

J 57

JORD- OCH SKOGSBRUKSMINISTERIET

FÖRORDNING nr 21/VLA/2001

Datum 4.6.2001

Dnr 994/00/2001

Ikraftträdelse- och giltighetstid 18.6.2001 - tills vidare

Upphäver

Jord- och skogsbruksministeriets cirkulär nr 198 av den 14 maj 1982 om påvisande av antibiotika och kemoterapeutika vid köttbesiktning

Bemyndigande

55 och 56 § lagen om livsmedelshygien i fråga om animaliska livsmedel (1195/1996, ändr. 1121/1998, 803/1999, 664/1999 och 1112/2000) 1 § förordningen om livsmedelshygien i fråga om animaliska livsmedel (1336/1996, ändr. 683/1998 och 102/2001)

Ärende

PÅVISANDE MED MIKROBIOLOGISK METOD AV MIKROBLÄKEMEDELSSUBSTANSER VID KÖTTBESIKTNING

1 §

Tillämpningsområde

Jord- och skogsbruksministeriet utfärdar i denna förordning och dess bilaga bestämmelser om påvisande med mikrobiologisk metod av mikrobläkemedelssubstanser vid köttbesiktning och om provtagning i anslutning därtill. Den undersökningsmetod som beskrivs i denna förordning används vid besiktning av kött från nötkreatur, hovdjur, svin, får och getter. I tillämpliga delar kan metoden även användas vid besiktning av kött från renar och andra hägnade däggdjur.

2 §

Definitioner

I denna förordning avses med

1. mikrobläkemedelssubstans

en läkemedelssubstans som hindrar mikrober (bakterier, svampar, virus och protozoer) från att föröka sig eller som dödar mikrober och som är antingen ett antibiotikum som producerats av mikroorganismer eller ett ämne som framställts på kemisk väg,

2. högsta tillåtna restkoncentration

(HTR, MRL) den högsta tillåtna mängden läkemedelssubstans i animaliska livsmedel. Gränsvärdena för högsta tillåtna restkoncentration finns angivna i rådets förordning (EEG) nr 2377/90 av den 26 juni 1990 om inrättandet av ett gemenskapsförfarande för att fastställa gränsvärden för högsta tillåtna restmängder av veterinärmedicinska

läkemedel i livsmedel med animaliskt ursprung jämte ändringar.

3. kött

alla delar av nötkreatur, hovdjur, svin, får och getter som lämpar sig som livsmedel,

4. penicillinaskänsligt penicillin

V- och G-penicillin, ampicillin och amoxycillin,

5. makrolider

läkemedel som hör till gruppen makrolider, såsom erytromycin, spiramycin och tylosin,

6. aminoglykosider

läkemedel som hör till gruppen aminoglykosider, såsom streptomycin, dihydrostreptomycin, gentamicin och tobramycin, och

7. sulfonamider

läkemedel som hör till gruppen sulfonamider, såsom sulfadoxin, sulfadiazin och sulfamethazin.

3 §

Samband med andra författningar

Om köttbesiktning och bedömning av kött bestäms i jord- och skogsbruksministeriets förordning av den 19 april 2001 om köthygien nr 16/VLA/2001 (köthygienförordningen). I jord- och skogsbruksministeriets anvisning av den 4 mars 1996 om bedömning av kött och åtgärder i anslutning till köttbesiktning nr 9/VLA/1996 jämte ändringar ges rekommendationer om när undersökning skall utföras för att påvisa användning av mikrobläkemedelssubstanser. I jord- och skogsbruksministeriets förordning av den 21 mars 2001 om främmande ämnen i animaliska livsmedel nr 13/VLA/2001 (förordning om främmande ämnen) utfärdas bestämmelser om övervakningen av förekomsten av främmande ämnen samt om högsta tillåtna mängder av vissa främmande ämnen i animaliska livsmedel.

Om kompetensen hos sådana laboratorier som utför undersökningar i samband med köttbesiktning bestäms i jord- och skogsbruksministeriets beslut av den 13 maj 1998 om laboratorier som utför undersökningar av animaliska livsmedel (340/1998) jämte ändringar.

Vid misstanke om förekomst av antimikrobiska läkemedel skall köttet i enlighet med punkt 17 i kapitel 2 i bilaga 3 till köthygienförordningen undersökas på förekomsten av dessa. En sådan undersökning skall också alltid utföras i samband med bakteriologisk undersökning.

Enligt underpunkt q till punkt 22 i kapitel 3 i bilaga 3 till köthygienförordningen skall slaktkroppen och biprodukterna kasseras då ett positivt resultat i fråga om förekomsten av rester av läkemedel i slaktkroppen har konstaterats genom en laboratorieundersökning. Slaktkroppen kasseras dock inte om en mikrobiologisk undersökning ger ett positivt resultat i fråga om rester av läkemedel endast beträffande njurarna och resultatet av en undersökning av muskelvävnaden som utförts samtidigt är negativt.

Om en mikrobiologisk undersökning av njurarna ger ett positivt resultat i fråga om förekomsten av

rester av läkemedel, skall inälvorna enligt underpunkt d till punkt 25 i kapitel 3 i bilaga 3 till kötthygienförordningen kasseras. Inälvorna kasseras även om ett prov som har tagits från muskelvävnaden är negativt.

4 §

Ikraftträdelse- och övergångsbestämmelse

Denna förordning träder i kraft den 18 juni 2001.

Denna förordning tillämpas på prov som har tagits efter att den har trätt i kraft.

Jord- och skogsbruksminister
Kalevi Hemilä

Veterinärinspektör
Susanna Kangas

INNEHÅLL

BILAGA **PÅVISANDE AV MIKROBLÄKEMEDELSSUBSTANSER VID KÖTTBESIKTNING**

1. ALLMÄNT

2. UTRUSTNING OCH MATERIAL

- 2.1. Utrustning och reagenser
- 2.2. Trimetoprimlösning
- 2.3. Sporsuspension
- 2.4. Näringssubstrat
- 2.5. Tillverkning av provskålar
- 2.6. Tillverkning av filterpapper med penicillinas

3. PROVTAGNING

4. UNDERSÖKNING AV PROVET

5. AVLÄSNING AV RESULTATEN

6. BEDÖMNING AV RESULTATEN

BILAGA **PÅVISANDE AV MIKROBLÄKEMEDELSSUBSTANSER VID KÖTTBESIKTNING**

1. ALLMÄNT

Med denna metod påvisas i samband med köttbesiktning sådana koncentrationer av

mikrobläkemedelssubstanser i kött som överstiger gränsvärdet för högsta tillåtna restkoncentration (HTR).

Förekomsten av rester av mikrobläkemedelssubstanser i kött undersöks med hjälp av agardiffusionsmetoden. Om det i en provbit finns ämnen som hindrar mikrobers tillväxt, sprider de sig i det omgivande näringssubstratet och hämmar testbakteriens tillväxt. Om provbiten innehåller ett ämne som hämmar bakteriernas tillväxt, bildas kring provbiten en inhiberingszon vars bredd mäts.

Restkoncentrationerna är i allmänhet högre i njurvävnad än i muskelvävnad. Genom undersökning av njurvävnad kan de flesta mikrobläkemedelssubstanser påvisas i form av koncentrationer som anger sådana koncentrationer som i muskelvävnad överskrider gränsvärdet för högsta tillåtna restkoncentration (HTR). Det är lättare att påvisa att det finns mikrobläkemedelssubstanser i kött genom att undersöka njurvävnad än genom att undersöka muskelvävnad.

För penicillin är metoden dock så känslig att koncentrationer på HTR-nivå kan påvisas genom undersökning av muskelvävnad. Vid undersökning av njurarna uppmäts penicillin i sådana koncentrationer som i muskelvävnad understiger HTR. Det finns också uppgifter om att aminoglykosider förorsakar långvariga restsubstanser i njurarna. Vissa mikrobläkemedelssubstanser, såsom sulfonamider och makrolider, kan inte konstateras på tillförlitligt sätt med denna metod, eftersom metoden inte är tillräckligt känslig för dessa ämnen.

2. UTRUSTNING OCH MATERIAL

2.1. Utrustning och reagenser

Utrustning:

Sterila petriskålar (Æ 90 mm)

Sterila pipetter, mikropipetter och mätflaskor

Sterila korkborrar (Æ 9 mm), knivar och pincetter

Sterila runda filterpapper (Æ 6 mm)

Värmeskåp ($+30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Apparat för mätning av inhiberingszonen (skjutmått, noggrannhet 0,1 mm)

Utrustning för bokföring av resultaten

Reagenser:

Trimetoprimlösning

Penicillintabletter som innehåller 5 mg G-penicillin

Penicillinaslösning som innehåller en miljon enheter per ml.

2.2. Trimetoprimlösning

Baslösningen framställs genom att 60 mg rent trimetoprim löses upp i 20 ml etanol och vidare i 80 ml sterilt, destillerat vatten. Trimetoprim löser sig långsamt. Baslösningen kan t.ex. fås på apotek. Då lösningen skyddas från ljus och uppbevaras i rumstemperatur är hållbarheten ca 2 veckor.

Brukslösningen framställs genom att baslösningen späds ut med sterilt, destillerat vatten i förhållandet 1:100. Brukslösningen håller i ca 2-3 dagar.

2.3. Sporsuspension

Vid tillämpning av metoden används BGA-stam av *Bacillus subtilis* som testorganism. Färdig sporsuspension av BGA-stam av *Bacillus subtilis* finns till salu på den öppna marknaden.

Sporsuspensionens koncentration skall vara $8 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ sporer/ml. Koncentrationen skall kontrolleras före användningen.

2.4. Näringssubstrat

Som näringssubstrat används testagar med pH 6,0 och 8,0. Båda näringssubstraten finns till salu på den öppna marknaden.

Då det näringssubstrat som används vid undersökningen har ett pH-värde på 6,0 är sammansättningen följande:

Köttpepton 3,45 g

Kaseinpepton 3,45 g

NaCl 5,1 g

Agar-agar 13,0 g

Destillerat vatten ad 1000,0 ml

Då det näringssubstrat som används vid undersökningen har ett pH-värde på 8,0 är sammansättningen följande:

Köttpepton 3,45 g

Kaseinpepton 3,45 g

NaCl 5,1 g

Agar-agar 13,0 g

Trinatriumfosfat-12-hydrat 2,4 g

Destillerat vatten ad 1000,0 ml

Näringssubstratets pH regleras vid behov med 1 mol/l HCl till värdet 6,0 och med 1 mol/l NaOH till värdet 8,0. Sådana agarprodukter med motsvarande sammansättning och ett pH färdigt reglerat till 6,0 eller 8,0 som finns till salu på den öppna marknaden kan användas vid tillämpning av metoden efter att pH-värdet har kontrollerats.

2.5. Tillverkning av provskålar

Till näringssubstraten, vilkas temperatur reglerats till $+47 \pm 2^\circ \text{C}$, sätts 0,1 ml av *Bacillus subtilis* BGA-sporsuspension per 100 ml näringssubstrat. Till det näringssubstrat vars pH är 8,0 sätts 1 ml

trimetoprimbrukslösning per 100 ml näringssubstrat, varvid trimetoprimkoncentrationen blir 0,06 mg/ml. Därefter gjuts näringssubstraten i petriskålar. I en skål hälls 10 ml näringssubstrat. De färdiga skålarna förvaras i tejpförslutna plastpåsar i kylskåp. Hållbarheten är då 5 dygn. Skålar med minsta lilla bakterietillväxt får inte användas vid undersökningen.

Funktionsdugligheten hos varje sats näringssubstrat skall kontrolleras. Detta sker på så sätt att man i åtminstone en skål ur varje sats näringssubstrat placerar en tablett med G-penicillin. Penicillintabletten borde i en skål med pH 6 åstadkomma en 14,5 -21 mm och i en skål med pH 8 en 13,5-20 mm bred inhiberingszon. Om inhiberingszonens storlek avviker från de föreskrivna gränserna, skall satsen i fråga förkastas.

2.6. Tillverkning av filterpapper med penicillinas

En ml av en lösning som innehåller en miljon enheter penicillinas per ml späds ut med 7 ml sterilt, destillerat vatten. Av denna lösning överförs 0,04 ml med pipett till det runda filterpapperet, varefter det i filterpapperet finns 5000 enheter penicillinas.

3. PROVTAGNING OCH PROVSÄNDNING

1. Provbitar av njurvävnad och muskelvävnad av ett slaktat djur skall tas så fort som möjligt efter slakt. Provbitar av njurvävnad skall bestå av åtminstone en tredjedel av njuren. Provbitar av muskelvävnad måste tas då det på basis av förhandsuppgifter eller andra uppgifter finns information eller misstankar om att djuret har behandlats med penicillinaskänsligt penicillin eller aminoglykosid. Provbitarna tas från hel muskelvävnad som inte innehåller mycket fett. Provbitarna får inte tas från sådana delar som visar förändringar. Provbitarna skall märkas tydligt och hållas åtskilda från varandra.
2. Vid provtagningen skall rena instrument användas och undersökningen skall utföras aseptiskt så fort som möjligt efter provtagningen. Om undersökningen emellertid blir fördröjd, måste provbitarna kylas ned. Temperaturen i provbitar av njurvävnad får dock inte sjunka under 0° C och provbitarna får inte heller djupfrysas. För att underlätta provtagningen med korkborr kan provbitar av muskelvävnad dock djupfrysas.
3. Om proven måste sändas till något annat laboratorium som inte ligger i anslutning till slakteriet, skall proven, innan de sänds iväg, kylas ned och packas i plastpåse vart för sig. Proven packas och sänds i väg med en så snabb transport som möjligt och på ett sådant sätt att inga väsentliga ändringar sker i provens temperatur under transporten, t.ex. i en kylväska med kylklampar.
4. Om det finns misstankar eller information om att djuret har behandlats med läkemedelspreparat som innehåller sulfonamider eller makrolider, görs en sådan undersökning som beskrivs i denna förordning. Muskelvävnads- och njurvävnadsproverna sänds direkt vidare till Forskningsanstalten för veterinärmedicin och livsmedel för kemisk undersökning för påvisande av sulfonamider eller makrolider.

4. UNDERSÖKNING AV PROVET

1. Av den njurvävnad eller muskelvävnad som skall undersökas tas med korkborr ut en provbit. Av provbiten klipps en ca 2 mm tjock rund skiva. Njurskivan skall bestå av ungefär lika mycket njurbark och njurmärg. Skivorna placeras i de båda skålarna med näringssubstrat (pH 6,0 och pH 8,0). Njurskivan placeras så att njurmärgen ligger mot agarn.
2. På det näringssubstrat vars pH är 6,0 placeras bredvid provbiten på ett avstånd av 2-3 mm från den ett runt filterpapper med penicillinas.

3. Skivorna inkuberas därefter 1 timme i rumstemperatur, varefter de flyttas till en temperatur på $+30 \pm 1^\circ \text{C}$ för 18-24 timmar.
4. Provbiten skall alltid så länge provet pågår förvaras i kylskåp för eventuell förnyad undersökning. För förnyad undersökning kan också nya provbitar tas av djuret.
5. Förnyad provundersökning rekommenderas när resultatet är positivt och när det inte uppges i förhandsuppgifterna att djuret behandlats med medicin. Provet kan också sändas till Anstalten för veterinärmedicin och livsmedel för fortsatta undersökningar.

5. AVLÄSNING AV RESULTATEN

1. Omedelbart efter inkuberingen mäts inhiberingszonens storlek med ett skjutmått från provbitens kant till inhiberingszonens kant. Den klara zon som finns runt provbiten räknas som inhiberingszon. På det klara område som räknas som inhiberingszon får det inte förekomma tillväxt av egentlig testorganism. Inhiberingszonen mäts på det bredaste stället.
2. Utanför den klara zonen kan dock ibland uppträda en tydligt urskiljbar, något grumligare zon. Som inhiberingszon räknas då förutom den klara zonen även den ovan nämnda grumligare zonen.
3. Om den klara zonen saknas helt och det runt provbiten endast förekommer en grumlig zon, anses provbiten inte innehålla mikrobläkemedelssubstanser.
4. Penicillinas hämmar penicillinaskänsliga penicilliners verkan. Inhiberingen märks av att den inhiberingszon som finns runt provbiten förlorar sin runda form i närheten av en penicillinasplatta. Om filterpapperen med penicillinas ändrar inhiberingszonens form, anses provbiten innehålla penicillinaskänsligt penicillin.
5. Tetracyklin åstadkommer en större inhiberingszon på näringssubstrat med pH 6,0 än på näringssubstrat med pH 8,0. Läkemedel som hör till gruppen aminoglykosider och makrolider åstadkommer i sin tur en större inhiberingszon på näringssubstrat med pH 8,0.

6. BEDÖMNING AV RESULTATEN

1. Om det på vartdera eller någotdera näringssubstratet runt njurbiten finns en inhiberingszon som är över 2 mm, anses provbiten innehålla mikrobläkemedelssubstanser i en koncentration som överskrider gränsvärdet för högsta tillåtna restkoncentration. Provresultatet är således positivt. Om inhiberingszonen är 2 mm eller mindre i båda skålarna, är provresultatet negativt.
2. Om mikrobläkemedelssubstansen i provbiten konstateras vara känslig för penicillinas, bedöms resultatet dock på basis av resultatet av muskelvävnadsprovet med iakttagande av gränsvärdena för inhiberingszonen enligt punkt 1 ovan. Om det finns uppgift om att djuret har blivit behandlat med ett läkemedel som hör till gruppen aminoglykosider, bedöms resultat för det läkemedlets del på basis av resultatet av muskelvävnadsprovet.