

Afdeling Diergeneesmiddelen 1985-11-18

RAPPORT 85.117 Pr.nr. 404.0600

Onderwerp: Onderzoek naar residuen van  
antibiotica en chemothera-  
peutica bij slachtkippen

Bijlage: 1.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, directie VKA, Bibliotheek  
(2x), afdeling Diergeneesmiddelen (5x), Projektbeheer,  
Projektleider (Beek), dr J. Nouws, circulatie.



Projekt: Onderzoek naar het voorkomen, gehalte en stapeling van diverse diergeneesmiddelen in landbouw- en visserijprodukten

Onderwerp: Onderzoek naar residuen van antibiotica en chemotherapeutica bij slachtkippen

Bijlage: 1.

---

Doel:

Doel van het onderzoek was een indicatie te verkrijgen van de situatie met betrekking tot het voorkomen van residuen van antibiotica en chemotherapeutica bij Nederlandse slachtkippen.

Dit naar aanleiding van berichten als zou in Nederland, analoog aan België, ongeveer 4% van de slachtkippen antimicrobiële residuen bevatten.

Samenvatting:

In de periode van 1985-04-22 tot 1985-06-13 werden door de RVV-kring 6 255 vleesmonsters verzameld afkomstig van 68 koppels, overeenkomend met ongeveer 523.000 slachtkippen en afkomstig van 47 bedrijven. Alle monsters zijn microbiologisch gescreend op de aanwezigheid van antibiotica. Daarnaast werd met chemische methoden gekeken naar de aanwezigheid van chlooramfenicol, sulfonamiden en nitrofuranen. Het grootste deel van de analyses werd uitgevoerd door het laboratorium van de RVV-kring 6. Bevestigingsonderzoek en onderzoek op nitrofuranen vond plaats op het RIKILT.

Conclusie:

Bij de microbiologische screening werden geen positieve monsters aangetroffen. De verdachte positieve monsters op chlooramfenicol en sulfonamiden bleken negatief. Bij het onderzoek naar nitrofuranen werd één monster positief gevonden op furaltadon. De aanwezigheid van andere antibiotica/chemotherapeutica kon niet vastgesteld worden door het ontbreken van geschikte analysemethoden.

---

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Medewerker/Samensteller: drs M.M.L. Aerts, dr J. Nouws

Projectleider: W. Beek *w.B.*

*AR.*

## 1. Inleiding

Naar aanleiding van suggesties in de media, als zouden in Nederland in ongeveer 4% van de slachtkippen residuen van antimicrobiële middelen aanwezig zijn, is een gezamenlijke actie van RVV-kring 6 en RIKILT (afd. Diergeneesmiddelen) opgezet om een indicatie te verkrijgen van de werkelijke situatie.

Hiertoe zijn gedurende zeven weken spiervleesmonsters genomen van 68 koppels ter slacht aangeboden kuikens in een aantal slachthuizen. Per koppel werden 3-4 dieren bemonsterd. Aangezien in het algemeen koppelbehandeling plaatsvindt via voer of drinkwater zou dit aantal bemonsterde dieren representatief geacht kunnen worden voor het totale koppel. De 68 koppels waren afkomstig van 47 verschillende mestbedrijven uit heel Nederland.

Opzet van het onderzoek was om met een combinatie van microbiologische en chemische analysemethoden een zo breed mogelijk scala van dierbehandelingsmiddelen te detecteren. Positieve screeningsmonsters zouden bevestigd worden.

## 2. Experimenteel

Alle monsters (255) zijn gecontroleerd op de aanwezigheid van antibiotica op een combinatie van 7-testplaten (RVV-6). Met deze combinatie wordt een zo breed mogelijke screening bewerkstelligd (zie Bijlage 1). Een gedeelte van het monstermateriaal werd steeds 1:3 geblended met fysiologisch zout. Met deze oplossing (suspensie) werd chemisch residu onderzoek uitgevoerd.

Screening op de aanwezigheid van sulfonamiden en chlooramfenicol werd uitgevoerd volgens de in Bijlage 1 genoemde methoden. De HPTLC methode zoals beschreven door Haagsma et al. (1) is niet direct geschikt voor verdunde geblenderde monsters met een pH van 7. De recovery van een aantal sulfa's is slecht en wisselend en met name sulfadimidine is zeer slecht te bepalen (> 1 ppm).

Bevestigingsonderzoek vond plaats via een gemodificeerde HPTLC bepaling op sulfa's (aanzuren oplossing) en een onlangs gepubliceerde methode voor chlooramfenicol met een gevoeligheid van 5 µg/kg (2). Het onderzoek op nitrofuranen (furazolidon, furaltadon, nitrofurazon en nitrofurantoin) vond plaats met een recent ontwikkelde FAST-LC methode waarmee directe analyse van de geblenderde monsters (na stabilisatie) mogelijk was op 10-15 µg/kg niveau (3).

### 3. Resultaten

#### 3.1 Microbiologische testmethoden:

Alle monsters waren negatief op de zeven geteste platen.

#### 3.2 Sulfonamiden en dapson

Bij de screening werden alle monsters op één na negatief bevonden. Hierbij dient echter de onzekerheid over het terugvindingspercentage in beschouwing te worden genomen. Bij heronderzoek van een aantal monsters, waaronder het verdachte positieve, werd geen sulfonamide aangetoond. Met name sulfadimidine is slechts bij hoge concentraties detecteerbaar. Spiking van de geblendende monsters gaf slechte resultaten.

#### 3.3 Chlooramfenicol

Bij de screening werden alle monsters op twee na negatief bevonden (< 10 µg/kg).

Deze monsters plus een tiental andere monsters waren bij het bevestigingsonderzoek negatief (< 5 µg/kg).

#### 3.4 Onderzoek op nitrofuranen

Alle monsters zijn per koppel onderzocht (mengmonsters). Van de 68 koppels was één koppel positief. Heranalyse van de afzonderlijke deelmonsters van dit koppel toonde aan dat slechts één dier positief was op furaltadon (800 µg/kg). Dit werd bevestigd door analyse via HPLC-Diode Array UV/Vis detectie. Hierbij werd zowel de retentietijd als het UV-spectrum van standaard en monsterpiek vergeleken en positief bevonden.

### 4. Discussie

De resultaten van dit oriënterende onderzoek lijken te duiden op een geringe antimicrobiële residu-druk bij slachtkuikens. Met de gebruikte analysemethoden wordt een aanzienlijk deel van de veel toegepaste middelen gecoördereerd. Voor wat betreft chemotherapeutica als de coccidistatica en andere antiprotozoica geeft dit onderzoek geen residuprofiel. Een onderzoek van de Keuringsdienst van Waren in Utrecht naar dimetridazol bij slachtkippen toonde slechts één positief monster (> 10 ppb) van de onderzochte 385.

Voor sulfonamiden dient enige terughoudendheid betracht te worden bij de interpretatie van de onderzoeksresultaten. Een ander onderzoek van de KvW Utrecht gaf echter ook aan dat residuen van sulfadimidine vrijwel niet voorkwamen (1 van de 385). Bij een eventueel vervolgonderzoek begin 1986 zou extra analytische aandacht aan de sulfonamiden besteed dienen te worden. Daarnaast zou nader onderzoek naar tetracyclines wenselijk zijn.

Een analysemethode is in ontwikkeling.

Het enkelvoudig positieve monster op furaltadon is enigszins verwonderlijk gezien de te verwachten koppelbehandeling. Mogelijk dat dit dier (door ziekte?) een afwijkend metabolisme/eliminatie vertoont. Nitrofuranen worden, evenals veel antibiotica (Bijlage 1) zeer snel uitgescheiden en in hoge mate gemetaboliseerd. Een positief vleesmonster zou duiden op medicatie binnen de laatste dag(en) voor het slachten.

#### Referenties

1. N. Haagsma et al., Veter. Quarterly 6, 8 (1984).
2. H.J. Keukens, W.M.J. Beek, M.M.L. Aerts, Journal Chrom. Chromsymp. 735 (1985).
3. RIKILT-rapport 85.116 W.M.J. Beek/M.M.L. Aerts, Ontwikkeling van een FAST-LC methode voor nitrofuranen in melk en vlees.

Bijlage: 1. Interim rapport: Onderzoek naar antimicrobiële residuen bij slachtkippen. Dr J. Nouws, Juni 1985.

Interim-rapport.

**ONDERZOEK NAAR ANTIMICROBIELE RESIDUEN BIJ SLACHTKIPPEN.**

Uitgevoerd door:

**LABORATORIUM R.V.V. KRING- 6**

**Postbus 40010**

**NIJMEGEN**

**JUNI-1985**

## INLEIDING.

In een T.V. uitzending van "Kieskeurig" (Maart,1985) werd een recent Belgisch onderzoek geciteerd waarin vermeld was dat in 4 % van de onderzochte slachtkippen **residuen van antimicrobiële middelen** waren aangetroffen. Dit leek ondergetekende een verontrustend hoog percentage. Recente cijfers betreffende de Nederlandse situatie waren niet voorhanden ( data te oud of het onderzoek uitgevoerd met ongevoelige methoden). In de T.V. uitzending werd verder niet vermeld om welke antibiotica- of chemotherapeutica-residuen het handelde en of er identificatie had plaats gevonden van de (vermeende) residuen. Redenen genoeg om op zo'n kortst mogelijke termijn een residu onderzoek te doen bij Nederlandse slachtkippen gebruikmakend van de meest gevoelige microbiologische en fysisch-chemische methodes om op die manier een zo **duidelijk mogelijk beeld** in de "Nederlandse situatie" te scheppen.

## MATERIAAL EN METHODEN.

### Slachtkippen.

In de periode van 22-4 tot 13-6-1985 werden 255 monsters verzameld afkomstig van 62 koppels (4 per koppel) en betrekking hebbende op **523.036 slachtkippen**. De vleesmonsters (borstspier) waren afkomstig van diverse slachterijen gelegen op de Veluwe. Eigenaar en herkomst van de kippen werd nagegaan ; deze bleken verspreid te zijn over geheel Nederland .

### Onderzoekmethoden

#### **a)Microbiologische technieken.**

Stukjes vers spierweefsel werden op een 7-tal testplaten gelegd; de combinatie van deze testplaten was zodanig gekozen dat alle groepen van antibiotica optimaal gescreend konden worden.



### Testplaten:

- 1) Micrococcus luteus plaat (pH 6.0) -- bebroeding bij 30 ° C.
- 2) Micrococcus luteus plaat (pH 8.0) -- bebroeding bij 30 ° C
- 3) Bacillus subtilis BGA plaat(pH 6.0)-- bebroeding bij 30 ° C.
- 4) Bacillus subtilis BGA plaat(pH 8.0)-- " " 30 °C
- 5) Sulfaplaat (pH 6.0) -- bebroeding bij 30 ° C.
- 6) Sulfaplaat (pH 7.0) -- " " 30 ° C
- 7) Sulfaplaat (pH 8.0) -- " " 30 ° C

Details betreffende de uitvoering zijn op aanvraag verkrijgbaar. De gevoeligheid is weergegeven in Tabel I.

### b)Fysisch-chemische technieken.

Voor het fysisch-chemisch onderzoek werd het spiervlees geblenderd; ~~een~~ deel was bestemd voor het RIKILT om in het VREK programma opgenomen te worden voor onderzoek op o.a. (anthelmintica,) coccidiostatica, <sup>! hoer!</sup> en voor o.a. bevestigingsonderzoek van die antimicrobiële residuen, waarbij hoogspanningselectroforese tekort zou schieten (b.v. sulfonamides, chlooramfenicol). Een ander deel van het monstermateriaal werd gebruikt voor fysisch-chemische screening op aanwezigheid van residuen van sulfonamide en chlooramfenicol, wat in het Laboratorium van de RVV-Kring 6 uitgevoerd werd.

#### Sulfonamide-onderzoek.

De **dunne-laag-chromathographische methode** voor de opsporing van sulfonamide residuen, zoals die beschreven is door Haagsma et al. (Veterinary Quarterly, 6, 8-12) werd toegepast. Gevoeligheid 0.05-0.10 ug sulfa/g spierweefsel (Tabel I).

#### Chlooramfenicolonderzoek

Een **HPLC methode** met extractie en voorzuivering (ontwikkeld in het Laboratorium van de RVV-Kring 6) werd gebruikt om residuen van chlooramfenicol op te sporen. (Details van de methode op aanvraag beschikbaar). De gevoeligheid van de methode ligt tussen 5 en 10 pbb.

## RESULTATEN.

### a) Microbiologische test methoden.

Alle microbiologische testen waren **negatief**.

### b) Dunne laag chromathographie.

Alle monsters **negatief** op één dubieuze na. Wordt nader op het RIKILT onderzocht.

### c) HPLC-onderzoek.

In twee koppels waren mogelijk residuen van chlooramfenicol aanwezig, zij het op een zeer laag niveau ( 10 tot 15 ppb level). Bevestigings-onderzoek is nog gaande bij het RIKILT.

## DISCUSSIE.

Antibiotica worden door vogels (kippen) zeer **snel uitgescheiden**. Bij experimenteel onderzoek blijken de residu-concentraties i.h.a. binnen 2 dagen beneden de detectielevel te liggen, uitgezonderd b.v. de parenteraal toegediende aminoglycosides, tetracyclines en na orale applicatie van sulfonamides. Om een beter inzicht in het residu patroon bij kippen te verkrijgen wordt momenteel experimenteel onderzoek verricht in het Laboratorium van de RVV-kring 6 betreffende de farmacokinetiek en de residu persistentie van antimicrobiële middelen in slachtkippen en eieren. Dit gebeurt in nauwe samenwerking met het RIKILT en de Landbouw Hogeschool te Wageningen.

Gezien deze eerste gegevens blijkt de **antimicrobiële residu-druk** bij slachtkippen uitermate **gering** te zijn. Een vervolgonderzoek in de wintermaanden lijkt ons zinvol. Bovendien kunnen de simpele microbiologische technieken gemakkelijk in meerdere RVV-kringlaboratoria uitgevoerd worden om zodoende nog beter de "vinger aan de residu-pols" te houden (b.v. steekproefsgewijze monsternamen van enkele koppels/week).

Nijmegen, Juni, 1985

Dr. J. F. M. Nouws

Tabel I GEVOELIGHEID VAN DE GEBRUIKTE METHODEN.

ANTIBIOTICA + CHEMO- THERAPEUTICA.	Gevoeligheid van methode in $\mu\text{g/g}$ .weefsel	Test methode
Beta-lactam antibiotica (b.v. penicilline, (ampicilline etc. )	0.02 - 0.1	bioassay
Tetracyclines	0.05 - 0.3	bioassay
Aminoglycosides (strept, kana, neo)	0.2 - 0.4	bioassay
Macroliden (erythro, spira, tylosin)	0.05 - 0.3	bioassay
Sulfonamides	0.06 - 0.5	bioassay
"	0.05 - 0.1	dunne l. chrom.
Chlooramfenicol	0.005 - 0.01	HPLC