


L194 R004  <b>Werkvoorschrift</b>	nummer : <b>8140-5-420</b>	pagina nummer : 1 van 9
	versie : 1	pagina revisie : 1
	<b>Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater</b>	

<b>auteur(s)</b> : G. Stroomberg en S. Rotteveel  <b>autorisator</b> : J. Staeb	<b>datum vrijgave</b> : 29-05-07  <b>beheerder</b> : J. van den Noort
---	---


versie beheer		pagina revisiebeheer					
versie nummer	datum vrijgave	pagina nummer	pagina revisie	datum vrijgave	pagina nummer	pagina revisie	datum vrijgave
1	29-05-07						

## Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater met de Water-SCAN


handmatige wijzigingen				
pagina nummer	hoofdstuk/paragraaf	datum doorvoering	omschrijving van de handmatige wijziging	paraaf autorisator

De vigerende documenten van het kwaliteitssysteem van de laboratoria en de afdeling kwaliteitszorg zijn beschikbaar in het kennismanagementsysteem Livelink.

Gebuikers van via Livelink afgedrukte kwaliteitsdocumenten zijn zelf verantwoordelijk voor het verifiëren van de status van deze papieren documenten door middel van vergelijking van het versienummer en de datum van vrijgave.


L194 R004   werkvoorschrift	nummer : <b>W 8140-5-420</b>	pagina nummer : 2 van 9
	versie : 1	pagina revisie : 1
	<b>Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater</b>	

Wijzigingen in deze versie ten opzichte van de vorige versie:

L194 R004   <b>werkvoorschrift</b>	nummer : <b>W 8140-5-420</b>	pagina nummer : 3 van 9
	versie : 1	pagina revisie : 1
	<b>Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater</b>	

## INHOUDSOPGAVE

<b>1</b>	<b>DOEL EN TOEPASSINGSGBIED .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>BEGINSEL .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>ANALYTISCHE KENGROOTHEDEN .....</b>	<b>5</b>
3.1	VALIDATIE VAN DE METHODE .....	5
3.2	AANPASSING VOOR OPPERVLAKTE- EN AFVALWATER .....	5
3.3	PRESTATIEKENMERKEN .....	5
<b>4</b>	<b>CHEMICALIËN EN REFERENTIEMATERIALEN .....</b>	<b>5</b>
4.1	OVERZICHT VAN GRONDSTOFFEN EN PRIMAIR REFERENTIEMATERIAAL .....	5
<b>5</b>	<b>APPARATUUR EN HULPMIDDELEN .....</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>WERKWIJZE EXTRACTIE .....</b>	<b>6</b>
6.1	ARBEIDSOMSTANDIGHEDEN .....	6
6.2	MONSTERACCEPTATIE EN MONSTERBEHEER .....	6
6.3	MONSTERVOORBEHANDELING EN OMSCHRIJVING PROCEDUREBLANCO .....	6
<b>7</b>	<b>WERKWIJZE RIKILT WATER-SCAN .....</b>	<b>7</b>
7.1	ARBEIDSOMSTANDIGHEDEN .....	7
7.2	DE ORIGINELE RIKILT PLAATTEST .....	7
7.3	DE 96-WELLS TEST .....	7
<b>8</b>	<b>RAPPORTAGE VAN DE ANALYSERESULTATEN .....</b>	<b>8</b>
8.1	DE ORIGINELE RIKILT PLAATTEST .....	8
8.2	DE 96-WELLS TEST .....	8

L194 R004	 werkvoorschrift	nummer : W 8140-5-420	pagina nummer : 4 van 9
		versie : 1	pagina revisie : 1
		Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater	


## 1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

De beschreven methode is toepasbaar op de bepaling van het gehalte van de 48 hieronder genoemde antibiotica in ongefiltreerde oppervlaktewatermonsters. De gevolgde methode is een huismethode.

Tabel: Overzicht antibiotica in de Water-SCAN

Plaat	Stofgroep/Plaat	Stof	Indicatieve aantoonbaarheidsgrens	
			In water (µg/l)	Absoluut (ng) <sup>a</sup>
Tetracyclines	Tetracyclines	Oxytetracycline	50	12,5
Tetracyclines	Tetracyclines	Doxycycline	20	5
Tetracyclines	Tetracyclines	Chloortetracycline	10	2,5
Tetracyclines	Tetracyclines	Tetracycline	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Ciprofloxacin	20	5
Quinolonen	Quinolonen	Flumequine	100	25
Quinolonen	Quinolonen	Enrofloxacin	20	5
Quinolonen	Quinolonen	Danofloxacin	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Marbofloxacin	20	5
Quinolonen	Quinolonen	Oxolinezuur	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Sarafloxacin	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Difloxacin	100	25
Macroliden	Cephalosporines	Cefquinome	200	50
Macroliden	Cephalosporines	Cefapirin	200	50
Macroliden	Cephalosporines	Cefalexine	1500	375
Macroliden	Cephalosporines	Ceftiofur	200	50
Macroliden	Cephalosporines	Cefacetril	25	6,25
Macroliden	Cephalosporines	Cefalonium	-	-
Macroliden	Cephalosporines	Cefazolin	-	-
Macroliden	Cephalosporines	Cefoperazone	-	-
Macroliden	Penicillines	Amoxicilline	50	12,5
Macroliden	Penicillines	Cloxacilline	1000	250
Macroliden	Penicillines	Dicloxacilline	1000	250
Macroliden	Penicillines	Oxacilline	200	50
Macroliden	Penicillines	Ampicilline	25	6,25
Macroliden	Penicillines	Penicilline	25	6,25
Macroliden	Penicillines	Nafcilline	50	12,5
Macroliden	Penicillines	Penethamaat	25	6,25
Macroliden	Macroliden	Tylosine	100	25
Macroliden	Macroliden	Lincomycine	50	12,5
Macroliden	Macroliden	Tilmicosin	10	2,5
Macroliden	Macroliden	Erythromycine	5	1,25
Macroliden	Macroliden	Spiramycine	50	12,5
Macroliden	Macroliden	Pirlimycine	25	6,25
Macroliden	Macroliden	Oleandomycine	50	12,5
Macroliden	Macroliden	Valnemuline	100	25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Spectinomycine	10000	2500
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Neomycine	25	6,25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Kanamycine	50	12,5
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Gentamicin	15	3,75
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Aminosidine	25	6,25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Dihydrostreptomycine	25	6,25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Apramycine	100	25
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfadoxine	100	35
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfadiazine	100	35
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfamethoxazole	50	17,5
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfadimethoxine	50	17,5
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfamethazine	100	35
Sulfonamiden	Dapsone	Dapsone	1	0,35
Sulfonamiden	Di-amino-pirimidinen	Baquiloprim	25	8,75
Sulfonamiden	Di-amino-pirimidinen	Trimethoprim	10	3,5

<sup>a</sup> 250 µl van een oplossing op het niveau van de aantoonbaarheidsgrens komt overeen met deze absolute hoeveelheid antibioticum. N.B.: op de Sulfonamiden-plaat wordt 350 µl opgebracht, de absolute aantoonbaarheidsgrens is daarom hoger.

L194 R004   <b>werkvoorschrift</b>	nummer : <b>W 8140-5-420</b>	pagina nummer : 5 van 9
	versie : 1	pagina revisie : 1
	<b>Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater</b>	

## 2 **BEGINSEL**

De te analyseren stoffen worden met behulp van solid phase extractie (SPE) met methanol uit het oppervlaktewater geëxtraheerd. Analyse van het SPE-eluaat wordt uitgevoerd middels bacteriestammen die selectief gevoelig voor specifieke antibioticaklassen. De bacteriën zijn geënt in agar. Door het extract in contact te brengen met de agar diffundeert de doelstof in de agar en remt de groei van de aanwezige bacteriën. Groeiremming wordt (visueel of spectrofotometrisch) waargenomen als een heldere (onbegroeide) zone in de agar.

## 3 **ANALYTISCHE KENGRÖÖTHEDEN**

### 3.1 **Validatie van de methode**

RIKILT gebruikt deze methode voor het testen van vlees en melk op de aanwezigheid van antibiotica. Als zodanig is de methode gevalideerd voor het testen van deze levensmiddelen. RIKILT levert de plaat test aan slachterijen en de Voedsel en Warenautoriteit voor het routinematig screenen van levensmiddelen.

### 3.2 **Aanpassing voor oppervlakte- en afvalwater**

Zie RIZA werkdocument W2006.084X: "Antibiotica in oppervlakte- en afvalwater - Toepassing van de RIKILT Meat-SCAN op extracten van oppervlakte- en afvalwater.", Gerard Stroomberg, Serge Rotteveel, Arno Bouter, Jordan Tiesnitsch en Joan Staeb, 18 april 2006. Dit rapport beschrijft de aanpassing van de bestaande RIKILT methode voor toepassing op oppervlakte- en afvalwatermonsters.

### 3.3 **Prestatiekenmerken**

De aantoonbaarheids grenzen van de oorspronkelijke methode zijn weergegeven in de tabel hierboven. Omdat deze methode primair als screeningsmethode wordt gebruikt is geen uitgebreide validatie gedaan. Ieder positief resultaat moet worden geverifieerd middels additioneel onderzoek bijvoorbeeld middels LC-MS.

## 4 **CHEMICALIËN EN REFERENTIEMATERIALEN**

### 4.1 **Overzicht van grondstoffen en primair referentiemateriaal**

Gebruik alleen reagentia en hulpstoffen van analytisch zuivere kwaliteit en milliQ-water.

Volgnummer	Stofnaam	Fabrikant	Artikel nummer	Zuiverheid
4.1.1	Methanol	Baker	8045	0.998

## 5 **APPARATUUR EN HULPMIDDELEN**

5.1 Indampopstelling voor puntbuizen voor indampen van methanol met stikstof


5.2 Supelco (Sigma-Aldrich) ENVI-Chrom P SPE kolommen (bestelnr. 57225-U), **in glas**

5.3 Glazen SPE opzetstukken met teflon adapters

5.4 SPE opstelling

- SPE kolomhouder, voorzien van kraantjes
- houder voor SPE opzetstukken
- opvangbak
- vacuüm opstelling

5.5 Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en benodigdheden

L194 R004   <b>werkvoorschrift</b>	nummer : <b>W 8140-5-420</b>	pagina nummer : 6 van 9
	versie : 1	pagina revisie : 1
	<b>Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater</b>	

## 6 WERKWIJZE EXTRACTIE

### 6.1 Arbeidsomstandigheden

Werk altijd met handschoenen en een laboratoriumjas aan. Voer handelingen in de zuurkast uit. Methanol werkt prikkelend op de ogen, de huid en de ademhalingsorganen en zijn schadelijk of giftig. Raadpleeg over dit oplosmiddel het veiligheidshandboek.

### 6.2 Monsteracceptatie en monsterbeheer

De monsters dienen in een groene fles met een inhoud van 1000 ml (5J), zonder luchtbel en gekoeld te worden aangeleverd. De monsters dienen uiterlijk 7 dagen na de bemonstering te worden zeker gesteld. Dit zeker stellen kan door extractie of door invriezen van de monsters (zie werkvoorschrift W8140 5.010). Extracten zijn minimaal 1 jaar houdbaar bij  $-20^{\circ}\text{C}$

### 6.3 Monstervoorbehandeling en omschrijving procedureblanco

#### 6.3.1 Monstervoorbehandeling

De monsters worden bij binnenkomst bewaard in de koelkast bij  $4^{\circ}\text{C}$  en dienen uiterlijk binnen 7 dagen na bemonstering te worden geëxtraheerd. De opwerking dient op één dag te gebeuren. Indien er later wordt opgewerkt, dient er contact te worden opgenomen met de seniormedewerker of het labhoofd. Het methanol extract is 1 jaar houdbaar bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Het te gebruiken glaswerk (m.u.v. de glazen opzetstukjes) dient voor gebruik met methanol gespoeld te worden.

Solid phase extractie Antibiotica	
Conditionering	15 ml methanol, 15 ml water
Adsorptie	1000 ml monster onder vacuüm
Drogen	2 min. onder vacuüm
Desorptie	5 ml methanol
Na desorptie	Methanol indampen tot 1 ml

#### **Conditionering SPE kolom**


Plaats de ENVI-Chrom P kolom in de SPE-opstelling en plaats daarbovenop een met methanol gespoeld opzetstuk.

**Tijdens de conditionering mag de kolom niet droogvallen!** Spoel de opstelling grondig met 15 ml methanol, de methanol moet minstens 5 minuten in contact te staan met het kolommateriaal. Spoel op dezelfde wijze de kolommen met 5 ml milliQ-water en vul daarna 2/3 van de SPE-kolom gevuld met milliQ-water.

**Opbrengen monster (adsorptie).** Homogeniseer het monster en neem middels een maatcilinder 1 liter hieruit. Giet vanuit de maatcilinder het monster over in een opzetstuk. Leidt het monster over de SPE kolom heen. Voer het vacuüm langzaam op tot een lichte onderdruk. De maximale snelheid is ca. 2 druppels per seconde (minimaal een half uur voor 200 ml). Controleer regelmatig de druppelsnelheid en leeg tussentijds de erlenmeyer van het vacuüm. Vul het opzetstuk regelmatig bij totdat 1 liter monster is opgebracht.

**Spoelen opzetstuk.** Nadat het gehele monster over de kolom is geleid, kan het opzetstuk worden verwijderd. Spoel het opzetstuk **direct** na gebruik met water, zodat het wordt ontdaan van alle vaste deeltjes uit het monster. Spoel het opzetstuk schoon m.b.v. methanol. Haal de teflon adapter van het opzetstuk en spoel deze met water en methanol.

**Drogen.** Droog de SPE kolom door m.b.v. een zo groot mogelijke onderdruk gedurende 2 minuten.

L194 R004  <b>werkvoorschrift</b>	nummer : <b>W 8140-5-420</b>	pagina nummer : 7 van 9
	versie : 1	pagina revisie : 1
	<b>Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater</b>	

**Desorptie en indampen.** Spoel een lege puntbuis met stop 3x met methanol en droog deze met stikstof. Weeg de puntbuis (met stop) nauwkeurig (op 0,1 mg) af. Plaats de buis onder de kolom m.b.v. een houder. Houdt de juiste stop bij de juiste puntbuis.

Voeg 5 ml methanol toe, totdat al het kolommateriaal in contact staat met methanol. Draai het kraantje dicht en wacht 5 minuten. Laat de methanol in de puntbuis stromen en spoel met 1 ml methanol na. Damp het methanol extract in tot minder dan 1 ml (maar niet droog!). Controleer het gewicht en vul eventueel aan met methanol tot een volume van 1 ml (= 0,791 g nettogewicht).

Bewaar de vial bij 4°C, tot het moment van analyseren. Het extract is 2 maanden houdbaar.

### 6.3.2 Procedureblanco

Volg de bovenstaande werkwijze. Gebruik milliQ-water i.p.v. het oppervlaktewatermonster.

## 7 WERKWIJZE RIKILT WATER-SCAN

De Water-SCAN kan in twee formats worden uitgevoerd. In het originele format wordt het extract 2x verdund in een uitsparing in de geënte agar gebracht. Er ontstaat een groeiremmingszone die visueel waarneembaar is en eventueel met een digitale camera kan worden vastgelegd voor rapportage. [N.B. Voor specifieke details wordt verwezen naar het bijgeleverde RIKILT voorschrift]. In het tweede format is de geënte agar in een 96-wells plaat uitverdeeld. In een lege testplaat worden de te testen verdunningen van het monster aangemaakt. Hierbij worden de methanol extracten 2-voudig verdund. Vanuit deze plaat wordt per well een hoeveelheid monster op de testplaat met agar gepipeteerd. Vervolgens wordt een verdunningsserie gemaakt. Het resultaat wordt gemeten middels een platerader. Het verschil in absorptie bij 600 nm na 24 uur incuberen is een (inverse) maat voor de groeiremming.

### 7.1 Arbeidsomstandigheden


Werk altijd met handschoenen en een laboratoriumjas aan. Methanol werkt prikkelend op de ogen, de huid en de ademhalingsorganen en zijn schadelijk of giftig. Raadpleeg over dit oplosmiddel het veiligheidshandboek.

### 7.2 De originele RIKILT plaattest

Van het verkregen extract wordt 750 µl methanol verdund met 750 µl in een glazen HPLC vial. Van het verdunde extract wordt op elke plaat 250 µl in één van de uitsparingen in de agar gepipetteerd (in de sulfanomiden plaat 350µl). Van de bijgeleverde opdruppel vloeistof wordt 1 druppel bij het verdunde extract gedruppeld. [Let op: Iedere plaat heeft zijn eigen specifieke opdruppelvloeistof]. Reserveer één uitsparing voor een negatieve controle en één voor een positieve controle. Als negatieve controle kan een geëxtraheerd milliQ-water worden gebruikt of alleen methanol. De positieve controle wordt door RIKILT meegeleverd en dient om de gevoeligheid van de plaat te kunnen borgen. Incubeer de platen gedurende 24 uur bij de door RIKILT voorgeschreven temperatuur (30 °C of 37°C).

### 7.3 De 96-wells test

Maak van iedere opdruppel vloeistof een 5-voudige verdunning door 3 ml vloeistof aan te vullen tot 15 ml. Neem een lege 96-wells plaat en pipetteer in iedere well 100 µl verdunde vloeistof. Pipetteer 100 µl methanolextract (of positieve/negatieve controle) in een well in kolom 1. Reserveer A1 voor de negatieve controle en H1 voor de positieve controle. Pipeteer (wanneer alle wells in kolom 1 gevuld zijn) met een multi-pipet vervolgens 100 µl uit kolom naar kolom 2. [Zuig éénmaal op en druk weer leeg vóór iedere doorverdunning om de well inhoud goed te mengen.] Pipetteer vervolgens 100 µl uit kolom 2 naar kolom 3 enz. tot kolom 10. Aan kolom 11 en 12 wordt niets toegevoegd.

L194 R004   <b>werkvoorschrift</b>	nummer : <b>W 8140-5-420</b>	pagina nummer : 8 van 9
	versie : 1	pagina revisie : 1
	<b>Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater</b>	

Pipetteer met een multipipet 70 µl uit ieder well uit de verdunningsplaat over op de agar in de RIKILT 96-wells plaat. Meet de absorptie van iedere well met de plate reader (zie apparaatvoorschrift plate reader) bij 600 nm (T0).

Incubeer 24 uur bij de voorgeschreven temperatuur. Meet de absorptie bij 600 nm (T24direct).

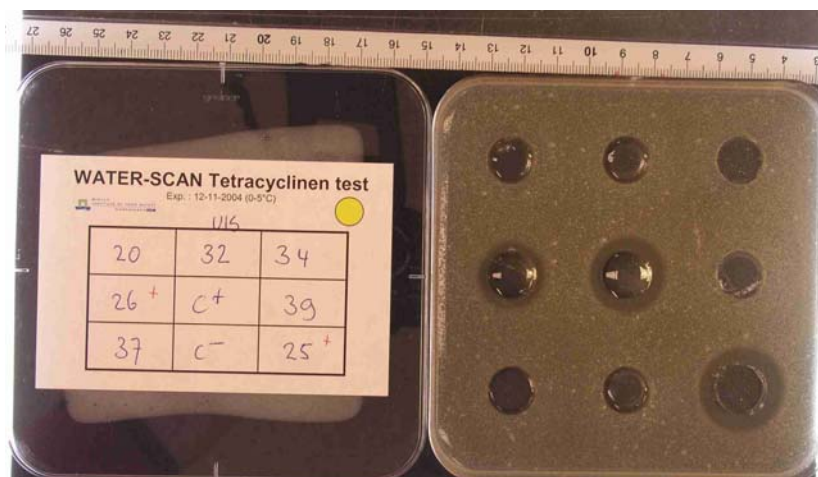
Controleer de plaat visueel op eventuele infecties. Deze zijn zichtbaar als een witte waas. Spoel de plaat in leidingwater en meet nogmaals de absorptie (T24spoel).

## 8 **RAPPORTAGE VAN DE ANALYSERESULTATEN**

Eventuele bijzonderheden over monstervoorbereiding en/of -analyse moeten vermeld worden.

### 8.1 **De originele RIKILT plaattest**

Meet de remmingzones handmatig op of maak een digitale foto waarbij een liniaal in het beeldveld zichtbaar is, zie voorbeeld hieronder. Noteer eventuele bijzonderheden.



### 8.2 **De 96-wells test**

Bereken T24 – T0. Plot zowel “direct” als “spoel” tegen de verdunningsfactor. Indien er infecties zijn waargenomen is het “spoel” resultaat het best te interpreteren.

Groeiremming wordt geconstateerd wanneer het geteste extract remming vertoont dat sterker is dan dat in de negatieve (methanol) controle. De laatste kolommen van zowel de positieve als de negatieve controle moeten ongeremde groei vertonen. De eerste kolommen van de positieve controle moeten remming vertonen [T0 – T24 =< 0].

Het resultaat wordt visueel beschreven met een dosis/effectcurve, zie onder. Daarnaast wordt de hoogste verdunning die maximale remming vertoont (in het voorbeeld hieronder factor 32) en de laagste verdunning die geen remming vertoont (hieronder factor 16) beschreven.

L194  
R004



nummer : W 8140-5-420

pagina nummer : 9 van 9

versie : 1

pagina revisie : 1

**Antibiotica Screening in Oppervlakte- en Afvalwater**

Macroliden plaat

