

Copyright 2001, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

marketing & communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Min. LNV, Directie VM (5x)

ABSTRACT

For the detection of tetracycline and quinolone residues in poultry a rapid and sensitive screening-system based on a direct bio-assay of muscle drip juice was developed and validated. The muscle drip juice is collected by heating (20 min. 64°C) and centrifugation of milled poultry meat and directly pipetted in 14 mm holes on two plates, namely, a *B.cereus* testplate for detection of tetracyclines and a *E.coli* testplate for quinolones.

For each test plate a so-called action level was proposed and the method was validated with respect to repeatability, coefficient of variation, detection limit and specificity.

It was stated that poultry muscle from which drip juice samples are exhibiting inhibition zones below the action levels for the test plates, will fulfil the EU maximal residue limits (MRL's) for all tetracyclines and quinolones.

INHOUD	blz.
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIALEN EN METHODEN	8
2.1 Standaarden	8
2.2 Monstermateriaal	8
2.3 Methoden	8
2.3.1 Materialen	8
2.3.2 Multi-plaatmethode	8
3 EXPERIMENTEEL DEEL	8
3.1 Optimalisatie van de monstervoorbewerking	8
3.2 Detectie m.b.v. multi-plaatmethode	9
3.3 Validatie van de methode	10
3.3.1 Methode van spike/voorbewerken	10
3.3.3.1 Dripsap	10
3.3.3.2 Water-vleeshomogenaten	10
3.3.2 De proefopzet/concentratireeksen	11
3.3.3 Statistische evaluatie	11
3.4 Praktijkmonsters	12
4 RESULTATEN	12
4.1 Tetracyclines (kippenvlees spikes)	12
4.1.1 Aantoonbaarheidsgrens	12
4.1.2 De precisie data	15
4.2 Tetracyclines (kip dripsap spikes)	16
4.2.1 Detectiegrens	16
4.2.2 De precisie data	18
4.3 Tetracyclines, vergelijken kalkoen en kip	18
4.3.1 Water-vleeshomogenaten	19
4.3.2 Dripsap spikes	20
4.4 Quinolonen (kippenvlees spikes)	20
4.4.1 Detectiegrens	20
4.4.2 De precisie data	24
4.5 Quinolonen (kip dripsap spikes)	25
4.5.1 Detectiegrens	25
4.5.2 De precisie data	26
4.6 Quinolonen, vergelijking kalkoen en kip	27
4.6.1 Water-vleeshomogenaten	27
4.6.2 Dripsap spikes	28
4.7 Groepsidentificatie en storingsanalyse	28
4.7.1 <i>B.cereus</i> testplaat tetracyclines	28
4.7.2 <i>E.coli</i> screenings- en bevestigingsplaat	29
4.8 Praktijkmonsters	29
4.8.1 Doxycycline	29
4.8.2 Flumequine	31

INHOUD (vervolg)

4.9	Geschiktheid voor praktijkonderzoek	31
5	DISCUSSIE	32
6	CONCLUSIES	32
7	LITERATUUR	34
	BIJLAGEN	

SAMENVATTING

In 1997/1998 is door het RIKILT een methode ontwikkeld voor het screenen van pluimveevlees op residuen van antimicrobiële middelen (o.a. tetracyclines en quinolonen, RIKILT rapport 98.512 (vertrouwelijk)). Deze methode is gebaseerd op onderzoek van vlees/water-homogenaten gecombineerd met specifieke stofgroep-voorbewerkingen en daardoor erg arbeidsintensief. In dit onderzoek is deze methode voor tetracyclines en quinolonen geoptimaliseerd m.b.t de monstervoorbewerking en gevalideerd (herhaalbaarheid, detectiegrens).

Er is een eenvoudige monstervoorbewerking ontwikkeld, waarbij vleesdripsap i.p.v. vlees/water-homogenaten als testmatrix gebruikt wordt. Dit dripsap wordt verkregen door pluimveefilet te malen, verhitten (20 min. ± 65°C) en af te draaien. Bij de uitvoering van het testsysteem, welke gebruikt maakt van een *B.cereus* testplaat voor tetracyclines en een *E.coli* testplaat voor quinolonen, wordt het dripsap direct in putjes van 250 µl gepipetteerd.

De validatie van deze screeningsmethode is gedaan met kipfilet waarbij concentratiereeksen in vlees/water homogenaat (1/1, W/v) en dripsap spikes onderzocht zijn. Vleeshomogenaten werden gebruikt als simulatiemodel voor het verkrijgen van homogeen verdeelde antibiotica residuen in spierweefsel. Verhitting ervan resulteert in een gestandaardiseerde manier van het verkrijgen van "dripsap". De in-vitro geteste antibiotica waren oxytetracycline, doxycycline, tetracycline, chloortetracycline, enrofloxacin, flumequine, danofloxacin, difloxacin en oxolinezuur.

Van alle antibiotica zijn concentratiereeksen rond EU MRL niveau in vlees/water homogenaat en dripsap gemaakt. Deze spike-monsters zijn voor start van de analyse 16-24 uur bij 0-5°C geplaatst om een zo optimale weefsel/dripsap binding te verkrijgen. De resultaten zijn gebruikt voor het bepalen van de herhaalbaarheid en detectiegrenzen in pluimveevlees en dripsap. De experimenten zijn in enkelvoud op 3 verschillende dagen uitgevoerd, waarbij de detectie in duplo is gedaan (2 verschillende platen) (n=6). Voor het bepalen van de herhaalbaarheid rond EU MRL niveau zijn op 2 niveau's 3 extra spikes meegenomen (n=24 per concentratie niveau). Rond EU MRL niveau zijn ook spikes in kalkoenfilet gemaakt (n= 24 per concentratieniveau) om de toepasbaarheid voor kalkoen te onderzoeken.

Tevens zijn 59 positieve praktijkmonsters onderzocht op tetracyclines (n=47) en quinolonen (n=12) met LC-MS of HPLC (kwantificatie- en bevestigingsonderzoek).

De weefsel spike-experimenten gaven zowel bij de kip als kalkoen aan dat alle antibiotica minimaal op EU MRL gedetecteerd worden. De detectiegrenzen zijn voor de tetracyclines: 25 µg/kg (oxytetracycline en tetracycline), 10 µg/kg (doxycycline, chloortetracycline) en voor de quinolonen: 200 µg/kg (flumequine), 5 µg/kg (enrofloxacin, danofloxacin en difloxacin) en 100 µg/kg (oxolinezuur). Hierbij waren de resultaten van de kip en kalkoenexperimenten goed vergelijkbaar. Direct spiken van dripsap (in-vitro test) verbeterde de gevoeligheid voor sommige componenten (o.a doxycycline) met een factor 2 vergeleken met spiken van water-vleeshomogenaten, indicierend dat bij deze stoffen ong. 50% van de antibiotica gebonden is aan het spierweefsel.

De relatieve herhaalbaarheid in de water-vlees homogenaten (n= 24) en dripsap (n= 24) varieerden van 2,5% tot 9,9% , en de relatieve binnen-lab reproduceerbaarheid (n=6 of n= 24)

van 2,9 % tot 18,5%. De precisie data waren tussen quinolonen en tetracyclines, tussen drip en water-vleeshomogenaat-spike en tussen kip en kalkoen goed vergelijkbaar en voldoen aan de EU richtlijn (7).

Op basis van de remzones is voor elke testplaat een zogenaamde "actiegrens" voorgesteld. Een remzone kleiner dan deze actiegrens garandeert dat de residu status van het pluimveevlees aan de EU MRL's voor tetracycline en quinolonen voldoet.

Monsters met remzones groter dan de "actiegrens" dienen met instrumentele analyses op EU MRL overschrijding gecontroleerd te worden. Vooral lage niveau's enrofloxacin, difloxacin en danofloxacin kunnen een positieve screening geven terwijl het gehalte ver onder EU MRL ligt. Ter evaluatie hiervan kan een tweede *E.coli* plaat ingezet worden. Deze stam is veel minder gevoelig voor deze stoffen (ong. een factor 10) en heeft een vergelijkbare gevoeligheid voor flumequine en oxolinezuur. Een differentiatie in actiegrenzen (afhankelijk van de identiteit) kan hiermee onnodige bevestigingen voorkomen.

1 INLEIDING

In de pluimveesector worden uit therapeutisch en preventief oogpunt antimicrobiële middelen koppelsgevijs via voer of drinkwater toegediend aan slachtkuikens. Veel gebruikte antimicrobiële middelen zijn de quinolonen (flumequine, enrofloxacin, difloxacin), tetracyclines (oxytetracycline, doxycycline), trimethoprim/sulfa-preparaten, amoxicilline- (al of niet gecombineerd met colistine), macroliden (erythromycine, spiramycine, tylosine) en lincomycine/spectinomycine-preparaten.

Voor de meeste van deze stoffen zijn EU maximale residu limieten (EU MRL's) opgesteld ter bescherming van de consument tegen deze stoffen. In tabel 1 staan de EU MRL's voor de tetracyclines en quinolonen.

Tabel 1: EU maximale residu limieten (EU MRL's) voor tetracycline en quinolonen in pluimveevlees

Groep	Stof	EU MRL (µg/kg)
Tetracycline	Oxytetracycline (OTC)	100
	Doxycycline	100
	Chloortetracycline	100
	Tetracycline	100
Quinolonen	Flumequine	400
	Enrofloxacin	100
	Difloxacin	300
	Danofloxacin	200
	Oxolinezuur	100

De officiële methode voor het aantonen van residuen van anti-bacteriële middelen in pluimveevlees is de EEG-4 platen test (1). Deze test schiet echter in relatie tot EU MRL's tekort in de detectie van aminoglycosiden, sulfonamiden, colistine, tetracyclines en quinolonen, en is dan ook niet bruikbaar als screeningsmethode. Daarom is in 1997, in het kader van programma 302 (project 71.511.30) (5), door het RIKILT een microbiologisch test systeem ontwikkeld om op MRL niveau de residuen van deze stoffen in kippenvlees te traceren (3). Het is een multi-plaat systeem en erg arbeidsintensief in de uitvoering vanwege de specifieke voorbereiding voor elke groep van antibiotica. Het destijds ontwikkelde microbiologisch test systeem voor kippenvlees werd in het residu onderzoek voor de consumentenbond toegepast (2), waarbij een relatieve hoge incidentie aan doxycycline en quinolone residuen in borstspierweefsel (met MRL overschrijdingen) gesignaleerd werd. De uiteindelijke kwantificering van de residuen in positieve monsters vond plaats met LC-MS.

De vermoedelijke oorzaak van de hoge incidentie is wellicht gelegen in een nog niet aangepaste wachtermijn voor de manier waarop doxycycline in het drinkwater wordt opgelost en/of vanwege recirculatie uit het strooisel en/of vanwege het vrijkomen van residuen uit het botweefsel. Tevens bleek uit recent onderzoek de Premi®test als alternatieve methode niet te voldoen (4).

De voornoemde microbiologische methode gaat uit van 1:1 mengsels (homogenaten) van water en pluimveevlees voor de detectie van quinolonen en tetracyclines. Nadeel hiervan is dat het

homogeniseren met water een verdunning geeft en dus een verhoging van de detectiegrens. Het gebruik van vlees of dripsap rechtstreeks heeft dit nadeel niet.

In dit rapport wordt de detectie van tetracyclines en quinolonen geoptimaliseerd, door gebruik te maken van een andere monstervoorbewerking (gebaseerd op dripsap) waardoor gevoeliger op residuen van deze stofgroepen gescreend kan worden. Tevens worden in dit rapport de precisiekenmerken (herhaalbaarheid, aantoonbaarheidsgrens, binnen lab-reproduceerbaarheid) van de methode weergegeven. Deze zijn gebaseerd op spike-monsters met gehalten aan tetracyclines en quinolonen rond EU MRL-niveau.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Standaarden

Antibiotica aangekocht met analysecertificaat en gecorrigeerd voor potentie werden opgelost in 5 ml 0,1 M NaOH (flumequine, enrofloxacin), 0,1 M zoutzuur (tetracyclines), eventueel geneutraliseerd met fosfaatbuffer pH 6 (tetracyclines) en aangevuld met water tot het gewenste volume (eindconcentraties rond de 50 µg/ml). Deze stockoplossingen werden bij 0-5°C gedurende maximaal 1 maand bewaard.

2.2 Monstermateriaal

Het gebruikte blanco pluimveevlees (kipfilet en kalkoenfilet) werd door RIKILT ingekocht bij een lokale supermarkt en vooraf getest op afwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen. De praktijkmonsters (met een bekend gehalte aan antibioticum bepaald met HPLC of LC-MS) waren afkomstig van eerdere RIKILT onderzoeken.

2.3 Methoden

2.3.1 Materialen

De voedingsbodems of componenten ervan, chemicaliën (p.a.), apparatuur, hulpmaterialen en testbacteriën, welke gebruikt zijn gedurende de ontwikkeling van de testen, zijn indien mogelijk, met analysecertificaat geleverd door gerenommeerde firma's o.a. Difco, Merck, Sigma, Oxoid. Indien van belang wordt de leverancier vernoemd in dit rapport.

2.3.2 Multi-plaatmethode

Deze methode staat beschreven in RIKILT Standaard Voorschrift (RSV A0710).

3 EXPERIMENTEEL DEEL

3.1 Optimalisatie van de monstervoorbewerking

Allereerst is getracht om schijfjes in ongemalen kipfilet te leggen om ze zodoende te laten impregneren met dripsap. Dit systeem bleek echter niet goed te voldoen. De gevoeligheid was onvoldoende, bovendien kwam er niet genoeg dripsap uit het vlees en was het moeilijk te standaardiseren. Vervolgens is overgestapt naar het verzamelen van dripsap. Getracht is om met simpele voorbewerkingen (knoflookpers, invriezen of verhittingsstappen bij verschillende temperaturen) een zo groot mogelijke hoeveelheid dripsap te verkrijgen. Hier bleek dat een

verhittingstap bij 64°C gedurende 20 minuten van 25 gram gemalen vlees het beste resultaat te geven. Wanneer deze verhittingstap direct in een centrifugebuis werd gedaan, die vervolgens bij 3000xg werd afgedraaid, dan was de opbrengst minimaal 2 ml dripsap. De hoeveelheden dripsap kunnen wel een factor 2 verschillen per filet (afhankelijk van het vochtgehalte van het vlees). Door sneller af te draaien, bijv. bij 20.000xg, kan meer (3-4 ml) dripsap verkregen worden. De benodigde hoeveelheid dripsap is minimaal 500 µl voor detectie van quinolonen en tetracyclines. Wanneer ook naar residuen van andere stofgroepen gekeken moet worden, dan is een aanzienlijk grotere hoeveelheid dripsap per monster nodig. De exact hoeveelheid is afhankelijk van de benodigde voorbewerking van het dripsap bij met name de groep van de aminoglycosiden en sulfonamiden.

3.2 Detectie m.b.v. multi-plaatmethode

De volgende testplaten (zie voor details tabel 1) zijn voor de detectie gebruikt/ontwikkeld:

- 1) *B.cereus* plaat: testkiem *B.cereus* ATCC 11778 voor opsporing van tetracyclines,
- 2) *E.coli* screeningsplaat: testkiem *E.coli* ATCC 11303 voor de opsporing van quinolonen
- 3) *E.coli* bevestigingsplaat: testkiem *E.coli* "Bayer"14 voor de bevestiging/differentiatie van quinolonen.

Bij de ontwikkeling van deze platen (zie ook RIKILT rapport 98.512) is gevarieerd in de samenstelling van de agar (verschillende merken, composities), dikte van de plaat, pH en incubatietemperatuur om de plaat zo gevoelig mogelijk te maken voor de betreffende antibiotica-groep zonder vals-positieve uitslagen te verkrijgen. De uiteindelijke optimale samenstelling is weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Samenstelling testplaten van de multi-plaatmethode

Naam testplaat	Indicator Bacterie	Samenstelling voedingsbodem	Agardikte (mm)	pH	Incubatie temp. (°C)	Doelgroep
<i>B.cereus</i> testplaat	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	Standard II Nähr +0,1%KH ₂ PO ₄ +0,75 µg Chlooramphenicol (CAP) / ml agar	2,0	6,0	30	Tetracyclines
<i>E.coli</i> screeningsplaat	<i>E.coli</i> ATCC 11303	PCA + 0,2% vleesextract	2,0	6,5	30	Quinolonen
<i>E.coli</i> bevestigingsplaat	<i>E.coli</i> "Bayer"14	PCA + 0,2% vleesextract	2,0	7	30	Quinolonen

Het dripsap is direct in putjes geponst uit agar in de testplaten gepipetteerd. Hierbij is gevarieerd in de hoeveelheid en putjesgrootte om zo'n optimaal mogelijke gevoeligheid te verkrijgen. Bovendien is het effect van het indruppelen van diverse buffers en synergistische antibiotica onderzocht (zie ook RIKILT rapport 98.512). De combinaties die uiteindelijk de beste resultaten bleken te geven staan vermeld in tabel 2. De methode staat in detail beschreven in RSV A0710.

Tabel 2: Optimale testcondities per testplaat

Testplaat	Diameter putjes (mm)	Testvolume dripsap (μ l)	Bijdruppeling
<i>B.cereus</i> testplaat	14	225	25 μ l 20 μ g Chlooramfenicol (CAP)/ml 1M fosfaatbuffer pH 6,0
<i>E.coli</i> screeningsplaat	14	250	-
<i>E.coli</i> bevestigingsplaat	14	225	25 μ l 1 M fosfaatbuffer pH 6,0

De algemene procedure voor bereiden testplaten was:

Geautoclaveerde (15', 121°C) agar afgekoeld tot 50°C werd op pH gebracht, eventuele supplementen toegevoegd en beënt met bacteriesporen of -cellen ($\pm 10^5$ - 10^6 kolonievormende eenheden/ml agar). Vervolgens werd de beënte agar in bio-assay platen (245*245*20 mm) uitgegoten met een agardikte van 2,0 mm. Na stolling van de agar werden putjes van 14 mm uit de agar geponst. In ieder putje werd 225 of 250 μ l dripsap gepipetteerd. Afhankelijk van de testplaat werd er eventueel 25 μ l buffer of CAP-oplossing bijgepipetteerd. Na een half uur voordiffusie bij kamertemperatuur is er overnacht bij 30°C geïncubeerd. Vervolgens zijn de remzones op 0,1 mm nauwkeurig gemeten.

3.3 Validatie van de methode

De detectiegrenzen, herhaalbaarheid, binnen-lab reproduceerbaarheid en selectiviteit voor de in 3.1 en 3.2 beschreven methode zijn zowel in dripsap als in 1:1 water/vleeshomogenaten bepaald. Er is voor deze beide matrices gekozen omdat bij rechtstreeks spiken aan vlees en vervolgens verzamelen van dripsap homogeniteitsproblemen kunnen voorkomen, waardoor lokaal in dripsap de concentraties variëren. De dripsap spikes geven de detectiegrenzen van het systeem, met verwaarlozing van de weefselbinding. De water-vleeshomogenaten geven de precisiekenmerken inclusief de in de praktijk optredende vlees-antibioticumbinding. De vleeshomogenaten worden in deze studie alleen maar gebruikt voor het homogeen verdelen van antibiotica in spierweefsel en als simulatiemodel voor het verkrijgen van dripsap uit spierweefsel. Nogmaals wordt beklemtoond, dat de screeningsmethode gebaseerd is op dripsap en niet op homogenaten.

3.3.1 Methode van spiken/voorbewerken

3.3.1.1 Dripsap

Aan 3 ml dripsap (verkregen via methode beschreven in 3.1) is een klein volume (<100 μ l) van een antibioticum-oplossing (2.1) toegevoegd en goed gemengd. Vervolgens zijn de buisjes overnacht bij 0-5°C gezet en de volgende dag goed gemengd en ingepipetteerd.

3.3.1.2 Water-vleeshomogenaten

Een groot volume (± 200 gram) water-vleeshomogenaat (1:1) (v/v) is 1,5 minuut gestomacherd. Van dit homogenaat zijn 10 gram porties afgewogen in 50 ml PPN tubes. Vervolgens is <0,5 ml standaardoplossing (2.1) toegevoegd en zijn de buizen 20' geroteerd. De homogenaten zijn

vervolgens overnacht bij 0-5°C geplaatst. Na opnieuw 20' roteren zijn de buizen gedurende 20 minuten bij 64°C geplaatst, afgedraaid bij 3000xg en is het supernatant ingepipetteerd. N.B. Uittesten wees uit dat de hittebehandeling (64°C) van porties van 10 gram homogenaat het beste vergelijkbaar zijn met 25 gram vlees porties (praktijk).

3.3.2 De proefopzet/concentratiereeks

De gebruikte concentratiereeks staat vermeld in tabel 3. Hierbij zijn aangegeven de concentraties in dripsap en homogenaat.

Tabel 3: Per stof de ingezette concentratiereeks (zwart gedrukt de MRL's)

Testplaat	Groep	Stof	Concentratie reeks (µg/kg homogenaat* of dripsap)
<i>B.cereus</i> testplaat	Tetracyclines	OTC	400 - 200 - 100 (4x) - 50 (4x) - 25
		Doxycycline	200 - 100 - 50 (4x) - 25 (4x) - 12,5 - 6,25
		CTC	200 - 100 - 50 (4x) - 25 (4x) - 12,5 - 6,25
		Tetracycline	400 - 200 - 100 (4x) - 50 (4x) - 25
<i>E.coli</i> screeningsplaat	Quinolonen	Flumequine	1600 - 800 - 400 (4x) - 200 (4x) - 100
		Enrofloxacin	100 (4x) - 50 (4x) - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,1
		Danofloxacin	200 (4x) - 100 (4x) - 50 - 25 - 12,5
		Difloxacin	300 (4x) - 150 (4x) - 75 - 37,5 - 18,7
		Oxolinezuur	800 - 400 - 200 (4x) - 100 (4x) - 50
<i>E.coli</i> bevestigingsplaat	Quinolonen	Flumequine	1600 - 800 - 400 (4x) - 200 (4x) - 100
		Enrofloxacin	200 - 100 (4x) - 50 (4x) - 25 - 12,5
		Danofloxacin	800 - 400 - 200 (4x) - 100 (4x) - 50 - 25
		Difloxacin	2400 - 1200 - 600 (4x) - 300 (4x) - 150 - 75
		Oxolinezuur	800 - 400 - 200 (4x) - 100 (4x) - 50

*Dit is de eindconcentratie in het homogenaat.

De spike-monsters werden in enkelvoud op twee verschillende platen (met dezelfde stam) gepipetteerd. De bovengenoemde concentratiereeksen werden op 3 verschillende dagen gemaakt (en ingezet). Dit betekent dat voor concentraties welke in 4-voud gespiked zijn dat in totaal 12 spikes zijn gemaakt, welke op 6 verschillende platen zijn ingezet.

3.3.3 Statistische evaluatie

De gevonden diameters bij de concentratie-reeksen werden grafisch uitgezet, met het lijnmodel $Y = b \cdot \ln X + a$, waarin:

- Y : diameter remzone
- X : antibioticum concentratie (µg/l homogenaat of dripsap)
- b : helling van de lijn
- a : snijpunt met y-as
- r : correlatie coëfficiënt

Door middel van lineaire regressie analyse (Microsoft Excel, versie voor Windows 95) wordt de optimale lijn inclusief vergelijking bepaald.

R : Correlatiecoëfficiënt
Sd : Standaarddeviatie van alle waarnemingen
Herhaalbaarheid : Standaarddeviatie van een dag maal $2\sqrt{2}$

Relatieve herhaalbaarheid = herhaalbaarheid gedeeld door de gemiddelde remzone maal 100%.

Binnen laboratorium reproduceerbaarheid = Sd * $2\sqrt{2}$ (over de drie dagen).

Relatieve binnen laboratorium reproduceerbaarheid = binnen laboratorium reproduceerbaarheid gedeeld door gemiddelde remzone maal 100%.

3.4 Praktijkmonsters

Om een indruk te krijgen of de gevonden relatie tussen diameter remzone en concentraties aan antibioticum vergelijkbaar was met praktijkmonsters, zijn 59 praktijkmonsters met een bekend gehalte aan antibioticum ingezet. Deze monsters bevatten 47* *doxycycline* en 12* *flumequine* variërend van $\frac{1}{4}$ * MRL tot 3* MRL.

De gehaltebepalingen voor tetracyclines (met LC-ms, conform RSV A0710) zijn vlak na de screeningsanalyse uitgevoerd. De gehaltebepalingen voor de quinolonen HPLC, conform RSV A0784) waren 2 jaar voor uitvoering van de screeningsanalyse uitgevoerd. In die tussentijd waren de monsters bij $<-18^{\circ}\text{C}$ bewaard.

4 RESULTATEN

De experimenten zijn zowel voor de tetracyclines als quinolonen verdeeld in weefsel spike - experimenten, dripsap spike - experimenten en praktijkmonsters. De resultaten worden per antibioticum groep behandeld.

4.1 Tetracyclines (kippenvlees-spikes)

4.1.1 Aantoonbaarheidsgrens

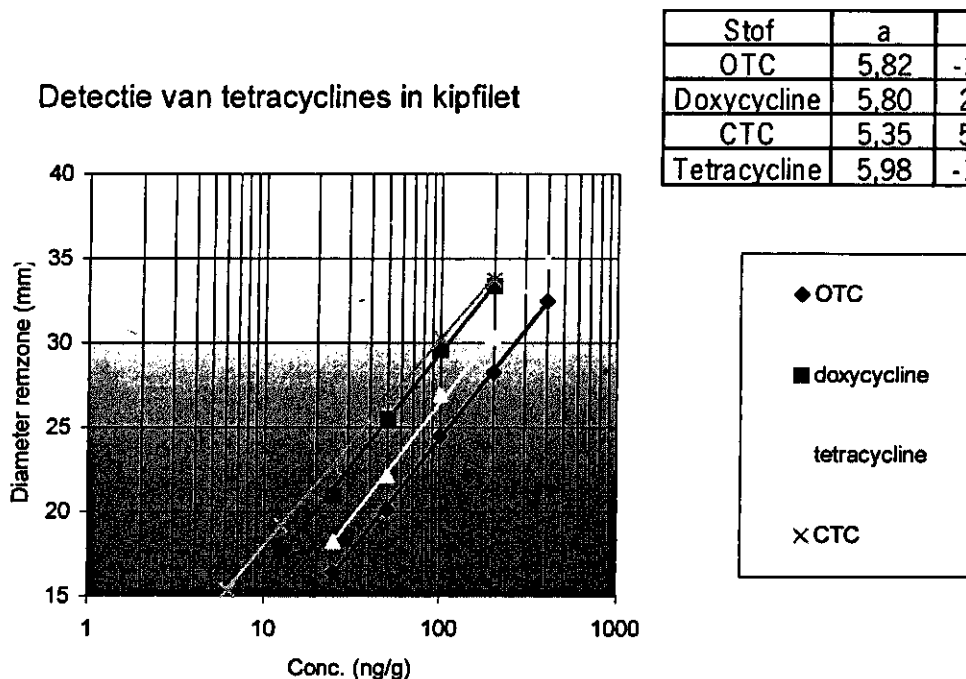
De resultaten van de water-vleeshomogenaat spikes voor de tetracyclines staan vermeld in tabel 4. Hierbij zijn alle data (alle platen en alle dagen) bij elkaar genomen, gemiddeld en statistisch geanalyseerd. De genoemde concentraties zijn de eindconcentraties in het homogenaat.

Tabel 4: De gemiddelde remzones met bijbehorende SD en 95% betrouwbaarheidsinterval voor de op verschillend niveau gespikete tetracyclines (zwart gedrukt de EU MRL) in water-vleeshomogenaten op de *B.cereus* testplaat.

Antibioticum	Niveau (µg/kg hom.)	n	Gemiddelde remzone (mm)	Standaard-deviatie (mm)	95% betr. interval (mm)
OTC	400	6	32,5	1,7	32,5 ± 3,7
	200	6	28,3	0,9	28,3 ± 2,0
	100	24	24,5	1,1	24,5 ± 2,5
	50	24	20,1	0,6	20,1 ± 1,3
	25	6	16,4	0,3	16,4 ± 0,6
Doxycycline	200	6	33,4	0,8	33,4 ± 1,8
	100	6	29,6	0,9	29,6 ± 2,0
	50	24	25,5	0,8	25,5 ± 1,7
	25	24	21,0	0,8	21,0 ± 1,7
	12,5	6	17,6	0,4	17,6 ± 0,9
CTC	200	6	33,8	0,7	33,8 ± 1,6
	100	6	30,3	0,4	30,3 ± 0,8
	50	24	27,0	0,7	27,0 ± 1,5
	25	24	22,6	0,7	22,6 ± 1,5
	12,5	6	19,2	0,4	19,2 ± 0,9
	6,3	6	15,4	0,5	15,4 ± 1,2
Tetracycline	400	6	34,8	1,2	34,8 ± 2,6
	200	6	30,3	0,7	30,3 ± 1,5
	100	24	26,9	0,8	26,9 ± 1,9
	50	24	22,1	0,9	22,1 ± 2,0
	25	6	18,2	0,8	18,2 ± 1,7

Zoals uit tabel 4 blijkt kunnen alle tetracyclines op minimaal ½ MRL niveau aangetoond worden. De detectie van doxycycline en CTC is aanzienlijk gevoeliger (factor 2 à 3) dan die van tetracycline en OTC. De spreiding in de metingen is voor alle tetracyclines ongeacht het niveau goed vergelijkbaar. Het 95% betrouwbaarheidsinterval geeft aan dat globaal een spreiding van 2 mm optreedt bij uitvoering van de analyses.

De waarden in tabel 4 worden grafisch weergegeven in figuur 1. In deze figuur zijn ook de vergelijkingen van de lijnen met de R (= correlatie coëfficiënt) weergegeven.



Figuur 1: Relatie remzone diameter op de *B.cereus* testplaat en de concentratie aan tetracyclines in het water-vleeshomogenaat.

Uit de vergelijking van de lijn is per stof uitgerekend wat de concentratie aan antibioticum is bij een bepaalde diameter. Dit is gebruikt voor het bepalen van de detectiegrens en aktiegrens. De minimaal af te lezen zone ligt tussen de 16 en 18 millimeter. Bij een diameter van 18 mm (=putje + 4 mm) zijn zones altijd goed afleesbaar, bij kleinere zones kan, afhankelijk van het antibioticum, doorgroei optreden.

In tabel 5 staan de detectiegrenzen en aktiegrenzen weergegeven voor de verschillende antibiotica.

Tabel 5: De antibioticum concentratie (in het homogenaat) bij een bepaalde diameter grootte van de remzone

Stof	Detectiegrens ($\mu\text{g}/\text{kg}$ hom.)		Aktiegrens ($\mu\text{g}/\text{kg}$ hom.)	
	16 mm	18 mm	20 mm	22 mm
OTC	24	34	47	67
Doxycycline	10	14	20	28
CTC	7	10	15	21
Tetracycline	17	24	34	47

Uit tabel 5 blijkt dat de detectiegrenzen rond $1/10 \cdot \text{MRL}$ en $1/3 \cdot \text{MRL}$ liggen voor de verschillende tetracyclines. Bij een aktiegrens van 20 mm wordt, rekening houdend met een spreiding van 2 mm, actie ondernomen bij een gehalte aan OTC tussen de 34 en 67 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (= $1/3$ tot $2/3 \cdot \text{EU}$)

MRL). Er kan echter ook gekozen worden om een grensstandaard (spike van bijv. 50 µg/kg OTC in water-vleeshomogenaat) op ieder plaat mee te nemen, waartegen de monsters beoordeeld worden. Het voordeel hiervan is dat de actie-concentratie uniformer wordt omdat de tussen-plaat en dagspreiding wegvallen en alleen de herhaalbaarheid nog voor spreiding in remzones van diameters zorgt. Bij beide beoordelingsmethoden zullen lage concentraties aan CTC en doxycycline (25-75 µg/kg) ook de bevestiging in gaan, omdat deze stoffen veel gevoeliger gedetecteerd worden.

4.1.2 De precisie data

De (rel.) herhaalbaarheid en (rel.) reproduceerbaarheid zijn op MRL en ½* MRL niveau (OTC/tetracycline) of 1/2*MRL en 1/4* MRL niveau (doxycycline/CTC) berekend. Op dit niveau zijn de homogenaten per dag in viervoud gespiked en in viervoud op 2 platen ingezet. De resultaten van de in totaal 6 platen (3 verschillende dagen) zijn gebruikt voor de berekening van de precisie data. De resultaten van deze statistische evaluatie staan in tabel 6.

Tabel 6: De precisie data van de methode voor tetracyclines gebaseerd op water-vleeshomogenaat spikes van kip.

Antibioticum	Niveau (µg/kg hom.)	n	Herhaalbaarheid (mm)*	Relatieve herhaalbaarheid (%) *	Binnen lab. reproduceerbaarheid (mm) *	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%) *
OTC	400	6			4,8	14,8
	200	6			2,6	9,0
	100	24	1,4	5,7	3,2	13,0
	50	24	1,6	8,0	1,7	8,4
	25	6			0,7	4,5
	Gem.			6,9		9,9
Doxycycline	200	6			2,3	6,9
	100	6			2,6	8,7
	50	24	1,3	5,0	2,2	8,5
	25	24	1,8	8,6	2,2	10,5
	12,5	6			1,2	6,9
	Gem.			6,8		8,3
CTC	200	6			2,0	6,0
	100	6			1,0	3,3
	50	24	1,3	4,7	1,9	7,1
	25	24	1,4	6,2	2,0	8,6
	12,5	6			1,1	5,7
	6,3	6			1,5	10,0
	Gem.			5,5		6,2
Tetracycline	400	6			3,4	9,7
	200	6			2,0	6,5
	100	24	1,5	5,4	2,4	8,9
	50	24	2,6	11,6	2,6	11,8
	25	6			2,2	12,3
	Gem.			8,5		9,8

* zie paragraaf 3.4.2

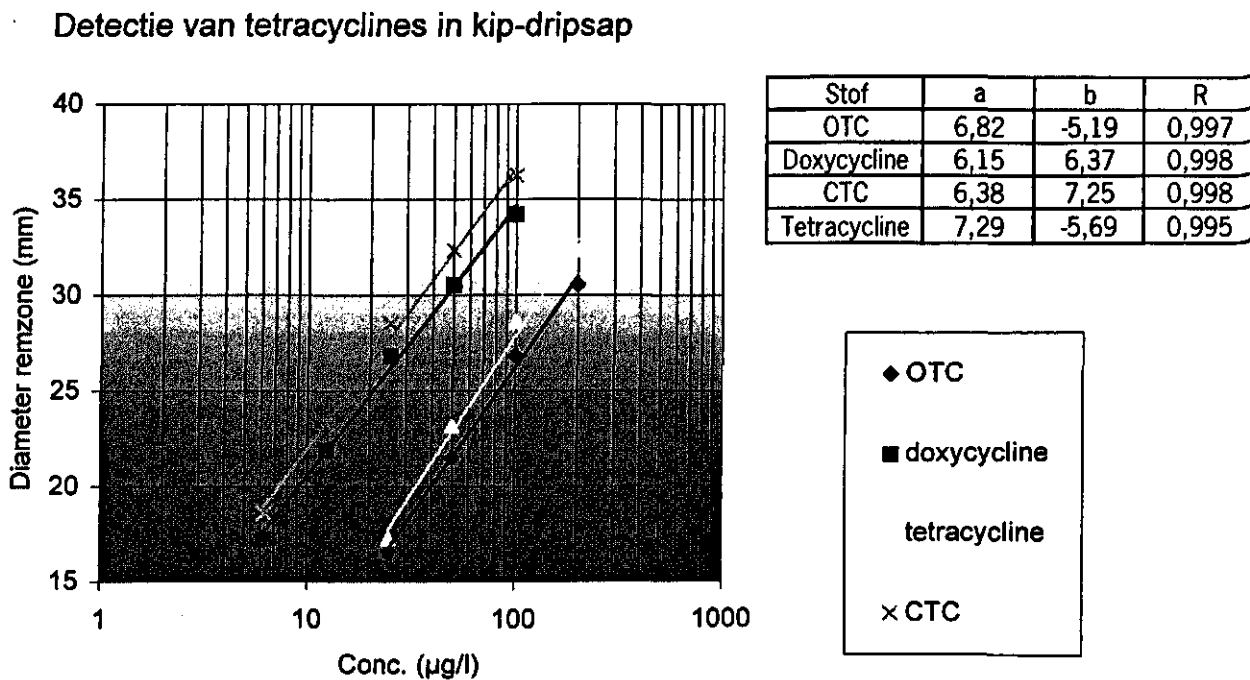
Uit tabel 6 blijkt dat de relatieve herhaalbaarheid en binnen lab. reproduceerbaarheid weinig verschillen tussen de antibiotica. De relatieve herhaalbaarheid varieert van 4,7 tot 11,6% (gemiddeld 7%) bedraagt. De binnen.lab. reproduceerbaarheid varieert van 3,3 tot 14,8% (gemiddeld 9,3%). De (rel.) herhaalbaarheid bij tetracycline en OTC op 50 µg/kg niveau is wat groter dan bij de andere niveau's en antibiotica. Maar alle waarden liggen ruim onder de analytische EU norm van 15% voor waarden boven 100 µg/kg en 20% voor waarden tussen 10 en 100 µg/kg (7).

4.2 Tetracyclines (kip dripsap spikes)

Analoog aan de water-vleeshomogenaat spikes zijn dripsap spikes bereid en geanalyseerd.

4.2.1 Detectiegrens

De detectiegrens in kip dripsap is op dezelfde wijze als bij de vlees-homogenaat spikes bepaald. De resultaten staan vermeld in bijlage 1 en zijn grafisch weergegeven in figuur 2.



Figuur 2: Relatie remzone diameter op de *B.cereus* testplaat en de concentratie aan tetracyclines in dripsap

Evenals bij de water-vleeshomogenaten zijn de vergelijkingen van de lijn gebruikt bij het bepalen van de detectiegrens en aktiegrens. Deze resultaten staan vermeld in tabel 7.

Tabel 7 De detectiegrenzen in dripsap en actiegrenzen bij verschillende diameter grootte van de remzone

Stof	Detectiegrens ($\mu\text{g/l}$ dripsap)		Actiegrens ($\mu\text{g/l}$ dripsap)	
	16 mm	18 mm	20 mm	22 mm
OTC	22	30	40	54
Doxycycline	5	7	9	13
CTC	4	5	7	10
Tetracycline	20	26	34	45

Bij vergelijken van tabellen 5 en 7 blijkt dat de detectie voor doxycycline en CTC in dripsap (= voornamelijk interstitieel of extracellulair vocht) een factor 2 gevoeliger is dan in homogenaten. Voor OTC is dit minder en voor tetracycline zijn de resultaten goed vergelijkbaar. Omdat bij dripsap analyses relatief weinig antibioticum - weefselbinding kan optreden, indiceren deze resultaten dat bij deze doxycycline en CTC er 50% weefselbinding of insluiting in de spiercel optreedt. Validatie alleen met dripsap-spikes geeft dan ook geen reëel beeld van de gevoeligheid van het screeningssysteem ten aanzien van het totale gehalte in spierweefsel en tabel 5 is nodig voor het bepalen van de werkelijke detectiegrens en actiegrens. Antibiotica residuen kunnen inhomogeen interstitieel voor (OTC, THCl, penicilline derivaten) ; andere komen vooral in de spiercel voor zoals Doxy, CTC.

4.2.2 De precisie data

De (rel.) herhaalbaarheid en (rel.) binnen lab. reproduceerbaarheid voor de dripsap-experimenten zijn analoog aan 3.4.1.2 berekend en staan vermeld in tabel 8.

Tabel 8: De precisie data van de methode voor tetracyclines gebaseerd op dripsap spikes

Anti-bioticum	Niveau (µg/drip)	Gem. remzone (mm)	n	SD (mm)	Herhaalbaarheid (mm)*	Relatieve herhaalbaarheid (%)*	Binnen lab. reproduceerbaarheid (mm)*	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)*
OTC	200	30,6	6	1,2			3,4	11,0
	100	26,8	24	1,2	1,3	4,7	3,4	12,7
	50	21,5	24	1,4	1,4	6,4	4,0	18,5
	25	16,6	24	0,8	1,5	9,1	2,4	14,5
	Gem.						6,7	
Doxycycline	100	34,2	6	0,9			2,7	7,8
	50	30,5	24	1,0	0,9	2,8	2,9	9,6
	25	26,9	24	1,1	1,5	5,5	3,1	11,5
	12,5	21,9	24	1,1	1,4	6,3	3,0	13,6
	6,25	17,2	6	0,8			2,2	12,8
Gem.						4,9		11,1
CTC	100	36,2	6	1,4			3,9	10,8
	50	32,3	24	1,4	1,2	4,1	3,8	11,9
	25	28,5	24	1,2	1,2	5,0	3,4	12,1
	12,5	23,3	24	0,7	1,4	7,4	2,0	8,4
	6,3	18,6	6	0,7			2,1	11,4
Gem.						5,5		10,9
Tetracycline	200	32,3	6	1,0			2,7	8,3
	100	28,6	24	0,8	1,2	4,0	2,4	8,3
	50	23,2	24	1,1	1,3	5,5	3,2	13,7
	25	17,3	24	0,8	1,5	8,8	2,2	13,0
	Gem.						6,1	

* zie paragraaf 3.4.2

De waarden in tabel zijn goed vergelijkbaar met die van tabel 6. De gemiddelde herhaalbaarheid ligt rond de 6% en de gemiddelde binnen lab. reproduceerbaarheid rond de 12%. Deze waarden liggen binnen de analytische EU normen (7).

4.3 Tetracyclines, vergelijken kalkoen en kip

De experimenten zijn ook uitgevoerd met kalkoenfilet ipv kipfilet. Er zijn in water-vleeshomogenaat en dripsap op MRL en 1/2* MRL (OTC en tetracycline) en 1/2*MRL en 1/4*MRL (CTC en doxycycline) niveau, spikes gemaakt analoog aan de methode bij de kip. Dit waren in totaal 12 spikes (3 dagen 4 spikes) welke (op dezelfde dag) op 2 verschillende platen zijn gepipetteerd (n=24).

4.3.1 Water-vleeshomogenaten

De resultaten van de water-vleeshomogenaten staan in tabel 9. Ter vergelijking zijn de resultaten van de kip ernaast vermeld.

Tabel 9: De resultaten voor tetracyclines gespiked in water-vleeshomogenaat van kalkoen en kip

Antibioticum	Niveau (µg/kg homogenaat)	n	kip				kalkoen			
			Gem. remzone (mm)	S (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)	Gem. remzone (mm)	S (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)
OTC	100	24	24,5	1,1	5,7	13,0	24,9	0,7	3,6	7,7
	50	24	20,1	0,6	8,0	8,4	20,5	0,5	6,4	7,0
	Gem.				6,9	9,9			5,0	7,4
Doxycycline	50	24	25,5	0,8	5,0	8,5	25,6	0,7	5,0	8,2
	25	24	21,0	0,8	8,6	10,5	20,8	0,6	5,0	8,7
	Gem.				6,8	8,3			5,0	8,5
CTC	50	24	27,0	0,7	4,7	7,1	26,7	1,1	3,1	11,7
	25	24	22,6	0,7	6,2	8,6	22,4	1,1	5,7	14,4
	Gem.				5,5	6,2			4,4	13,0
Tetracycline	100	24	26,9	0,8	5,4	8,9	26,1	0,8	6,1	8,4
	50	24	22,1	0,9	11,6	11,8	21,4	0,5	6,1	6,8
	Gem.				8,5	9,8			6,1	7,6

Zoals blijkt uit tabel 9 zijn de resultaten van de kip-experimenten uitstekend extrapoleerbaar naar kalkoen. De gemiddelde diameters van de remzones en daarmee samenhangend de detectiegrenzen zijn bijna identiek. Ook de spreiding (relatieve herhaalbaarheid en relatieve binnen lab. reproduceerbaarheid) zijn goed vergelijkbaar. Voor CTC wordt bij kalkoen een grotere spreiding gevonden, maar ook deze spreiding voldoet nog aan de analytische EU norm van 20% spreiding voor het niveau tussen 10 en 100 µg/kg (7).

4.3.2 Dripsap spikes

De resultaten van de tetracycline spikes in kalkoen dripsap staan vermeld in tabel 10. Ter vergelijking zijn de resultaten van de kip ernaast vermeld.

Tabel 10: De resultaten voor tetracyclines gespiked in dripsap van kalkoen en kip

Antibioticum	Niveau (µg/l dripsap)	n	kip				kalkoen			
			Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%) *	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%) *	Gem. remzone (mm) *	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%) *	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%) *
OTC	100	24	26,8	1,2	4,7	12,7	26,5	1,1	3,1	12,0
	50	24	21,5	1,4	6,4	18,5	22,1	0,7	3,2	9,2
	Gem.				5,6	15,6			3,1	10,6
Doxycycline	50	24	30,5	1,0	2,8	9,6	30,1	1,5	2,3	13,9
	25	24	26,9	1,1	5,5	11,5	26,2	1,2	2,6	13,5
	Gem.				4,2	10,6			2,4	13,7
CTC	50	24	32,3	1,4	4,1	11,9	30,2	1,3	2,8	12,4
	25	24	28,5	1,2	5,0	12,1	26,9	1,5	3,4	15,9
	Gem.				4,6	12,0			3,1	14,2
Tetracycline	100	24	28,6	0,8	4,0	8,3	27,8	1,1	3,4	11,0
	50	24	23,2	1,1	5,5	13,7	23,2	1,1	2,6	12,9
	Gem.				4,8	11,0			3,0	11,9

* zie paragraaf 3.4.1

Ook voor dripsap zijn de resultaten tussen kip- en kalkoen goed vergelijkbaar. CTC lijkt iets minder gevoelig aantoonbaar, maar 1/4* MRL geeft nog altijd zones van 27 mm. De precisie data tussen kalkoen en kip verschillen weinig, de herhaalbaarheid bij kalkoen is iets beter dan bij kip. Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat de methode ook uitstekend geschikt is voor de detectie van tetracyclines in kalkoenfilet op EU MRL niveau. Hierbij kunnen grensstandaarden gemaakt in kipfilet meegenomen worden of kunnen bij de kip gehanteerde actiegrenzen gehanteerd worden.

4.4 Quinolonen (kippenvlees spikes)

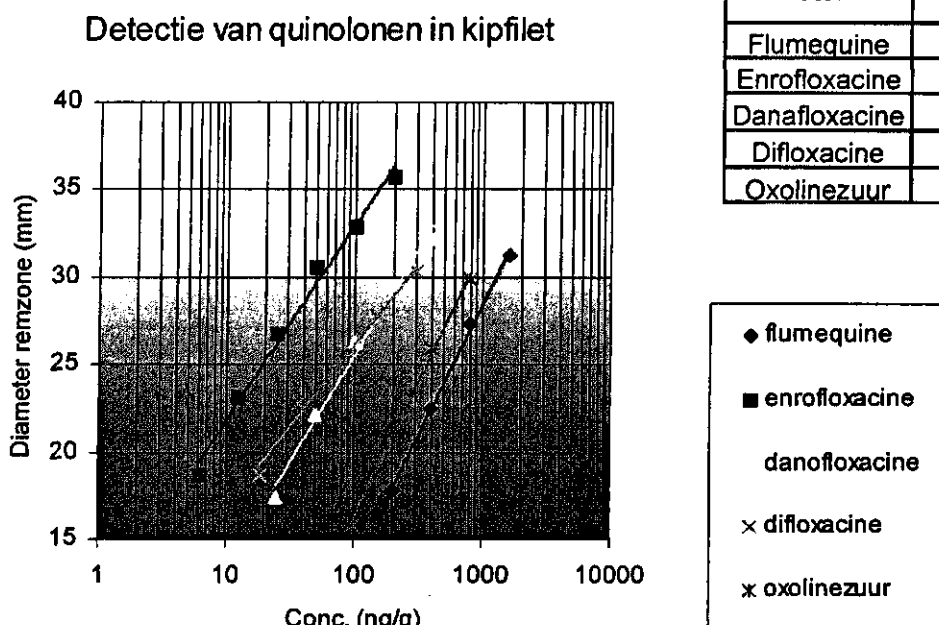
4.4.1 Detectiegrens

De resultaten van de water-vleeshomogenaat spikes voor de quinolonen in kipfilet staan vermeld in tabel 10. Hierbij zijn alle data (alle platen en alle dagen) bij elkaar genomen, gemiddeld en statistisch geanalyseerd. De genoemde concentraties zijn de eindconcentraties in het homogenaat.

Tabel 10: De gemiddelde remzones met bijbehorende SD en 95% betrouwbaarheidsinterval voor de op verschillend niveau gespikte quinolonen (zwart gedrukt de EU MRL) in water-vleeshomogenaten op de *E.coli*-screeningsplaat

Antibioticum	Niveau (µg/kg hom.)	n	Gemiddelde remzone (mm)	Standaard-deviatie (mm)	95% betr. interval (mm)
Flumequine	1600	6	31,3	0,7	31,3 ± 1,6
	800	6	27,3	0,4	27,3 ± 0,9
	400	24	22,5	0,5	22,5 ± 1,1
	200	24	17,7	0,7	17,7 ± 1,6
Enrofloxacin	200	6	35,7	0,6	35,7 ± 1,4
	100	24	32,9	0,5	32,9 ± 1,2
	50	24	30,5	0,4	30,5 ± 0,9
	25	6	26,8	0,9	26,8 ± 2,0
	12,5	6	23,2	0,7	23,2 ± 1,6
	6,25	6	18,7	1,0	18,7 ± 2,1
Danofloxacin	400	6	32,2	0,7	32,2 ± 1,5
	200	24	29,6	0,7	29,6 ± 1,6
	100	24	26,3	0,8	26,3 ± 1,7
	50	6	22,1	1,1	22,1 ± 2,4
	25	6	17,5	0,9	17,5 ± 1,9
Difloxacin	300	24	30,3	0,7	30,3 ± 1,5
	150	24	27,7	0,4	27,7 ± 0,8
	75	6	25,1	0,4	25,1 ± 0,9
	37,5	6	22,9	0,6	22,9 ± 1,3
	18,75	6	18,7	0,8	18,7 ± 1,7
Oxolinezuur	800	6	29,9	0,7	29,9 ± 1,6
	400	6	26,0	0,5	26,0 ± 1,0
	200	24	21,2	0,4	21,2 ± 0,8
	100	24	15,8	0,6	15,8 ± 1,3

Uit tabel 10 blijkt dat flumequine, enrofloxacin, danofloxacin en difloxacin minimaal op 1/2 MRL aantoonbaar zijn. Oxolinezuur is op MRL niveau aantoonbaar. Verder blijkt uit de tabel dat enrofloxacin, danofloxacin en difloxacin erg gevoelig gedetecteerd worden door deze testplaat (minimaal een factor 10 onder de EU MRL). De spreiding in de metingen is vergelijkbaar met de tetracyclines en lijkt voor oxolinezuur en flumequine wat kleiner dan bij de overige 3. Het 95% betrouwbaarheidsinterval geeft aan dat globaal een spreiding van 1-3 mm optreedt bij uitvoering van de analyses. De waarden in tabel 10 worden grafisch weergegeven in figuur 3. In deze figuur zijn ook de vergelijkingen van de lijnen met de coördinatie coëfficiënt ervan (2) weergegeven.



Figuur 3: De relatie tussen de concentratie quinolonen in water-vleeshomogenaat en diameter van de remzone op de *E.coli* screeningsplaat.

De detectiegrens en eventueel aktiegrens zijn analoog aan de tetracyclines berekend uit de lijnvergelijking. De minimaal af te lezen zone ligt bij de *E.coli* screeningsplaat tussen de 18 en 20 millimeter. Kleinere zones zijn niet meer te zien doordat een coagulase ring rondom het putje kan voorkomen. Deze coagulase ring treedt niet op bij negatieve monsters en kan daarom ook in de praktijk als zone gemeten worden. Dit betekent dat de minimaal af te lezen zone dan naar de 16 mm toe gaat. In tabel 11 staan de detectiegrenzen en actiegrenzen weergegeven voor de verschillende quinolonen.

Tabel 11: De antibioticum concentratie in het homogenaat bij een bepaalde diameter grootte van de remzone

Stof	Detectiegrens (µg/kg hom.)		Aktiegrens (µg/kg hom.)		
	16 mm	18 mm	20 mm	22 mm	25 mm
Flumequine	150	203	276	374	592
Enrofloxacin	3	5	7	10	19
Danofloxacin	17	24	35	52	90
Difloxacin	8	13	22	36	76
Oxolinezuur	97	131	176	236	368

Uit tabel 11 blijkt dat een aktiegrens van bijv. 16 mm betekent globaal dat gehalten rond 1/2* MRL voor flumequine, MRL voor oxolinic acid, 1/10* MRL voor danofloxacin en 1/30* MRL voor enrofloxacin en difloxacin de bevestiging in gaan. Dit is voor de 3 laatst genoemde stoffen erg ver onder de EU MRL. Om te voorkomen dat dit veel onnodige bevestigingen opleverd kan gekozen worden om de monsters met remzones kleiner dan 25 mm ook op een *E.coli* bevestigingsplaat in te pipetteren. Deze plaat is geënt met een andere *E.coli* stam welke minimaal

een factor 10 minder gevoelig is voor enrofloxacin, difloxacin en danofloxacin maar een vergelijkbare gevoeligheid voor flumequine en oxolinezuur heeft. Deze *E.coli* bevestigingsplaat is analoog aan de *B.cereus* testplaat en *E.coli* screeningsplaat gevalideerd (zie voor de resultaten bijlage 2). Wanneer de *E.coli* bevestigingsplaat een remzone (>aktiegrens van 16 mm) geeft, dan gaat het om flumequine of oxolinezuur en dient het monster bevestigd/gekwantificeerd te worden. Wanneer het monster geen remzone geeft op de *E.coli* bevestigingsplaat dan betreft het enrofloxacin, danofloxacin of difloxacin en kan het monster goedgekeurd worden (niveau beneden $\frac{1}{2}$ * MRL). Monsters met een remzone > 25mm op de *E.coli* screeningsplaat dienen altijd met instrumenteel analytische methoden bevestigd te worden. Het aanwezige gehalte is dan >1/4* MRL voor difloxacin, >1/5* MRL voor enrofloxacin, >1/2*MRL voor danofloxacin of >MRL voor flumequine en oxolinezuur.

Het gebruik van de *E.coli* bevestigingsplaat maakt, op een eenvoudige wijze, een onderverdeling in quinolonen mogelijk. Dit voorkomt onnodig bevestigen van lage concentraties quinolonen (ver beneden de half EU MRL). Praktisch betekent dit weinig extra werk omdat het dripsap van de monsters reeds verzameld is. De aktiegrens van 16 mm op de screenings- en bevestigingsplaat betekend dat flumequine op 1/2* MRL wordt gescreend en oxolinezuur exact op MRL niveau.

4.4.2 De precisie data

De (rel.) herhaalbaarheid en (rel.) binnen lab. reproduceerbaarheid zijn voor de water-vleeshomogenaat spikes berekend en staan vermeld in tabel 12.

Tabel 12: De precisie data voor quinolonen in water-vleeshomogenaat (kip) op de *E.coli* screeningsplaat

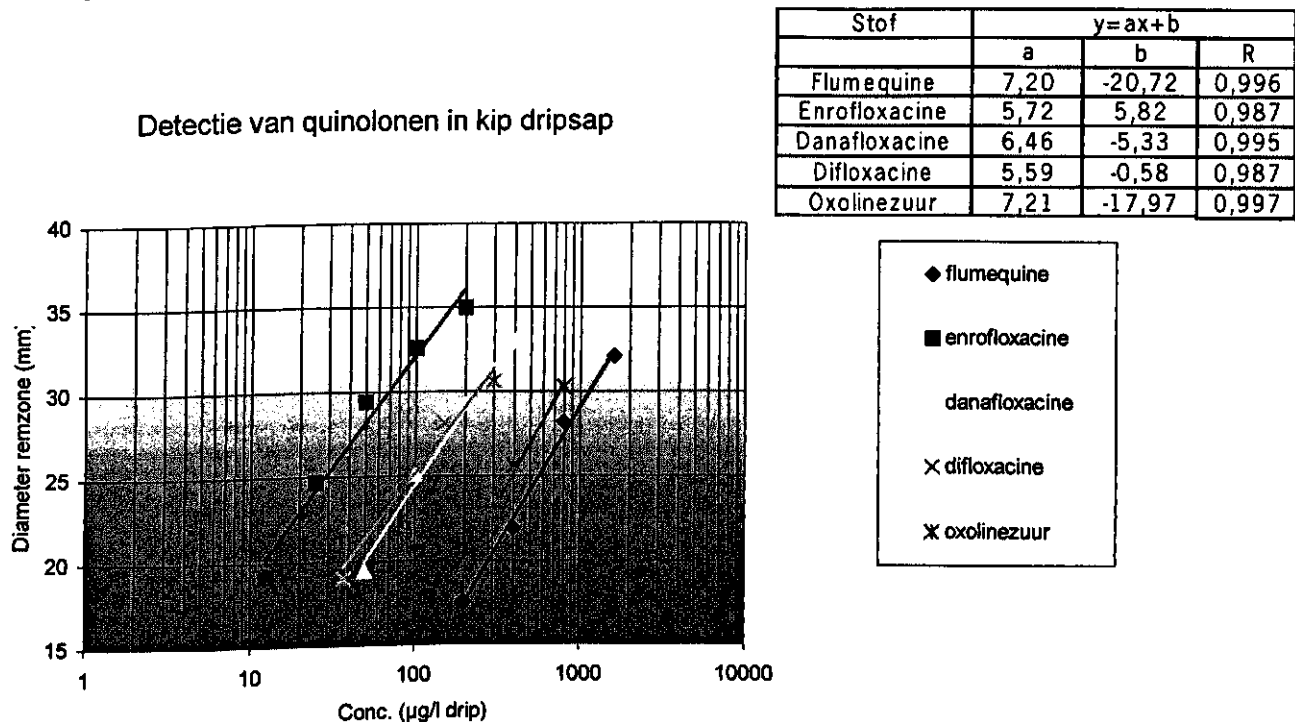
Antibioticum	Niveau (µg/kg homogenaat)	n	Standaard-deviatie (mm)	Herhaalbaarheid (mm) *	Relatieve herhaalbaarheid (%) *	Binnenlab. reproduceerbaarheid (mm) *	Rel. binnen lab reprocudeerbaarheid (%) *
Flumequine	1600	6	0,7			2,0	6,5
	800	6	0,4			1,2	4,4
	400	24	0,5	1,09	4,8	1,4	6,1
	200	24	0,7	1,62	9,1	2,0	11,5
	Gem.				7,0		7,1
Enrofloxacin	200	6	0,6			1,8	4,9
	100	24	0,5	0,8	2,4	1,6	4,7
	50	24	0,4	1,0	3,2	1,2	3,9
	25	6	0,9			2,6	9,7
	12,5	6	0,7			2,1	9,1
	6,25	6	1,0			2,7	14,7
	Gem.				2,8		7,9
Danofloxacin	400	6	0,7			2,0	6,1
	200	24	0,7	1,19	4,0	2,0	6,9
	100	24	0,8	0,92	3,5	2,2	8,5
	50	6	1,1			3,1	13,8
	25	6	0,9			2,4	13,8
	Gem.				3,8		9,8
Difloxacin	300	24	0,7	1,03	3,4	1,9	6,2
	150	24	0,4	0,69	2,5	1,1	3,9
	75	6	0,4			1,1	4,5
	37,5	6	0,6			1,7	7,3
	18,75	6	0,8			2,2	11,6
	Gem.				2,9		6,7
Oxolinezuur	800	6	0,7			2,1	7,0
	400	6	0,5			1,3	5,1
	200	24	0,4	0,75	3,6	1,0	4,8
	100	24	0,6	1,57	9,9	1,6	10,3
	Gem.				6,7		6,8

* zie paragraaf 3.4.1

4.5 Quinolonen (kip dripsap spikes)

4.5.1 Detectiegrens

Analoog aan de water-vleeshomogenaat spikes zijn ook kipdripsap spikes bereid en geanalyseerd. De gedetailleerde resultaten staan vermeld in bijlage 1. De resultaten staan grafisch weergegeven in figuur 4.



Figuur 4: De relatie tussen de concentratie aan quinolonen in kip dripsap en de gemiddelde diameter van de remzones op de *E.coli* screeningsplaat

Evenals bij de water-vleeshomogenaten zijn de vergelijkingen van de lijn gebruikt voor het bepalen van de detectiegrens en aktiegrens. De resultaten staan vermeld in tabel 13.

Tabel 13: De antibioticum concentratie in het dripsap bij een bepaalde diameter grootte van de remzone

Stof	Detectiegrens (µg/l drip)		Aktiegrens (µg/l drip)			
	16 mm	18 mm	16 mm	20 mm	22 mm	25 mm
Flumequine	164	216	164	286	377	572
Enrofloxacin	6	8	6	12	17	29
Danofloxacin	27	37	27	50	69	109
Difloxacin	19	28	19	40	57	97
Oxolinezuur	111	146	111	193	255	386

Wanneer de resultaten van tabel 11 en 13 worden vergeleken, dan zijn deze voor alle stoffen goed vergelijkbaar, hetgeen aangeeft dat er weinig antibioticum-weefsel binding of insluiting bij de quinolonen optreedt. Enrofloxacin, danofloxacin en difloxacin zijn zelfs wat minder goed

aantoonbaar. Hierbij speelt mogelijk mee dat bij de screeningsplaat voor quinolonen niet bijgedruppeld wordt met een buffer. De pH van dripsap is iets lager ($\pm 6,2$) dan die van het afgedraaide water-homogenaat ($\pm 6,3-6,4$) en enrofloxacin, danofloxacin en difloxacin zijn stoffen die bij hogere pH potenter zijn dan bij lagere pH. Niettemin is enrofloxacin zeer gevoelig aantoonbaar in dripsap (detectiegrens op $1/10 \cdot \text{MRL}$).

4.5.2 De precisie data

De (rel.) herhaalbaarheid en (rel) binnen lab reproduceerbaarheid zijn voor de quinolonen gespiked in dripsap analoog aan 3.4.1.2 berekend en staan vermeld in tabel 14.

Tabel 14: De precisie data van de methode voor quinolonen gebaseerd op dripsap spikes

Antibioticum	Niveau ($\mu\text{g/l}$ drip)	n	Gem. remzone (mm)	S (mm)	Herhaalbaarheid (mm)	Relatieve herhaalbaarheid (%)	Binnen lab. reproduceerbaarheid (mm)	Relatieve binnen lab. reproduceerbaarheid (%)
Flumequine	1600	6	32,1	0,3			0,9	2,9
	800	6	28,2	0,5			1,4	5,1
	400	24	21,9	0,6	1,4	6,0	1,8	8,4
	200	24	17,5	0,4	0,6	2,5	1,1	6,4
	Gem.					4,3		5,7
Enrofloxacin	200	6	35,0	0,9			2,4	7,0
	100	24	32,6	0,8	0,9	3,9	2,2	6,9
	50	24	29,4	0,7	0,9	3,6	2,1	7,1
	25	6	24,7	1,5			4,3	17,4
	12,5	6	19,2	1,2			3,4	17,8
	Gem.					3,7		14,1
Danofloxacin	400	12	32,9	0,6			1,6	4,8
	200	24	29,3	0,6	1,2	5,0	1,6	5,6
	100	24	25,1	0,6	1,1	4,8	1,7	6,9
	50	6	19,4	1,0			2,8	14,2
	Gem.					4,9		7,9
Difloxacin	300	24	30,6	0,6	0,9	3,9	1,6	5,2
	150	24	28,1	0,4	0,6	2,6	1,1	4,0
	75	6	24,3	0,4			1,2	4,7
	37,5	6	19,0	0,6			1,8	9,6
	Gem.					3,3		6,1
Oxolinezuur	800	6	30,2	0,7			2,0	6,7
	400	6	25,6	0,9			2,4	9,5
	200	24	19,6	0,9	1,0	4,0	2,6	13,4
	100	24	15,6	0,5	1,0	4,1	1,4	8,9
	Gem.					4,1		9,6

De precisie data voor de dripsap spikes zijn goed vergelijkbaar met die van de water-vleeshomogenaten, met een gemiddelde relatieve herhaalbaarheid van ongeveer 4% en een gemiddelde rel.reproduceerbaarheid van ongeveer 9%. Tussen de antibiotica verschillen de

percentages niet zoveel. De meeste spreiding komt voor bij lage niveau's (ver onder MRL) enrofloxacine.

4.6 Quinolonen, vergelijking kalkoen en kip

De experimenten zijn ook uitgevoerd met kalkoenfilet ipv kipfilet. Er zijn in water-vleeshomogenaat en dripsap op 2 niveau's (rond MRL) spikes gemaakt analoog aan de methode bij de kip. Dit waren in totaal 12 spikes (3 dagen 4 spikes) welke (op dezelfde dag) op 2 verschillende platen zijn gepipetteerd (n=24).

4.6.1 Water-vleeshomogenaten

De resultaten van de water-vleeshomogenaten staan in tabel 15. Ter vergelijking zijn de resultaten van de kip ernaast vermeld.

Tabel 15: De resultaten voor quinolonen gespiked in water-vleeshomogenaten van kalkoen en kip

Antibioticum	Niveau (µg/kg homogenaat)	n	kip				kalkoen			
			Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%) *	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%) *	Gem. remzone (mm) *	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%) *	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%) *
Flumequine	400	24	22,5	0,5	4,8	6,1	21,8	0,4	3,2	5,7
	200	24	17,7	0,7	9,1	11,5	16,6	0,7	7,3	12,4
	Gem.				7,0	7,1			5,3	9,0
Enrofloxacine	100	24	32,9	0,5	2,4	4,7	32,9	0,5	3,0	4,2
	50	24	30,5	0,4	3,2	3,9	30,0	0,4	2,0	3,6
	Gem.				2,8	7,9			2,5	3,9
Danofloxacine	400		29,6	0,7	4,0	6,9	29,9	0,7	2,4	6,7
	200	24	26,3	0,8	3,5	8,5	26,5	0,8	2,8	8,9
	Gem.				3,8	9,8			2,6	7,8
Difloxacine	300	24	30,3	0,7	3,4	6,2	31,3	0,9	2,3	8,0
	150	24	27,7	0,4	2,5	3,9	28,3	0,5	2,8	5,5
	Gem.				2,9	6,7			2,5	6,7
Oxolinezuur	200	24	21,2	0,4	3,6	4,8	21,0	0,4	3,6	5,8
	100	24	15,8	0,6	9,9	10,3	15,6	0,4	7,1	7,5
	Gem.				6,7	6,8			5,3	6,6

* zie paragraaf 3.4.1

Zoals blijkt uit tabel 15 zijn de resultaten van de kip-experimenten uitstekend extrapoleerbaar naar kalkoen. De gemiddelde diameters van de remzones en daarmee samenhangend de detectiegrenzen zijn bijna identiek. Ook de spreiding (relatieve herhaalbaarheid en relatieve binnen lab. reproduceerbaarheid) zijn goed vergelijkbaar.

4.6.2 Dripsap spikes

De resultaten van de dripsap spikes staan vermeld in tabel 16. Ter vergelijking zijn de resultaten van de kip ernaast vermeld.

Tabel 16: De resultaten voor quinolonen gespiked in dripsap van kalkoen en kip

Antibioticum	Niveau (µg/l drip)	n	kip				kalkoen			
			Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)	Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)
Flumequine	400	24	22,5	0,5	4,8	6,1	21,8	0,4	3,2	5,7
	200	24	17,7	0,7	9,1	11,5	16,6	0,7	7,3	12,4
	Gem.				7,0	7,1			5,3	9,0
Enrofloxacin	100	24	32,9	0,5	2,4	4,7	32,9	0,5	3,0	4,2
	50	24	30,5	0,4	3,2	3,9	30,0	0,4	2,0	3,6
	Gem.				2,8	7,9			2,5	3,9
Danofloxacin	400		29,6	0,7	4,0	6,9	29,9	0,7	2,4	6,7
	200	24	26,3	0,8	3,5	8,5	26,5	0,8	2,8	8,9
	Gem.				3,8	9,8			2,6	7,8
Difloxacin	300	24	30,3	0,7	3,4	6,2	31,3	0,9	2,3	8,0
	150	24	27,7	0,4	2,5	3,9	28,3	0,5	2,8	5,5
	Gem.				2,9	6,7			2,5	6,7
Oxolinezuur	200	24	21,2	0,4	3,6	4,8	21,0	0,4	3,6	5,8
	100	24	15,8	0,6	9,9	10,3	15,6	0,4	7,1	7,5
	Gem.				6,7	6,8			5,3	6,6

Ook voor dripsap zijn de resultaten tussen kip- en kalkoen identiek. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de methode ook uitstekend geschikt is voor de detectie van quinolonen in kalkoenfilet. Hierbij kunnen dezelfde grensstandaarden of actiegrens als bij de kip gehanteerd worden

4.7 Groepsidentificatie en storingsanalyse

De testplaat welke bij een monster de grootste remzone geeft, bepaald de groepsidentiteit. Bij de storingsanalyse is vooral onderzocht of deze groepsidentificatie voor alle stoffen correct is, omdat foutieve identificatie grote consequenties heeft voor het bevestigingsonderzoek. De storingsanalyse is beperkt tot de quinolonen op de *B.cereus* testplaat en de tetracyclines op de *E.coli* testplaten. In fase II van het project zullen storingen van componenten uit ander antibiotica-groepen onderzocht worden.

4.7.1 *B.cereus* testplaat tetracyclines

Aanwezigheid van tetracyclines blijkt uit het optreden van remming bij de *B.cereus* testplaat. De hoogste concentraties aan quinolonen (1600 µg/kg flumequine, 200 µg/kg enrofloxacin, 800 µg/kg danofloxacin, 2400 µg/kg difloxacin, 800 µg/kg oxolinezuur) zijn op de *B.cereus*

testplaat ingepipetteerd om te zien of ze stoorden bij de tetracycline identificatie. Hierbij bleek dat 2400 µg/kg difloxacin en 1600 µg/kg flumequine kleine remzones (±20 mm) op de plaat gaven. De overige quinolonen gaven geen remzones, al moet hierbij vermeld worden dat deze concentraties ook beduidend lager waren.

Het feit dat er kleine remzones optraden is geen probleem. Deze hoge concentraties aan flumequine en difloxacin geven remzones >>30 mm op de *E.coli* screeningsplaat en worden hierdoor als quinolone geïdentificeerd. Wanneer alleen de *B.cereus* testplaat ingezet zou worden, dan zou er wel mogelijk een geringe kans op foutieve identificatie zijn, echter de concentraties van quinolonen moeten dan wel erg ver boven EU MRL liggen. De selectiviteit van de *B.cereus* plaat is ook beschreven in recente publicaties (5) en er zijn weinig stoffen (buiten de tetracyclines) welke remming geven op deze plaat.

4.7.2 *E.coli* screenings- en bevestigingsplaat

De hoogste concentraties aan tetracycline (400 µg/kg OTC en tetracycline, 200 µg/kg doxycycline en CTC) gaven geen remzones op de *E.coli* screeningsplaat en *E.coli* bevestigingsplaat. Hogere concentraties kunnen eventueel wel remzone's veroorzaken, maar de remzones op de *E.coli* testplaten moeten dan minimaal 10 mm groter zijn. Gezien de ervaring met het multi-plaatsysteem beschreven voor melk (5) is het niet te verwachten dat componenten uit andere stofgroepen bij deze testplaten de identificatie zullen verstoren. Bij de *E.coli* testplaten kunnen stoffen die ook werkzaam zijn tegen Gram- bacteriën (bijv. colistine, sommige cephalosporines bij de *E.coli* bevestigingsplaat) remming geven, maar alleen in niveaus boven EU MRL. Hierbij dient vermeld te worden dan residuen van colistine niet te verwachten zijn vanwege het feit dat het niet geabsorbeerd wordt uit het maagdarmkanaal (kippen worden niet parentaal behandeld).

4.8 Praktijkmonsters

Om een indruk te krijgen of de gevonden relatie tussen diameter remzone en concentraties aan antibioticum vergelijkbaar was met praktijkmonsters, zijn 59 praktijkmonsters met een bekend gehalte aan antibioticum met de methode ingezet. Dit waren monsters met doxycycline (n=47) of flumequine (n=12), variërend van 1/5*MRL tot 3*MRLI.

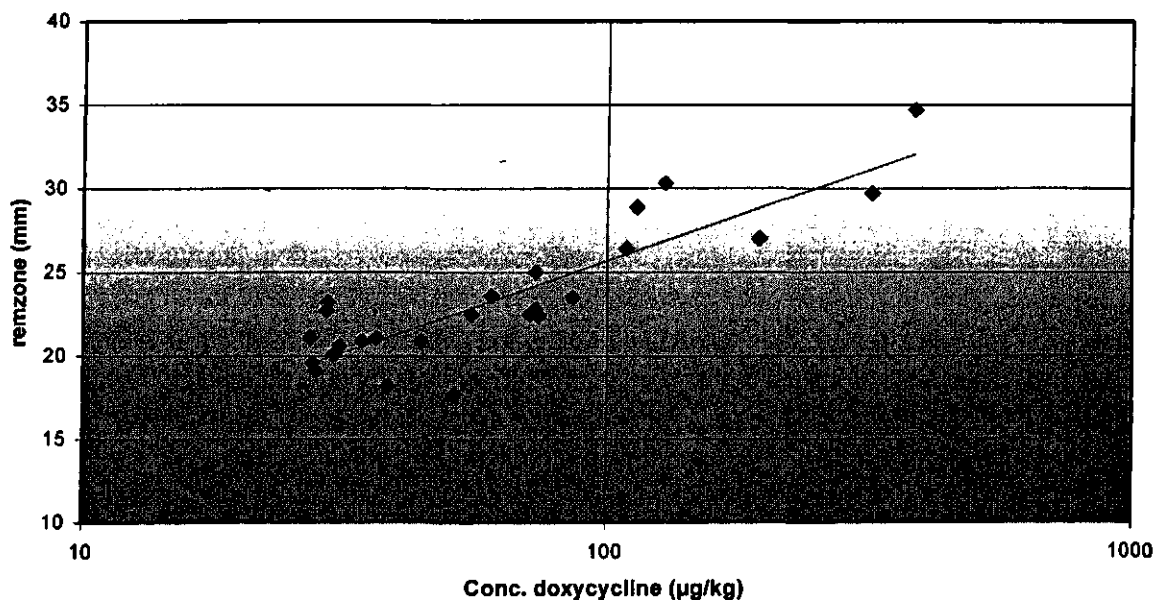
4.8.1 Doxycycline

De individuele remzones per dripsap monster staan vermeld in bijlage 3. De resultaten zijn grafisch weergegeven in figuur 5.

De correlatiecoëfficiënt (R) van de lijn is voor doxycycline in dripsap aanzienlijk slechter dan die bij de spike-experimenten. Een verklaring hiervoor kan zijn, dat praktijkmonsters een wisselende hoeveelheid extracellulair vocht hebben, terwijl de doxy vooral in de spiercel ligt opgeslagen. Uit de grafiek blijkt verder dat MRL overschrijdingen voor doxycycline plaatsvinden bij remzones groter dan 25 mm.

Relatie tussen de remzones in dripsap van praktijkmonsters en de doxycycline concentratie in kipfilet

remzone=a*ln(conc)+b		
a	b	R
4,70	4,00	0,87



Figuur 5: De relatie tussen de remzone op de *B.cereus* testplaat (uitgaande van dripsap) en het doxycycline gehalte (LC-MS kwantificatie) in praktijkmonsters

De detectiegrens en eventueel actiegrens zijn analoog aan de spikes berekend uit de lijnvergelijking. In tabel 15 staan de detectiegrenzen en actiegrenzen weergegeven voor doxycycline gebaseerd op praktijkmonsters.

Tabel 15: De antibioticum concentratie bij een bepaalde diameter van de remzone op basis van praktijkmonsters

Stof	Detectiegrens (µg/kg)		Actiegrens (µg/kg)	
	16 mm	18 mm	20 mm	22 mm
doxycycline	13	20	30	46

Bij vergelijking tussen tabellen 5, 7 en 15 blijkt dat de water-vleeshomogenaat spikes beter overeenkomen met de praktijkmonsters dan de dripsap spikes. Dit was ook te verwachten gezien de in de praktijk optredende antibioticum-weefsel binding of insluiting.

In het algemeen lijken de remzones van de praktijkmonsters iets kleiner dan verwacht aan de hand van de spike-experimenten. Een actiegrens van 20 mm betekent nu actie bij 30 µg/kg doxycycline, terwijl uit de spike-experimenten 20 µg/kg als actiegrens werd berekend.

Opgemerkt dient hierbij te worden dat de detectiegrens van de LC-MS bepaling bij 20 µg/kg ligt, lagere gehalten ontbreken dus in dit figuur, terwijl die bij de spike-experimenten wel zijn meegenomen. Dit kan de curve van de lijn beïnvloeden. Bovendien zijn er weinig data in het gebied

tussen MRL en 4* MRL en zijn de gehaltebepalingen tussen 20 en 65 µg/kg doxycycline in enkelvoud uitgevoerd, wat ev. homogeniteitproblemen niet onderkend.

Gelet op het voorgaande zijn de verschillen tussen de spike-experimenten en de praktijkmonsters voor doxycycline verwaarloosbaar.

4.8.2 Flumequine

Van de quinolonen waren alleen monsters met een bekend gehalte aan flumequine (bepaald met HPLC) voorhanden. De resultaten van deze monsters zijn weergegeven in tabel 17.

Tabel 17: De gevonden remzone bij praktijkmonsters met bekend gehalte aan flumequine en het op basis van de remzone het verwachte gehalte (gebaseerd op de ijklijn van de water-vleeshomogenaat spikes)

Stof	Gehalte (µg/kg)	<i>E.coli</i> screeningsplaat		<i>E.coli</i> bevestigingsplaat	
		Remzone (mm)	Terugberekende gehalte nav ijklijn homogenaat	Remzone (mm)	Terugberekende gehalte nav ijklijn homogenaat
Flumequine	700	25.4	630	24.5	688
	340	20.4	293	19.2	282
	410	20	276	19.8	262
	510	22.7	417	22.2	389
	670	25	592	24.1	546
	490	23.7	486	22.1	382
	100	-		-	
	60	-		-	
	240	±16	150	17.7	174
	130	-		16.0	128
	40	-		-	
	90	-		-	

Uit de resultaten van tabel blijkt dat de resultaten redelijk overeenkomen met die van de spike-experimenten met de water-vleeshomogenaten. De terugberekende concentraties zijn vaak wat lager dan de met HPLC berekende gehalten. Hierbij dient vermeld te worden dat deze praktijkmonsters 2 jaar oud waren (bij <-18°C bewaard). De HPLC gehalte-bepalingen zijn in 1998 uitgevoerd, terwijl de microbiologische dripsap analyses in januari 2001 zijn uitgevoerd. Dus de gevonden verschillen kunnen veroorzaakt worden door een afname in het gehalte aan flumequine tijdens de 2 jaar bewaring (over stabiliteit van flumequine gedurende zo'n lange periode is weinig bekend).

4.9 Geschiktheid voor praktijkonderzoek

Bij seriematige analyses kunnen ongeveer 40-75 monsters per dag door één analist afgehandeld worden. De methode vereist een moulinette (vlees fijnmaler), waterbad, centrifuge (capaciteit voor 24*50 ml buizen) en stoof.

De tijdrovende stap in de methode is de monstervoorbewerking (malen en afwegen van de monsters). Wanneer gebruik gemaakt kan worden van ongemalen monsters dan kan dit mogelijk efficiency winst opleveren (zie ook hoofdstuk 5). Afwegen zal noodzakelijk blijven voor het uitbalanceren van de centrifuge.

5 DISCUSSIE

Het rechtstreeks spiken van vlees, in laten werken en vervolgens verzamelen van dripsap is feitelijk de beste wijze van nabootsen van de praktijk. Echter het bleek niet goed mogelijk om het antibioticum homogeen door het vlees heen te mengen. Er traden in sommige gevallen lokale concentratieverschillen in dripsap op, welke de herhaalbaarheid negatief beïnvloedden. De validatie is daarom uitgevoerd met water-vleeshomogenaat en rechtstreekse dripsap spikes. Bij vergelijking van deze resultaten blijkt dat er voor de meeste stoffen geen verschil in detecteerbaarheid is (OTC, tetracycline, quinolonen) en voor enkele stoffen (doxycycline en CTC) een factor 2 gevoeliger detectie in dripsap tov vlees/water homogenaten mogelijk is. Dit indiceert dat er bij laatstgenoemde stoffen rond de 50% van de antibiotica in het weefsel niet beschikbaar is voor diffusie in de agar (weefselbinding en insluiting). Dit feit wordt bevestigd door de resultaten van de praktijkmonsters met doxycycline, welke goed overeenkomen met de water-vleeshomogenaat spikes.

De methode om dripsap te verkrijgen is gebaseerd op het eerst malen/homogeniseren van monster, vervolgens licht verhitten en afdraaien. De praktijkmonsters zijn ook op deze wijze ingezet, omdat deze meestal alleen gemalen voorhanden waren. Dit betekent dat niet onderzocht is of eventueel ook direkt aanwezig dripsap, bij het ongemalen monster, gebruikt kan worden. Dit zou in de praktijk een tijdswinst kunnen opleveren, maar is alleen aan de hand van praktijkmonsters te bewijzen. Van enkele doxycycline bevattende praktijkmonsters was ook het ongemalen monster voorhanden. Bij deze monsters gaf dripsap van het ongemalen monster identieke resultaten met de dripsap uit het gemalen, verhitte en afgedraaide monster. Of dit voor andere stoffen ook zo is, is niet bekend en dit is mogelijk afhankelijk van de intra- en extra cellulaire verdeling van de antibiotica in het vlees. Het rechtstreeks gebruiken van dripsap geeft tijdswinst in de monstervoorbewerking, maar wanneer ook op de ander stofgroepen (fase II) gescreend moet worden, dan zal de maal-/verhitting-/centrifugatiestap noodzakelijk zijn om genoeg dripsap te verzamelen.

De *B. cereus* testplaat toont doxycycline en chloortetracycline aanzienlijk gevoeliger aan dan de andere twee tetracyclines (oxytetracycline en tetracycline). Dit kan in de praktijk leiden tot veel bevestigingen van monsters welke tussen de 20 en 60 µg/kg doxycycline of CTC bevatten. Om dit te voorkomen kan eventueel analoog aan de quinolonen een bevestigingsplaat geconstrueerd worden. Hieraan is nog wel nader onderzoek noodzakelijk en uit de praktijk zal moeten blijken of een nadere opsplitsing/identificatie inderdaad gewenst is.

De aktiegrens kan voor deze plaat in de praktijk waarschijnlijk het best gekoppeld worden aan een grensstandaard (water-vleeshomogenaat spike) met 50 µg/kg OTC. De grensstandaard dient dan op elke in te zetten plaat meegenomen te worden. De grensstandaard van 50 µg/kg garandeert dat tetracyclines op EU MRL niveau positief zijn in de test, maar afhankelijk van de doelstelling van de gebruiker kan elke ander gewenst niveau van grensstandaard gekozen worden. De functie van de grensstandaard is tweeledig:

1. Kwaliteitscontrole op de testplaat. De grensstandaard moet een goed afleesbare zone geven, ter bewaking van de detectiegrenzen van de methode.
2. Beslissingscriterium voor actie. De monsters met een grotere remzone diameter dan de grensstandaard, op de betreffende plaat, ondergaan (instrumenteel analytische) bevestiging.

Het voordeel van grensstandaarden boven vaste afkeurgrenzen is dat het afkeurniveau constant is. Alle dageffecten welke de remzone-diameters beïnvloeden worden hiermee ondervangen. De grensstandaarden kunnen waarschijnlijk éénmalig bereid, verdeeld in ampullen en ingevroren worden. Het is hierbij wel adviseerbaar om een stabiliteitsonderzoek te verrichten, ter bepaling van de bewaartemperatuur en maximale bewaartermijn.

Bij de *E.coli* screeningsplaat is geen echte grensstandaard nodig omdat elk monster met een remzone de bevestiging (*E.coli* bevestigingsplaat) ingaat. Voor bewaken van de detectiegrenzen (kwaliteitscontrole van de plaat) moet wel een controlestandaard meegenomen worden. Deze controlestandaard kan bijv. 100 µg/kg oxolinezuur (=MRL) zijn. Dit niveau ligt echter op de detectiegrens van de methode. Dit zou kunnen betekenen dat er analyses zijn waar deze concentratie net géén remzone geeft, met als gevolg herinzet van de plaat (=extra werk). Het is daarom praktischer om 300 µg/kg flumequine als controle-standaard mee te nemen, ook al is hiermee niet 100% te garanderen dat het detectieniveau van oxolinezuur 100 µg/kg is. Hierbij dient opgemerkt te worden dat oxolinezuur één van de eerste generatie quinolonen is welke in de praktijk bijna volledig vervangen zijn door de potentere 2e en 3e generatie quinolonen (enrofloxacin, flumequine, danofloxacin en difloxacin).

6 CONCLUSIES

Voor het screenen op residuen van tetracyclines en quinolonen op minimaal 1/2* EU MRL niveau (uitgezonderd oxolinezuur: EU MRL) in pluimveevlees is een eenvoudige en gevoelige methode ontwikkeld. Deze methode is gebaseerd op het analyseren van dripsap gevolgd door een bio-assay met 2 specifieke testplaten. De methode is met dripsap en water-vleeshomogenaat spikes gevalideerd mbt de detectiegrens, herhaalbaarheid en binnenlab reproduceerbaarheid. Op basis van een aktiegrens of vergelijking met een grensstandaard kan gegarandeerd worden dat de residu status van het pluimveevlees voor tetracyclines en quinolonen voldoet aan de EU MRL normen (uitgezonderd oxolinezuur: 1-2*EU MRL). Met deze methode is grootschalig (± 60 monsters / dag) screenen op residuen van bovengenoemde stofgroepen mogelijk. Eventueel kan een derde testplaat als post-screeningsplaat ingezet worden waardoor een nauwkeurigere uitspraak over overschrijding van EU MRL's voor quinolonen gedaan kan worden.

7 LITERATUUR

1. Bogaerts, R. and Wolf, F. - A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Die Fleischwirtschaft* 60, 667-675 (1980).
2. Consumentenbond - Kip, het meest onveilige stukje vlees. *Consumentengids*, juni 2000.
3. Egmond, H.J. van, Nouws J.F.M. – Ontwikkeling van een screeningsmethode voor opsporing en groepsidentificatie van antibiotica residuen in pluimveevlees. RIKILT rapport 98.512 (vertrouwelijk)
4. Egmond, H.J. van, Nouws J.F.M., Rhijn, J.A. van, Keukens, H.J. – Evaluatie van de Premi®Test voor opsporing van antibiotica residuen in pluimveevlees. RIKILT rapport 99.528.
5. Nouws et al. (1998) - A microbiological assay system for judgement of raw milk exceeding EU Maximum residue levels. *International Dairy Journal* 9; 85-90 (1999).
6. Project 71.521.01 Methoden ontwikkeling t.b.v. handhavingstechnieken gerelateerd aan nationale plannen, WDT activiteiten en status van Nationaal referentie laboratorium van RIKILT.
7. CVMP/EMEA Volume VI: Rules governing Medicinal Products in European Community (Council regulation no. 2377/90). Establishment by the European Community of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (1991) p. 109.

Bijlage 1 RESULTATEN VAN DE TETRACYCLINES GESPIKED IN DRIPSAP

Tabel 1 De resultaten van de tetracyclines gespiked in kip drripsap (bijlage 1.1)

Antibioticum	Conc. (µg/l drip)	n	Gemiddelde remzone (mm)	Standaarddeviatie (mm)	95% betr. interval (mm)
OTC	200	6	30,6	1,2	30,6 ± 2,6
	100	24	26,8	1,2	26,8 ± 2,7
	50	24	21,5	1,4	21,5 ± 3,1
	25	24	16,6	0,8	16,6 ± 1,9
Doxycycline	100	6	34,2	0,9	34,2 ± 2,1
	50	24	30,5	1,0	30,5 ± 2,3
	25	24	26,9	1,1	26,9 ± 2,4
	12,5	24	21,9	1,1	21,9 ± 2,3
	6,25	6	17,2	0,8	17,2 ± 1,7
CTC	100	6	36,2	1,4	36,2 ± 3,0
	50	24	32,3	1,4	32,3 ± 3,0
	25	24	28,5	1,2	28,5 ± 2,7
	12,5	24	23,3	0,7	23,3 ± 1,5
	6,25	6	18,6	0,7	18,6 ± 1,6
Tetracycline	200	6	32,3	1,0	32,3 ± 2,1
	100	24	28,6	0,8	28,6 ± 1,8
	50	24	23,2	1,1	23,2 ± 2,5
	25	24	17,3	0,8	17,3 ± 1,8

Bijlage 2 RESULTATEN VAN DE QUINOLONEN GESPIKED IN DRIPSAP

Tabel 1 De resultaten van de quinolonen gespiked in kip dripsap (bijlage 2.1)

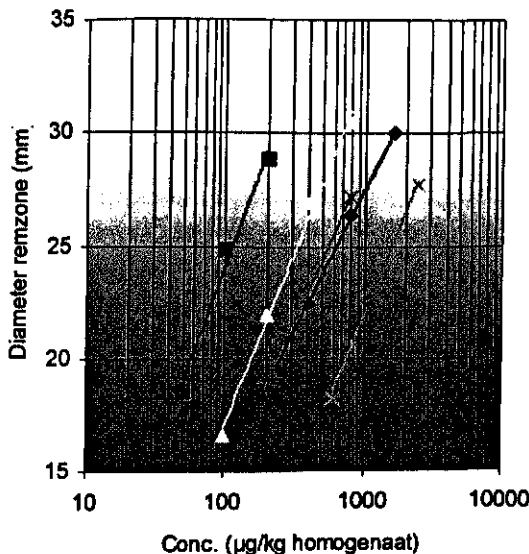
Antibioticum	Conc. (µg/drip)	n	Gem. remzone (mm)	S (mm)	95% betr. interval (mm)
Flumequine	1600	6	32,1	0,3	32,1 ± 0,7
	800	6	28,2	0,5	28,2 ± 1,1
	400	24	21,9	0,6	21,9 ± 1,4
	200	24	17,5	0,4	17,5 ± 0,9
Enrofloxacin	200	6	35,0	0,9	35,0 ± 1,9
	100	24	32,6	0,8	32,6 ± 1,7
	50	24	29,4	0,7	29,4 ± 1,6
	25	6	24,7	1,5	24,7 ± 3,3
	12,5	6	19,2	1,2	19,2 ± 2,7
Danofloxacin	400	12	32,9	0,6	32,9 ± 1,2
	200	24	29,3	0,6	29,3 ± 1,3
	100	24	25,1	0,6	25,1 ± 1,4
	50	6	19,4	1,0	19,4 ± 2,1
Difloxacin	300	24	30,6	0,6	30,6 ± 1,2
	150	24	28,1	0,4	28,1 ± 0,9
	75	6	24,3	0,4	24,3 ± 0,9
	37,5	6	19,0	0,6	19,0 ± 1,4
Oxolinezuur	800	6	30,2	0,7	30,2 ± 1,6
	400	6	25,6	0,9	25,6 ± 1,9
	200	24	19,6	0,9	19,6 ± 2,0
	100	24	15,6	0,5	15,6 ± 1,1

Bijlage 3 DE GEGEVENS VAN DE *E. COLI*/BEVESTIGINGSPLAAT

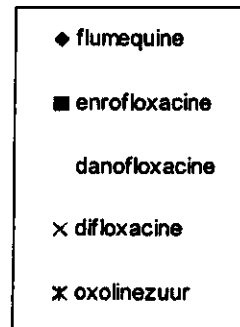
Tabel: De resultaten van de *E. coli* bevestigingsplaat voor water-vleeshomogenaat spikes van quinolonen (bijlage 3.1)

Antibioticum	Niveau (µg/kg hom.)	n	Gemiddelde remzone (mm)	Standaard-deviatie (mm)	95% betr. interval (mm)
Flumequine	1600	6	30,0	0,2	30,0 ± 0,5
	800	6	26,4	0,6	26,4 ± 1,4
	400	24	22,5	0,8	22,5 ± 1,9
	200	24	18,8	0,8	18,8 ± 1,7
Enrofloxacin	200	6	28,9	1,1	28,9 ± 2,4
	100	24	24,9	0,5	24,9 ± 1,1
	50	24	18,5	1,3	18,5 ± 2,9
Danofloxacin	800	6	30,5	0,6	30,5 ± 1,3
	400	6	26,9	0,6	26,9 ± 1,4
	200	24	21,9	1,1	21,9 ± 2,3
	100	24	16,6	1,1	16,6 ± 2,4
Difloxacin	2400	6	27,7	0,7	27,7 ± 1,6
	1200	6	23,5	0,9	23,5 ± 2,1
	600	24	18,2	1,4	18,2 ± 3,2
Oxolinezuur	800	6	27,2	0,5	27,2 ± 1,2
	400	6	23,2	0,9	23,2 ± 1,9
	200	24	18,7	0,8	18,7 ± 1,7

Detectie van quinolonen in kipfilet met de *E. coli* bevestigingsplaat



Stof	y=ax+b		
	a	b	R
Flumequine	5,40	-9,80	1,000
Enrofloxacin	7,45	-10,21	0,992
Danofloxacin	6,75	-14,10	0,996
Difloxacin	6,83	-25,27	0,998
Oxolinezuur	6,11	-13,56	0,999



Figuur: (bijlage 3.1) Relatie remzone diameter op de *E. coli* bevestigingsplaat en de concentratie aan quinolonen in het water-vleeshomogenaat.

Tabel: De antibioticum concentratie (in het homogenaat) bij bepaalde diameters van remzones (aktiegrens, detectiegrens) op de *E.coli* bevestigingsplaat. (bijlage 3.2)

Stof	Detectiegrens ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Aktiegrens ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	16 mm	18 mm	20 mm	22 mm
Flumequine	119	172	250	362
Enrofloxacin	34	44	58	75
Danofloxacin	87	117	157	211
Difloxacin	422	565	757	1015
Oxolinezuur	127	176	244	338

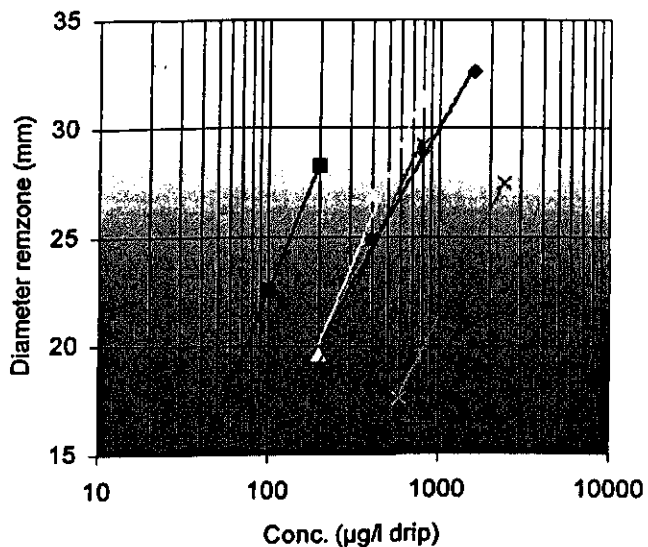
Tabel: De precisie data voor de quinolonen in water-vleeshomogenaat op de *E.coli* bevestigingsplaat (bijlage 3.3)

Antibioticum	Niveau ($\mu\text{g}/\text{kg}$ hom.)	n	Herhaalbaarheid (mm)	Rel.herhaalbaarheid (%)	Binnen lab. reproduceerbaarheid (mm)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)
Flumequine	1600	6			0,6	2,1
	800	6			1,7	6,6
	400	24	1,1	5,1	2,4	10,6
	200	24	0,9	4,7	2,2	11,5
	Gem.			5,9		7,7
Enrofloxacin	200	6			3,0	10,5
	100	24	0,9	3,4	1,4	5,7
	50	24	1,2	6,2	3,7	20,0
	Gem.			4,8		12,1
Danofloxacin	800	6			1,7	5,6
	400	6			1,7	6,5
	200	24	1,1	5,2	3,0	13,7
	100	24	1,8	10,7	3,0	18,3
	Gem.			7,9		11,0
Difloxacin	2400	6			2,0	7,3
	1200	6			2,6	11,3
	600	24	1,2	6,7	4,1	22,3
	Gem.			6,7		13,6
Oxolinezuur	800	6			1,5	5,5
	400	6			2,5	10,7
	200	24	1,0	5,3	2,2	11,7
	Gem.			5,3		9,3

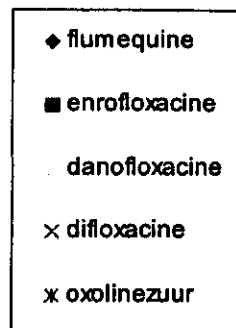
Tabel: De resultaten van de *E.coli* bevestigingsplaat voor dripsap spikes van quinolonen (bijlage 3.4)

Antibioticum	Niveau (µg/l drip)	n	Gemiddelde remzone (mm)	Standaard deviatie	95% betr. interval (mm)
Flumequine	1600	6	32,6	0,2	32,6 ± 0,5
	800	6	28,9	0,3	28,9 ± 0,7
	400	24	24,9	0,5	24,9 ± 1,2
	200	24	19,7	0,9	19,7 ± 1,9
Enrofloxacin	200	6	28,3	0,8	28,3 ± 1,8
	100	24	22,6	0,8	22,6 ± 1,7
	50	24	16,7	1,1	16,7 ± 2,4
Danofloxacin	800	6	31,2	0,4	31,2 ± 1,0
	400	6	26,9	0,8	26,9 ± 1,9
	200	24	19,6	1,5	19,6 ± 3,3
Difloxacin	2400	6	27,4	0,5	27,4 ± 1,2
	1200	6	22,9	0,7	22,9 ± 1,6
	600	24	17,6	0,5	17,6 ± 1,2
Oxolinezuur	800	6	29,2	0,6	29,2 ± 1,3
	400	6	24,9	0,5	24,9 ± 1,0
	200	24	18,8	0,6	18,8 ± 1,4

Detectie van quinolonen in kip dripsap met de *E.coli* bevestigingsplaat



Stof	y=ax+b		
	a	b	R
Flumequine	6,14	-12,43	0,997
Enrofloxacin	8,39	-16,13	1,000
Danofloxacin	8,38	-24,31	0,989
Difloxacin	7,07	-27,53	0,999
Oxolinezuur	7,50	-20,60	0,995



Figuur: (bijlage 3.2) Relatie remzone diameter op de *E.coli* bevestigingsplaat en de concentratie aan quinolonen in dripsap

Tabel: De antibioticum conc. (in drripsap) bij bepaalde diameters van remzones (aktiegrens, detectiegrens) op de *E.coli* bevestigingsplaat.
(bijlage 3.5)

Stof	Detectiegrens ($\mu\text{g/l}$ drip)		Afkeurgrens ($\mu\text{g/l}$ drip)	
	16 mm	18 mm	20 mm	22 mm
Flumequine	102	142	196	271
Enrofloxacin	46	58	74	94
Danofloxacin	123	156	198	252
Difloxacin	470	624	828	1098
Oxolinezuur	132	172	225	293

Tabel: De precisie data voor de quinolonen in drripsap op de *E.coli* bevestigingsplaat
(bijlage 3.6)

Antibioticum	Niveau ($\mu\text{g/l}$ drip)	n	Herhaalbaarheid (mm)	Rel.herhaalbaarheid (%)	Binnenlab. reproduceerbaarheid (mm)	Rel. binnen lab reproducieerbaarheid (%)
Flumequine	1600	6			0,7	2,1
	800	6			1,0	3,3
	400	24	0,9	3,9	1,5	6,2
	200	24	0,9	3,8	2,5	12,5
	Gem.			3,8		6,0
Enrofloxacin	200	6			2,3	8,0
	100	24	1,2	5,1	2,2	9,5
	50	24	1,3	5,4	3,1	18,6
	Gem.			5,3		12,1
Danofloxacin	800	6			1,2	4,0
	400	6			2,4	8,9
	200	24	1,4	5,6	4,3	22,0
	Gem.			5,6		11,6
Difloxacin	2400	6			1,5	5,4
	1200	6			2,1	9,1
	600	24	1,3	5,5	1,5	8,7
	Gem.			5,5		7,7
Oxolinezuur	800	6			1,6	5,6
	400	6			1,3	5,2
	200	24	1,3	5,3	1,8	9,6
	Gem.			5,3		6,8

Bijlage 4 QUINOLONEN, VERGELIJKING KALKOEN EN KIP OP DE *E.COLI* BEVESTIGINGSPLAAT

Tabel: De resultaten voor quinolonen gespiked in water-vleeshomogenaten van kalkoen en kip op de *E.coli* bevestigingsplaat.
(bijlage 4.1)

Antibioticum	Niveau (µg/l hom.)	n	kip				kalkoen			
			Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)	Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)
Flumequine	400	24	22,5	0,8	5,1	10,6	22,3	0,6	4,0	7,7
	200	24	18,8	0,8	4,7	11,5	17,8	0,6	3,8	9,1
Enrofloxacin	100	24	24,9	0,5	3,4	5,7	24,2	0,4	3,0	4,4
	50	24	18,5	1,3	6,2	20,0	19,7	1,0	4,2	13,9
Danofloxacin	400	24	21,9	1,1	5,2	13,7	22,1	0,9	4,7	10,9
	200	24	16,6	1,1	10,7	18,3	16,9	0,6	5,5	10,8
Difloxacin	600	24	18,2	1,4	6,7	22,3	18,5	1,2	6,7	18,0
Oxolinezuur	200	24	18,7	0,8	5,3	11,7	19,3	0,7	4,3	10,4

Tabel: De resultaten voor quinolonen gespiked in dripsap van kalkoen en kip op de *E.coli* bevestigingsplaat
(bijlage 4.2)

Antibioticum	Niveau (µg/l drip)	n	kip				kalkoen			
			Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)	Gem. remzone (mm)	SD (mm)	Rel. herhaalbaarheid (%)	Rel. binnen lab. reproduceerbaarheid (%)
Flumequine	400	24	24,9	0,5	3,9	6,2	24,7	0,4	1,9	4,1
	200	24	19,7	0,9	3,8	12,5	20,0	0,5	3,0	7,4
Enrofloxacin	100	24	22,6	0,8	5,1	9,5	23,1	0,6	3,3	7,2
	50	24	16,7	1,1	5,4	18,6	18,8	0,6	3,5	9,5
Danofloxacin	200	24	19,6	1,5	5,6	22,0	20,4	0,7	5,4	10,3
Difloxacin	600	24	17,6	0,5	5,5	8,7	18,1	0,4	4,3	6,5
Oxolinezuur	200	24	18,8	0,6	5,3	9,6	19,6	0,4	2,9	6,3