconserveerd, kan voor nog eens 48 uur worden geconserveerd met kaliumdichromaat.
- Opmerking*
Bij monsters die met kaliumdichromaat zijn geconserveerd, moet rekening worden gehouden met plaatselijke lozingsvoorwaarden.
7. Werkwijze
- 7.1. Voorbehandeling van het monster
- De te onderzoeken melk moet na het melken ten minste 24 uur bij ongeveer 2 tot 6 °C worden bewaard. Het zonder voorbehandeling tellen van monsters op de dag van het melken wordt afgeraden omdat de resultaten te laag kunnen uitvallen. Als telling van een dergelijk monster nodig is, moet het ten minste gedurende drie uur worden voorbehandeld met kaliumdichromaat (punt 6.2.1).
- 7.2. Voorbereiding
- Het voorbehandelde monster (punt 7.1) of het onbehandelde monster van ten minste één dag oud, wordt in een waterbad (punt 5.2) verwarmd tot ongeveer 40 °C. Het monster wordt dan bewaard bij kamertemperatuur totdat de tellingen worden uitgevoerd.
- 7.3. Het tellen van de cellen
- De telling moet binnen 15 minuten na het verwarmen (punt 7.2) worden uitgevoerd met het telapparaat (punt 5.1). Het monster moet direct vóór het tellen grondig worden gemengd om een zo gelijkmatig mogelijke verdeling van de somatische cellen te krijgen.
- Verdere verdunning en behandeling van het monster vinden in het instrument automatisch plaats.

8. Betrouwbaarheid

Er zijn geen cijfers voor de herhaalbaarheid (r) en reproduceerbaarheid (R) beschikbaar uit de resultaten van internationaal gezamenlijk onderzoek. In de toekomst zullen cijfers voor de betrouwbaarheid worden gegeven.

Op grond van nationale gegevens kunnen de volgende schattingen worden gemaakt:

Bij celgetallen tussen 400 000 en 500 000 per ml:

- standaarddeviatie voor herhaalbaarheid (r): $s_r = 20\,000/\text{ml}$ (equivalent een variatiecoëfficiënt van 5-4 %);
- standaarddeviatie voor reproduceerbaarheid (R): $s_R = 40\,000/\text{ml}$ (equivalent een variatiecoëfficiënt van 10-8 %).

9. Controle van de nauwkeurigheid

De controle van de nauwkeurigheid wordt uitgevoerd op monsters met een bekend celgetal, bepaald via microscopische tellingen van cellen door een nationaal referentielaboratorium.

VIII. AANTONEN VAN ANTIBIOTICA EN SULFONAMIDEN

ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de referentiemethode voor het aantonen van antibiotica en sulfonamiden in rauwe melk en in warmtebehandelde melk.

De referentiemethode omvat:

A. een kwalitatieve methode

Deze methode wordt gebruikt in een beginfase om melkmonsters te selecteren die antibiotica, inclusief sulfonamiden, bevatten. De beschreven methode is er één van een aantal vergelijkbare methoden die in principe alle gebruik maken van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 als testorganisme. De methode is gekozen als representatief voor die bepalingmethoden.

B. een methode ter bevestiging en identificatie van penicilline

Deze methode dient te worden gebruikt om de resultaten van de kwalitatieve methode te bevestigen, om penicilline te identificeren en om de concentratie penicilline te bepalen.

A. Kwalitatieve methode

1. Onderwerp en toepassingsgebied

De procedure beschrijft het kwalitatief aantonen van antibiotica en sulfonamiden bij overschrijding van de in de tabel opgenomen grenswaarden in rauwe en warmtebehandelde melk:

Aantoonbare concentraties van verschillende antibiotica en sulfonamiden ⁽¹⁾

	Gevoeligheid van de bepaling	
	Geheel negatief	Geheel positief
Benzylpenicilline	0,002	0,006
Ampicilline	0,002	0,005
Cloxacilline	0,015	0,035
Nafcilline	0,006	0,011
Tetracycline HCL	0,10	0,40
Oxytetracycline	0,20	0,45
Chloortetracycline	0,15	0,50
Chlooramphenicol	7	15
Dihydrostreptomycine	4	13
Neomycine	1	22
Kanamycine	9	28
Bacitracine	0,06	0,14
Erythromycine	1	2,25
Rifamycine	0,01	0,14
Diafenylsulfon	0,01	0,1
Sulfamethazine (sulfadimidine)	0,5	1

⁽¹⁾ Benzylpenicilline en bacitracine zijn uitgedrukt in IE/ml, alle andere antibiotica in µg/ml.

2. Definitie

De melk bevat antibiotica of sulfonamiden wanneer de kleur van het medium niet veranderd is (punt 7.1).

3. Principe

Een melkmonster wordt samen met nutriënten toegevoegd aan een agargel met pH-indicator en sporen van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (punt 5.4.1) die een goede gevoeligheid heeft in het algemeen en in het bijzonder gevoelig is voor groeiremming door penicilline. Na bebroeding veroorzaken normale groei en zuurproductie door het organisme kleurverandering van de pH-indicator van paars naar geel. Wanneer in de melk stoffen aanwezig zijn die de groei van de organismen remmen, dan blijft de kleur van de pH-indicator paars.

4. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting, in het bijzonder:

4.1. Apparatuur

- 4.1.1. Broedstoof, waarin een temperatuur van 64 ± 1 °C kan worden gehandhaafd.
- 4.1.2. Waterbad, instelbaar op 64 ± 1 °C.
- 4.1.3. Rek, voor ampullen of buizen.
- 4.1.4. Injectiespuit, met wegwerpnaalden en geschikt voor bemonsteren en verdelen van 0,1 ml.
- 4.1.5. Tang of pincet
- 4.1.6. Hete-luchtstoof, instelbaar op 170—175 °C.
- 4.1.7. Autoclaaf, instelbaar op 121 ± 1 °C.
- 4.1.8. pH-meter

4.2. Glaswerk

- 4.2.1. Monsterflessen, met goede sluitingen.

Opmerking

Bepaalde rubberstoppen kunnen groeiremmende stoffen op de hals van de fles achterlaten.

- 4.2.2. Petrischalen, van helder, ongekleurd glas of steriel synthetisch materiaal met vlakke bodem van gelijkmatige dikte en een minimale inwendige diameter van ongeveer 140 mm.
- 4.2.3. Flessen, 250 ml.
- 4.2.4. Pipetten (met wattenprop), van glas of steriel synthetisch materiaal met een nominale inhoud van 1 ml en 10 ml.
- 4.2.5. Glazen spatels
- 4.2.6. Buizen of ampullen, inwendige middellijn ongeveer 8 mm, met dop of stop.
- 4.2.7. Sterilisatie van glaswerk

Het glaswerk moet volgens één van de volgende methoden worden gesteriliseerd:

- a) door verhitting in een hete-luchtstoof (punt 4.1.6) gedurende ten minste één uur bij 170—175 °C;
- b) door verhitting in een autoclaaf (punt 4.1.7) gedurende ten minste 20 minuten bij 121 ± 1 °C.

In de autoclaaf moet voor een goede stoomverdeling worden gezorgd: als het glaswerk bij voorbeeld in bakken wordt gesteriliseerd, mogen deze niet geheel worden afgesloten en moeten de doppen van kolven en flessen loszitten.

Het in de autoclaaf gesteriliseerde glaswerk moet worden gedroogd door afzuiging van de stoom.

Pipetten moeten in een hete-luchtstoof worden gesteriliseerd.

5. Media, oplossingen en testorganisme

De bestanddelen van de media moeten geschikt zijn voor bacteriologische doeleinden. Het water moet in glas gedistilleerd water zijn of gedemineraliseerd water van ten minste gelijke zuiverheid. Dit water mag geen stoffen bevatten die groeiremmend zijn voor het testorganisme.

5.1. *Media*

5.1.1. Nutriëntagar

Samenstelling:

Gistextract	2 g
Pepton	5 g
Vleesextract	1 g
Natriumchloride	5 g
Agar	10 tot 15 g
Water	1 000 ml.

Bereiding:

Los de bestanddelen in water op. Breng aan de kook en zwenk daarbij van tijd tot tijd. Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie bij $25\text{ °C } 7,4 \pm 0,1$ bedraagt.

Verdeel de oplossing in hoeveelheden van 10 ml in reageerbuisen om agar-slants te maken of in hoeveelheden van 100 ml in flessen.

Steriliseer gedurende 15 minuten bij $12621 \pm 1\text{ °C}$.

5.1.2. Agarmedium

Samenstelling:

Natriumchloride	2 g
Agar	15 g
Water	1 000 ml

Trimethoprim- of tetroxoprimoplossing ⁽¹⁾ (punt 5.1.3) 10 ml.

Bereiding:

Los de bestanddelen met uitzondering van trimethoprim of tetroxoprim op in water. Breng aan de kook en zwenk daarbij van tijd tot tijd. Voeg trimethoprim of tetroxoprim toe en steriliseer gedurende 15 minuten bij $121 \pm 1\text{ °C}$; stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie bij $25\text{ °C } 7,0 \pm 0,1$ bedraagt.

5.1.3. Trimethoprimoplossing

Samenstelling:

Trimethoprim	5 mg
of tetroxoprim	30 mg
Ethanol, 96 %	5 ml/30 ml
Water	tot 1 000 ml.

Bereiding:

Los trimethoprim of tetroxoprim op in ethanol (5 of 30 ml) en verdun met water.

5.1.4. Nutriënt

Samenstelling:

Gistextract	0,75 mg
Glucose	5,0 mg
Oplosbaar zetmeel	8,0 mg
Broomkresolpurper	0,025 mg
Water	tot 50 ml.

Bereiding:

Los de nutriënten en de indicator op in water, waarbij indien nodig wordt verwarmd; steriliseer door filtratie. Het nutriënt is in de handel in tabletvorm verkrijgbaar.

5.2. *Standaard-penicillineoplossingen*

5.2.1. Maak een oplossing van 60 µg penicilline/ml (= 100 IE/ml) door natrium- of kaliumbenzylpenicilline in kristalvorm in een goed afgesloten steriele fles op te lossen in steriel gedistilleerd water.

5.2.2. Maak een werkoplossing door 1,25 ml van de penicillineoplossing (punt 5.2.1) tot 1 000 ml aan te vullen met steriel gedistilleerd water. Deze werkoplossing bevat $0,075\text{ µg/ml}$ (= $0,125\text{ IE/ml}$).

5.2.3. Maak 75 ml standaard-penicillineoplossing met $0,004\text{ µg/ml}$ (= $0,0067\text{ IE/ml}$) penicilline door aan 4 ml van de werkoplossing (punt 5.2.2) 71 ml melk zonder bacteriegroeiremmende stoffen (punt 5.3) toe te voegen en te mengen.

⁽¹⁾ De wetgeving aangaande patenten op het gebruik van cultuurmedia die antifolaten bevatten, moet worden herzien.

- 5.2.4. De bij de punten 5.2.1, 5.2.2 en 5.2.3 vermelde penicillineoplossingen moeten worden bereid op de dag waarop het onderzoek wordt uitgevoerd.
- 5.3. *Melk zonder bacteriegroeiremmende stoffen*
Maak voor controledoeleinden *melk zonder bacteriegroeiremmende stoffen* door magere-melkpoeder (10 % m/v), dat bij voorafgaand onderzoek geen groeiremmende stoffen bleek te bevatten, op te lossen in steriel gedistilleerd water. Een andere mogelijkheid is om een voldoende grote hoeveelheid verse melk die bij voorafgaand onderzoek geen groeiremmende stoffen bleek te bevatten, te verdelen in flessen, één uur op 100 °C te verhitten en daarna ten hoogste één week in een koelkast bij 0 tot 6 °C te bewaren.
- 5.4. *Testorganisme*
- 5.4.1. Als testorganisme wordt *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, stam ATCC 10149, gebruikt. Stam ATCC 10149 is identiek met C 953.
- 5.4.2. Maak een *voorraadcultuur* om de testcultuur te kunnen handhaven. De testcultuur wordt gekweekt op een nutriëntagar (punt 5.1.1). De agar wordt geënt door het oppervlak te bestrijken met een entogge met de testcultuur en daarna gedurende 48 uur bij 63 ± 1 °C aëroob te bebroeden. Na bebroeding wordt de buis met een steriele rubberstop afgesloten. De zo verkregen voorraadcultuur kan verscheidene maanden in een koelkast bij 0 tot 5 °C worden bewaard.
- 5.5. *Testcultuur (sporensuspensie)*
- 5.5.1. 20 ml gesmolten nutriëntagar (punt 5.1.1) wordt aseptisch in een steriele petrischaal (punt 4.2.2) overgebracht en gekoeld tot kamertemperatuur.
- 5.5.2. Breng met een steriele pipet (punt 4.2.4) 5 ml steriel gedistilleerd water over in een buis met voorraadcultuur (punt 5.4.2) en was de sporen van de agarlaag met een steriel oogje. Deze sporensuspensie moet bij 0 tot 5 °C worden bewaard en binnen 36 uur worden gebruikt.
- 5.5.3. Breng met een steriele pipet (punt 4.2.4) 0,5 ml van de sporensuspensie (punt 5.5.2) over in een petrischaal (punt 5.5.1) en verdeel het entmateriaal zorgvuldig met een gebogen glasstaaf over het gehele oppervlak. Bebroed gedurende 16 tot 18 uur bij 63 ± 1 °C (punt 4.1.1).
Bij gebruik van een voorraadcultuur (punt 5.4.2) of een cultuur die ouder is dan 36 uur moet de kweekprocedure ten minste twee keer worden uitgevoerd, waarbij niet meer dan 36 uur tussen de beide keren mag verlopen.
- 5.5.4. Breng met een steriele pipet (punt 4.2.4) 10 ml gedistilleerd water in de petrischaal (punt 5.5.3) en breng de sporen met een glasstaaf vanaf het oppervlak van de petrischaal in de suspensie.
Breng de sporensuspensie over in een fles (punt 4.2.3) met 250 ml steriel gedistilleerd water. Sluit de fles en schud flink. Cultures die niet direct worden gebruikt, moeten in een koelkast bij 0 tot 6 °C worden bewaard.
- 5.5.5. De sporensuspensie moet een aantal levensvatbare kiemen bevatten tussen 5 en 10 miljoen per ml, geteld op Plate Count Agar dat gedurende 16 tot 18 uur is bebroed bij 63 ± 1 °C. De sporensuspensie moet overal even troebel zijn; als zij vlokken of neerslag bevat, moet de suspensie worden weggegooid en moet een nieuwe suspensie worden bereid uit de voorraadcultuur (punt 5.4.2).
- 5.6. *Bereiding van reageerbuizen/ampullen met proefcultuur*
- 5.6.1. Smelt het agarmedium (punt 5.1.2) en koel af tot 55 °C.
- 5.6.2. Voeg in een buis of fles één deel van de verse sporensuspensie (punt 5.5.4) toe aan vijf delen van het agarmedium (punt 5.6.1) en meng grondig.
- 5.6.3. Breng 0,3 ml van het geënte medium (punt 5.6.2), dat volgens berekening een laag van 5 mm geeft, over in een steriele buis of ampul (punt 4.2.6) en sluit af met een stop, een dop of door dichtsmelten van de punt. Laat vervolgens deze reageerbuizen/ampullen rechtopstaand afkoelen totdat het medium gestold is. Laat hen dan nog eens gedurende ten minste twaalf uur staan.
- 5.6.4. De reageerbuizen/ampullen kunnen dezelfde dag worden gebruikt, maar zij kunnen verscheidene maanden worden bewaard, mits zij onmiddellijk na vervaardiging worden gekoeld en bij 0 tot 6 °C worden bewaard.
6. *Werkwijze*
- 6.1. De monsters moeten zo snel mogelijk worden onderzocht, bij voorkeur binnen 24 uur na bemonstering, en moeten intussen bij een temperatuur tussen 0 en 5 °C worden bewaard. Als de monsters niet binnen 24 uur kunnen worden onderzocht, moeten zij in de diepvries (–30 tot –15 °C) worden bewaard om de penicilline zo min mogelijk te inactiveren.

- 6.2. Breng op elke buis/ampul (punt 5.6) een leesbare en onuitwisbare identificatie aan. Verwijder de stop of dop. Plaats het gewenste aantal buizen/ampullen voor de te onderzoeken monsters en de controleproeven (punten 5.2 en 5.3) in een geschikt rek (punt 4.1.3).
- 6.3. Voeg 50 µl van de in punt 5.1.4 genoemde nutriënt aan elke buis/ampul toe.
- 6.4. Meng het melkmonster grondig en breng met de injectiespuit (punt 4.1.4) 0,1 ml over in de corresponderende gemerkte buis/ampul. Gebruik voor elk over te brengen monster een schone wegwerpnald.
- 6.5. Voer de in punt 6.4 beschreven werkwijze in duplo uit met de standaardoplossing van 0,004 µg penicilline/ml (= 0,0067 IE/ml) in plaats van het melkmonster (punt 5.2.3).
- 6.6. Voer ter controle de handeling in punt 6.4 in duplo uit met melk die vrij is van groeiremmende stoffen (punt 5.3) in plaats van het melkmonster.
- 6.7. Sluit de buizen/ampullen en plaats het rek met de buizen/ampullen in een waterbad op 63 ± 1 °C (punt 4.1.2) gedurende ten minste $2^{1/2}$ — $2^{3/4}$ uur.
- 6.8. Haal het rek met de buizen/ampullen uit het waterbad.
- 6.9. Beoordeel de kleur van het testmedium (punt 7).

7. Interpretatie van de resultaten

- 7.1. Een paarse verkleuring van het testmedium in één van de buizen/ampullen met een melkmonster of in een controlebuis/ampul duidt op de aanwezigheid van antibiotica of sulfonamiden in het monster in of ongeveer in de concentratie „geheel positief” die is vermeld in de tabel op pagina 39. De kleur van de buizen/ampullen met de standaardoplossing met penicilline (punt 6.5) moet paars blijven om aan te tonen dat het testmedium gevoelig genoeg is.
- 7.2. Een paarse verkleuring van slechts een deel van het testmedium of een onregelmatige verkleuring in één van de buizen/ampullen met een melkmonster wijst erop dat groeiremmende stoffen aanwezig zijn in een concentratie tussen de in de tabel op pagina 39 vermelde niveaus.
- 7.3. Een gele verkleuring van het testmedium in één van de buizen/ampullen met een melkmonster of in een controlebuis/ampul duidt op de afwezigheid van voor de testorganismen groeiremmende stoffen.
- 7.4. Als er in alle onderzochte buizen/ampullen, inclusief de negatieve controlebuizen/ampullen, een paarse verkleuring is, bevatten de buizen/ampullen geen levensvatbare sporen en moeten de monsters opnieuw worden onderzocht, met vers bereid testmateriaal.

8. Bevestiging van de resultaten

- 8.1. Voer voor alle monsters met reacties volgens de punten 7.1 en 7.2 een bevestigingsproef uit overeenkomstig „methode B”.
Als de melkmonsters moeten worden bewaard voordat de bevestigingsproef wordt uitgevoerd, moeten zij worden diepgevroren om achteruitgang van de antibiotica te voorkomen.

B. Methode voor de bevestiging van penicillinen en de bepaling van de concentratie

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de bevestigingsmethode van penicillinen of antibiotica, andere dan penicillinen, en de werkwijze voor de bepaling van de penicillineconcentratie in monsters melk met positieve (deel A, punt 7.1) of twijfelachtige reactie (deel A, punt 7.2).

Gevoeligheid van verschillende antibiotica voor de werkwijze

Zie deel A, punt 1.

2. Definitie

- 2.1. Het melkmonster bevat *antibiotica, inclusief sulfonamiden*, indien het monster bij de beschreven werkwijze een heldere zone rond de schijf geeft van ten minste 2 mm.

- 2.2. Als een monster met antibiotica, inclusief sulfonamiden (punt 2.1), na toevoeging van penicillinase (bèta-lactamase) geen heldere zone geeft of een heldere zone met een diameter kleiner dan bij afwezigheid van penicillinase, dan is de groeiremmende stof of penicilline of zowel penicilline als een ander antibioticum, waaronder sulfonamiden.

- 2.3. Als de zone niet door penicillinase (punt 2.2) wordt geïnactiveerd, is de groeiremmende stof in het melkmonster geen penicilline, maar kan het ook een ander residu zijn (bijlage A, hoofdstuk VI, onder A.1.f) en A.2.b) van Richtlijn 85/397/EEG).

Bepaalde semi-synthetische penicillinen, bij voorbeeld natriumcloxacilline, worden niet of slechts gedeeltelijk geïnactiveerd door penicillinase of zijn geheel resistent en worden dus niet als penicilline geïdentificeerd (punt 7.3).

3. Principe

Een schijfje papier, gedrenkt in de te onderzoeken melk, wordt op het oppervlak van een agarmedium gelegd dat geënt is met *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Bebroeding die leidt tot normale groei van het testorganisme geeft de agar een troebel uiterlijk. De aanwezigheid in melk van stoffen die de groei van het testorganisme remmen, blijkt uit een heldere zone om het papierschijfje. De afmeting van de heldere zone hangt onder andere af van de concentratie en het soort groeiremmende stof in de melk.

4. Apparatuur, glaswerk en uitrusting

4.1. Apparatuur

- 4.1.1. Zie deel A, punt 4.1.

- 4.1.2. Waterbad, instelbaar op 80 ± 1 °C.

4.2. Glaswerk

Zie deel A, punt 4.2.

- 4.3. Papierschijfjes, vrij van groeiremmende stoffen, diameter 9 tot 13 mm, die ongeveer 130 mg melk kunnen opnemen en bij voorkeur bewaard worden in een exsiccator.

5. Media, standaardoplossingen, penicillinaseoplossing, reagentia, testorganisme, enz.

De bestanddelen van de media moeten geschikt zijn voor bacteriologische doeleinden. Het water moet in glas gedistilleerd zijn of gedemineraliseerd water van ten minste gelijke zuiverheid zijn. Het mag geen stoffen bevatten die groeiremmend zijn voor micro-organismen.

5.1. Media

- 5.1.1. Nutriëntagar (deel A, punt 5.1.1).

- 5.1.2. Testmedium voor het vaststellen van groeiremmende stoffen

Samenstelling:

Gistextract	2,5 g
Trypton	5 g
Glucose	1 g
Trimethoprim- of tetroxoprimoplossing (deel A, punt 5.1.3)	10 ml
Agar	10 tot 15 g afhankelijk van de geleereigenschappen
Water	1 000 ml.

Bereiding:

De vaste bestanddelen worden volledig in water opgelost door verwarmen en roeren, voordat de trimethoprim- of tetroxoprimoplossing wordt toegevoegd. Na toevoeging van de trimethoprim- of tetroxoprimoplossing moet de pH zo worden gecorrigeerd dat deze $8,0 \pm 0,1$ bedraagt bij 25 °C. Het medium wordt gedurende 15 minuten bij 121 ± 1 °C gesteriliseerd.

5.2. Standaardoplossingen van penicilline in melk

Zie deel A, punt 5.2.

Maak voor de kwantitatieve bepaling van groeiremmende stoffen (punt 8) volgende standaardoplossingen van penicilline in melk die vrij is van groeiremmende stoffen (deel A, punt 5.3):

- a) 0,004 µg/ml (0,0067) IE/ml),
- b) 0,006 µg/ml (0,01 IE/ml),
- c) 0,03 µg/ml (0,05 IE/ml),
- d) 0,06 µg/ml (0,1 IE/ml).

5.3. *Penicillinaseoplossing*

- 5.3.1. Los voldoende penicillinase (bèta-lactamase) op in steriel gedistilleerd water om een concentratie van 1 000 E/ml te verkrijgen. Deze oplossing kan, bij voorkeur in kleine hoeveelheden verdeeld, tot vier weken bij 0 tot 5 °C worden bewaard.

Opmerking

Er bestaat geen uniforme internationale standaard voor penicillinase. Ten behoeve van deze werkwijze wordt aangenomen dat 10 eenheden penicillinase voldoende zijn om 0,6µg (= 1 IE) penicilline te inactiveren. Bij voorraden penicillinase van onbekende sterkte zal het nodig zijn de juistheid van deze veronderstelling te controleren. Anders is het noodzakelijk om de concentratie van de penicillinaseoplossing dienovereenkomstig te wijzigen.

- 5.3.2. In plaats van een penicillinaseoplossing kunnen in de handel verkrijgbare schijfjes met penicillinase worden gebruikt, indien deze na controle een geschikte hoeveelheid penicillinase blijken te bevatten.

5.4. *Testorganisme*

Zie deel A, punt 5.4.

5.5. *Testcultuur (sporensuspensie)*

Zie deel A, punt 5.5.

5.6. *Bereiding van de testplaten*

- 5.6.1. Smelt het agarmedium voor het aantonen van groeiremmende stoffen (punt 5.1.2) en koel af tot 55 °C.
- 5.6.2. Voeg in een fles één deel vers bereide sporensuspensie (punt 5.5) toe aan zoveel delen van het gesmolten agarmedium voor het aantonen van groeiremmende stoffen (punt 5.1.2) dat een bruikbare hoeveelheid kolonies in het geënte agarmedium ontstaat, en meng grondig.
- 5.6.3. Breng het geënte agarmedium (punt 5.6.2) over in een steriele, tot 55 °C voorverwarmde petrischaal (deel A, punt 4.2.2), zodat een laag van 0,6 tot 0,8 mm dik ontstaat. Voor een petrischaal met een inwendige diameter van 140 mm is ongeveer 15 ml agarmedium nodig om een dikte van 0,8 mm te krijgen.
- 5.6.4. Plaats de petrischalen op een koud oppervlak dat vooraf met een waterpas op horizontale stand is gecontroleerd, verwijder de deksels en laat het agarmedium stollen. Plaats de deksels weer op de schalen wanneer het medium is gestold en keer de schalen om ten einde zo weinig mogelijk condensatie op het oppervlak van het agarmedium te krijgen.
- 5.6.5. De zo vervaardigde testplaten moeten bij voorkeur op dezelfde dag worden gebruikt, maar zij kunnen tot twee weken worden bewaard, mits zij direct na bereiding bij 5 °C in een goed gesloten polyethyleen zak worden bewaard.
- 5.6.6. Merk de bodem van de testplaten om de monsters te kunnen identificeren.

6. *Werkwijze*

6.1. *Voorbehandeling van het monster*

- 6.1.1. Monsters die positieve of twijfelachtige resultaten geven bij „methode A” (deel A, punten 7.1 en 7.2), moeten opnieuw worden onderzocht ter identificatie van de groeiremmende stoffen en ter kwantificering van het penicillinegehalte.
- 6.1.2. Vooraf worden deze monsters gedurende tien minuten op 80 ± 1 °C verwarmd om beïnvloeding door thermolabiele niet-specifieke groeiremmende bacteriën te vermijden.
- 6.1.3. Ongeveer 10 ml van de verwarmde te onderzoeken melk wordt na grondig mengen overgebracht in een steriele fles met wijde hals. Ongeveer 0,4 ml van de penicillinaseoplossing (punt 5.3) wordt aan de melk toegevoegd, waarna de fles grondig wordt geschud.

- 6.2. *Aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen*
- 6.2.1. Dompel een papierschijfje (punt 4.3) in het melkmonster (punt 6.1.2) met een schone droge tang. Verwijder een teveel aan melk door het schijfje tegen de zijkant van de fles met monster te strijken. Leg het schijfje plat op het oppervlak van de testplaat (punt 5.6) en druk met de tang zacht aan.
- 6.2.2. De met de verschillende monsters behandelde schijfjes moeten ten minste 20 mm van elkaar en ten minste 10 mm van de rand verwijderd zijn.
- 6.2.3. Om de gevoeligheid na te gaan, moeten schijfjes (punt 4.3) die in de standaardoplossingen met penicilline (punt 5.2, onder a)) zijn gedompeld, willekeurig tussen de schijfjes met melkmonsters worden gelegd in een hoeveelheid van ten minste 2 % van het aantal schijfjes met melkmonsters, en bij elke bepaling moeten ten minste vijf standaardschijfjes worden gebruikt.
- 6.2.4. Keer, wanneer alle schijfjes op willekeurige wijze op het agarmedium zijn gelegd en zijn geïdentificeerd, de platen om ooen bebroed hen gedurende 2,5 tot 5 uur bij $63 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 6.2.5. Na bebroeden worden de platen vóór een geschikte lichtbron onderzocht op heldere remmingszones rond de schijfjes. Deze heldere zones worden gemeten.
- 6.2.6. De zones rond de schijfjes met de standaardoplossing met penicilline (punt 6.2.3) moeten ten minste 2 mm zijn.
- 6.2.7. Als er heldere zones rond de schijfjes met melkmonsters zijn, die even groot zijn als of groter dan bij punt 6.2.6 aangegeven, wijst dat op de aanwezigheid van voor het testorganisme groeiremmende stoffen.
- 6.3. *Identificatie en kwantificering van de bacteriegroeiremmende stoffen*
- 6.3.1. De werkwijze volgens punt 6.2.1 wordt in duplo uitgevoerd op het verwarmde melkmonster (punt 6.1.2) en op het met penicillinase behandelde monster (punt 6.1.3). In plaats van toevoeging van penicillinase aan 10 ml van het monster melk kan een voorbehandeld penicillinaseschijfje (punt 5.3.2) in dit monster worden gedompeld en op de testplaat worden gelegd.
- 6.3.2. De werkwijze volgens punt 6.2.1 wordt in duplo uitgevoerd met elk van de in punt 5.2, onder a) tot en met d) genoemde standaardoplossingen met penicilline.
- 6.3.3. De gemiddelde diameter van de heldere remmingszones moet worden bepaald voor het melkmonster, voor controleschijfjes met penicillinase en voor de standaardoplossingen met penicilline.
7. *Interpretatie van de resultaten (punt 2)*
- 7.1. De groeiremmende stof in het melkmonster komt overeen met een concentratie natrium-(kalium-)benzyl-penicilline van ten minste $0,004 \mu\text{g/ml}$, indien er geen heldere zone is rond het controleschijfje met penicillinase, maar wel een heldere zone rond het schijfje met het melkmonster, die even groot is of groter dan de zone rond het schijfje met de standaardoplossing met penicilline (punt 5.2, onder a)).
- 7.2. De melk bevat groeiremmende stoffen die niet geïnactiveerd kunnen worden door de bij deze werkwijze gebruikte penicillinaseconcentraties, als de gemiddelde diameter van de heldere zone om het schijfje met penicillinase gelijk is aan de gemiddelde diameter van de heldere zone rond het schijfje met het melkmonster.
- 7.3. Als de gemiddelde diameter van de heldere zone rond het schijfje met penicillinase kleiner is dan de gemiddelde diameter van de heldere zone om het schijfje met het volgens punt 6.1.2 verwarmde melkmonster, dan bevat het melkmonster penicilline samen met andere antibiotica, inclusief sulfonamiden, naast penicilline of semi-synthetische penicilline, die niet geïdentificeerd kunnen worden door de bij deze werkwijze gebruikte concentraties penicillinase. Synthetische penicillines zoals natriumcloxaciline worden mogelijk niet geïnactiveerd door penicillinase onder de omstandigheden van de proef en kunnen daarom worden ingedeeld bij andere groeiremmende bacteriën dan penicilline.
- Opmerking*
- Andere bacteriegroeiremmende stoffen dan penicilline kunnen desgewenst met daartoe geschikte methoden worden geïdentificeerd.
8. *Bepaling van het penicillinegehalte*
- 8.1. De bepaling van het penicillinegehalte kan worden uitgevoerd door opstelling van een ijkcurve of door berekening uit de afmetingen van de zones die zijn verkregen bij de standaardoplossingen van penicilline in melk (punt 5.2, onder a) tot en met d)).

8.2. *Opstelling van een ijkcurve*

Daar er een lineaire correlatie bestaat tussen de $^{10}\log$ van de penicillineconcentratie en de diameter van de remmingszones kan de ijkcurve op semi-logaritmisch papier worden uitgezet met de penicillineconcentraties op de logaritmische x-as en de afmeting van de remmingszones op de x-as. De remmingszones worden berekend als het gemiddelde van bepalingen in duplo. De diameters van de remmingszones worden uitgezet ten opzichte van de concentraties penicilline in de standaardoplossingen en de ijkcurve wordt getrokken.

8.3. *Berekening*

De penicillineconcentraties in de melkmonsters worden via de diameter van de bijbehorende remmingszones bepaald met behulp van de vergelijking of de ijkcurve. Voor een nauwkeurige uitkomst moet de straal van de remmingszones ten minste tweemaal zo groot zijn als de straal van de schijfjes, maar niet meer dan vijfmaal zo groot.

9. *Weergave van de resultaten*

9.1. De resultaten worden weergegeven als een penicillinegehalte gelijk aan of groter dan 0,004 µg/ml (of door het aangeven van de vastgestelde concentratie) of als een gehalte aan andere inhibitoren dan penicilline.

9.2. *Herhaalbaarheid (r) en reproduceerbaarheid (R)*

Hiervoor zijn geen getallen beschikbaar en dit zou ook niet zinvol zijn, daar een standaard voor vergelijking is opgenomen.

IX. AANTONEN VAN PATHOGENE MICRO-ORGANISMEN**1. Onderwerp en toepassingsgebied**

Deze procedure bevat in overeenstemming met de eis in bijlage A, hoofdstuk VII, punt 2, van Richtlijn 85/397/EEG de instructies die moeten worden gevolgd om gepasteuriseerde melk te controleren op pathogene micro-organismen.

2. Definitie

Er moet onderzoek worden uitgevoerd naar bacteriesoorten die het meest frequent voedselinfecties veroorzaken.

Pasteurisatie is een behandeling die een waarborg biedt tegen de aanwezigheid van niet-thermo-resistente pathogenen in melk. Als aan de normen die in bijlage A, hoofdstuk VII, punt 2, van Richtlijn 85/397/EEG zijn vastgelegd voor het kiemgetal bij 30 °C en 21 °C, voor fosfatase en voor micro-organismen van de coligroep, is voldaan, is specifiek onderzoek op pathogenen alleen nodig als er een verband tussen melk en een geval van voedselvergiftiging wordt vermoed.

3. Werkwijze

Methoden en frequenties van onderzoek moeten door de nationale instanties zodanig worden vastgesteld dat het mogelijk wordt om gezondheidscertificaten af te geven voor warmtebehandelde melk voor de handel binnen de Gemeenschap. Voor vaststelling van pathogene micro-organismen moeten de criteria en methoden worden toegepast die internationaal zijn aanvaard.

4. Verslag van de resultaten

Voor elk pathogeen micro-organisme waarnaar onderzoek is gedaan, moet het resultaat op de volgende wijze worden weergegeven: het aantal per ml melk, of „aanwezig” of „afwezig” in het voor de gebruikte methode vereiste volume gepasteuriseerde melk.

Het verslag moet de gebruikte methode duidelijk beschrijven.
