

Afd. Microbiologie

1981-06-09

VERSLAG 81.46

Pr.nr. 303.6020

Onderwerp: Identificatie van antibiotica-
residuen in rauwe melk.

Verzendlijst: Van Doesburgh, adj. directeur, sektorhoofden (3x),
directie VKA, afd. Microbiologie (4x),
leesportefeuille(5x), afd. Normalisatie, afd. project-
beheer

Afdeling Microbiologie
Verslagnr. 81.46

Pr.nr. 303 6020
dd. 1981-06-09

Project: Onderzoek monsters melk- en zuivelprodukten voor melk- en zuivelcontroleinstellingen.

Onderwerp: Identificatie van antibioticaresiduen in rauwe melk.

Doel

Inzicht te krijgen welke antibiotica voorkomen in rauwe melk.

Samenvatting:

In de melkcontrolestations wordt rauwe melk onderzocht op de aanwezigheid van penicilline m.b.v. de S.thermophilus proef.

Wanneer remming optreedt die opgeheven kan worden met penicillinase dan is penicilline aangetoond; wordt de remming niet opgeheven dan spreekt men van zgn. "vals-positief".

Deze zgn. vals-positieven worden ons door de stations ter beschikking gesteld voor onderzoek naar de aanwezigheid van andere antibioticaresiduen.

Het Centraal Orgaan voor Melkhygiene wil op deze manier een inzicht krijgen of de remmingen inderdaad veroorzaakt worden door andere antibiotica dan penicilline.

Conclusie:

De tot nu toe onderzochte monsters vertonen inderdaad remmingen die door andere antibiotica dan penicilline veroorzaakt worden.

Verantwoordelijk: N. Broex *NB*

Samenstellers/medewerkers: A. Brandwijk, P. Herben

AB

PH

1. Inleiding.

1.1 Bij de aanvang van dit onderzoek is in eerste instantie gewerkt volgens de NIZO-methode van Hassing et al (5.).

Hierbij worden de melkmonsters geëxtraheerd met aceton en verdund zoutzuur en daarna onderworpen aan hoogspanningselectroforese gevolgd door bioautografie.

Daar deze methode bijzonder arbeidsintensief bleek zijn wij na enige experimenten overgestapt op het identificeren van antibioticaresiduen direkt uit de melk dus zonder voorextractie met aceton en/of zoutzuur.

1.2 Een 20 tal melkmonsters waaraan, voor de onderzoekers, onbekend antibioticum was toegevoegd werden onderzocht op de NIZO-methode en de methode zonder voorextractie. De resultaten staan vermeld in tabel 1 en 2.

Deze laatste methode leverde goede resultaten op maar had soms het nadeel dat de melk een soort "staart" vormde in de remmingsvlek in de richting van de anode en mogelijk de remming veroorzaakt door het antibioticum zou kunnen maskeren.

Om dit te voorkomen werd de melk helder gemaakt door de pH op 4 te stellen, te centrifugeren en de bovenstaande heldere vloeistof voor gebruik op pH 6 te stellen.

De resultaten staan in tabel 3.

1.3 De tot nu toe ontvangen melkmonsters werden eveneens op deze manier onderzocht.

Zie voor de resultaten tabel 4.

1.4 De minimale concentraties van 18 antibiotica, opgelost in volle melk, die nog remming geven werden vastgesteld in de proef met hoogspanningselectroforese en met het organisme *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953.

De resultaten staan in tabel 5.

2. Monsters.

Van 5 melkcontrolestations ontvingen wij 69 melkmonsters die door deze controlestations waren aangemerkt als zgn. "vals-positief". Soms waren er wel problemen met de grootte van het monster zodat er geen uitvoerig onderzoek mogelijk was.

3. Resultaten.

Tabel 1 geeft een overzicht van de remmingszones van 20 monsters antibiotica-bevattende melk m.b.v. de discmethode en het organisme *B.stearothermophilus* var. *calidolactis* C953.

Tabel 2 geeft een overzicht van het gedrag van 20 monsters antibiotica-bevattende melk tijdens hoogspanningselectroforese en vervolgens de identificatie van het antibioticum in deze monsters.

Tabel 3 geeft een overzicht van het gedrag van 18 antibiotica tijdens hoogspanningselectroforese.

Tabel 4 geeft een overzicht van de identiteit van antibiotica residuen in 69 melkmonsters afkomstig van melkcontrolestations.

Tabel 5 geeft een overzicht van de minimale concentraties van 18 antibiotica, opgelost in volle melk, die nog remming geven in de proef met hoogspanningselectroforese en *B.stearothermophilus* var. *calidolactis* C953.

4. Discussie.

Van de 20 monsters antibiotica bevattende melk kon van 10 monsters het antibioticum of de antibiotica m.b.v. de NIZO methode worden geïdentificeerd. Van 2 monsters niet omdat er niet nader te identificeren tetracyclines in aanwezig waren, van 5 niet omdat deze een remming gaven in een gebied waar meer dan een antibioticum een remming geeft en 2 monsters bevatten geen antibioticum.

In 1 monster waren 3 antibiotica aanwezig waarvan er 2 wel en 1 niet aangetoond werd.

Wat de tetracyclines betreft zullen wij in dit systeem dus voorlopig moeten volstaan met het aantonen van de groep tetracyclines en het probleem van de antibiotica die hun remmingszone in hetzelfde gebied geven dient nog opgelost te worden.

Voorts is na overleg besloten:

- a. Alle ingezonden melkmonsters controleren met *B.stearothermophilus* var. *calidolactis* of de remming \geq de remming van 0.005 IE penicilline
- b. Monsters met remming $<$ 0.005 IE penicilline niet in behandeling nemen

- c. Aangeven welke monsters een remming geven > 0.01 IE penicilline.
- d. Alle monsters met remming > 0.005 IE penicilline zonder voorbehandeling onderzoeken met de bacteriespectrum methode.
- e. Daarna de monsters zonder voorbehandeling onderzoeken m.b.v. hoogspanningselectroforese en indien voldoende monster aanwezig ook na voorbehandeling.

5. Literatuur.

F. Hassing, J. Stadhouders en T.E. Galesloot.

An electroforetic method for the identification of antibiotic residues in small volumes of milk.

Tabel 1. Remmingszones van 20 monsters antibiotica-bevattende melk, aceton en HCl extracten.

Zone diameter in mm

| | melk | aceton extract | HCL extract | antibioticum | concentratie in $\mu\text{g/ml}$ |
|----|------|----------------|-------------|---|----------------------------------|
| 1 | 25 | 25 | 16.5 | Tylosine | 33 |
| 2 | 19 | 20 | - | Spiramycine | 22 |
| 3 | 17 | - | 17 | Neomycine | 13 |
| 4 | 25 | 23.5 | - | Erythromycine | 15 |
| 5 | 23 | 20.5 | 17.5 | Zinkbacitracine | 21 |
| 6 | 23 | 21 | - | Lincomycine | 2 |
| 7 | 34 | 34 | 21 | Cloxacilline | 5 |
| 8 | - | - | - | Afwezig | |
| 9 | 20 | 20 | - | Chlooramfenicol | 36 |
| 10 | 21.5 | 21.5 | 13.5 | Neomycine en Oleandomycine | 40 60 |
| 11 | 22.5 | 21 | 23 | Chloortetracycline | 6 |
| 12 | 24.5 | 24.5 | - | Lincomycine | 12 |
| 13 | 27.5 | 25 | 25 | Oxytetracycline | 24 |
| 14 | 20.5 | 20 | - | Oleandomycine | 36 |
| 15 | 25 | 24 | - | Novobiocine | 26 |
| 16 | 26.5 | 26.5 | 25 | Neomycine en Tetracycline en Tylosine | 13 19 10 |
| 17 | 39.5 | 37 | 18 | Penicilline | 8 |
| 18 | - | - | - | Afwezig | |
| 19 | 27 | 29 | 15 | Rifamycine | 7 |
| 20 | 16 | - | 15 | Streptomycine | 18 |

Tabel 2. Resultaat van het onderzoek van 20 monsters antibiotica-bevattende melk met behulp van hoogspanningselectroforese.

Organisme *B.stearothermophilus* var.*calidolactis* C953 en *B.cereus* 11778.

| | loopafstand in cm | | looprichting | identificatie | werkelijk aanwezig |
|----|--|--------------------------|--------------|--------------------|--------------------|
| | <i>B.stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953 | <i>B cereus</i> 11778 | | | |
| 1 | 3.5 - 8.1 | 5.5 - 8.3 | kathode | Tylosine | Tylosine |
| 2 | 8.5 - 10.5 | - | kathode | Lincomycine | Spiramycine |
| 3 | 0 - 3.6 | - | anode | Cloxacilline | Neomycine |
| 4 | 6.5 - 9.5 | 6.5 - 10 | kathode | Oleandomycine | Erythromycine |
| 5 | 1 - 5 | - | kathode | Bacitracine | Bacitracine |
| 6 | 8 - 9.5 | - | kathode | Lincomycine | Lincomycine |
| 7 | 0 - 5 | - | anode | Cloxacilline | Cloxacilline |
| 8 | - | - | - | afwezig | afwezig |
| 9 | - | 2.5 - 4.7 | kathode | Chlooramfenicol | Chlooramfenicol |
| 10 | 0.5 - 4 | 0.5 - 3.3 | anode | Neomycine | Neomycine |
| | 6.7 - 9.3 | 6.5 - 10 | kathode | Oleandomycine | Oleandomycine |
| 11 | 0 - 3 | 0 - 3.8 | kathode | Tetracycline | Chloortetracycline |
| 12 | 7 - 10.4 | 8.5 - 10.5 | kathode | Lincomycine | Lincomycine |
| 13 | 1 - 3 | 0 - 3.3 | kathode | Chloortetracycline | Oxytetracycline |
| 14 | 7 - 9.3 | 7 - 10.6 | kathode | Oleandomycine | Oleandomycine |
| 15 | 0 - 2 | 0 - 2.5 | anode | Novobiocine | Novobiocine |
| 16 | 0 - 3.5 | 0 - 4.9 | kathode | Tetracycline | Tetracycline |
| | 5 - 9 | 8 - 10 | kathode | Tylosine | Tylosine |
| | ? | ? | | ? | Neomycine |
| 17 | 0.5 - 5.5 | - | anode | Cloxacilline | Penicilline |
| 18 | - | - | - | afwezig | afwezig |
| 19 | 0 - 1.5 | 0 - 2.2 | anode | Novobiocine | Rifamycine |
| 20 | 5 - 7.4 | 5.3 - 7.7 | kathode | Streptomycine | Streptomycine |

Tabel 3. Overzicht van het gedrag van 18 antibiotica gedurende electroforese.
(1 1/2 uur, 500 V).

Organisme *B.stearothermophilus* var. *calidolactis* C953.

| Antibioticum | concentratie in $\mu\text{g/ml}$ | looprichting | loopafstand in cm |
|--------------------|----------------------------------|--------------|-------------------|
| Tylosine | 0.5 | kathode | 4.6 - 6.9 |
| Spiramycine | 10 | kathode | 6.7 - 9.5 |
| Erythromycine | 1 | kathode | 5.8 - 7.8 |
| Lyncomycine | 1 | kathode | 7.1 - 8.7 |
| Oleandomycine | 15 | kathode | 6.2 - 8.2 |
| Streptomycine | 10 | kathode | 4.4 - 7.7 |
| Oxytetracycline | 1 | kathode | 0.5 - 2.5 |
| Tetracycline | 1 | kathode | 1.3 - 3.3 |
| Chloortetracycline | 1 | kathode | 1 - 2.6 |
| Zinkbacitracine | 5 | kathode | 1.5 - 4.1 |
| Chlooramfenicol | 100 | kathode | 3 - 4.5 |
| Neomycine | 5 | anode | 2 - 4.1 |
| Penicilline | 0.025 | anode | 1.8 - 4.2 |
| Cloxacilline | 0.25 | anode | 1.9 - 3.4 |
| Novobiocine | 50 | anode | 0 - 1.3 |
| Rifamycine | 10 | anode | 0 - 1.3 |
| Rifampicine | 1 | kathode | 0 - 3.5 |
| Kanamycine | 100 | kathode | 5 - 7.3 |

Tabel 4 Resultaat van het onderzoek van 69 melkmonsters.

| | |
|-----|---|
| 45x | Tetracyclines |
| 8x | Tetracyclines en een onbekende groeiremmende stof |
| 5x | Bacitracine |
| 2x | Cloxacilline |
| 1x | Lyncomycine of Oleandomycine |
| 4x | Onbekend |
| 4x | Geen remming |

Tabel 5 Minimale concentraties van 18 antibiotica, opgelost in volle melk, die nog remming geven in de proef met electroforese en het organisme *B-stearothermophilus* var. *calidolactis* C953.

| Antibioticum | concentratie in $\mu\text{g/ml}$ |
|--------------------|----------------------------------|
| Tylosine | 0.1 |
| Spiramycine | 2.5 |
| Erythromycine | 0.25 |
| Lincomycine | 0.5 |
| Oleandomycine | 5 |
| Streptomycine | 2.5 |
| Oxytetracycline | 0.5 |
| Tetracycline | 0.5 |
| Chloortetracycline | 0.5 |
| Zinkbacitracine | 1 |
| Chlooramfenicol | 50 |
| Neomycine | 2.5 |
| Penicilline | 0.005 |
| Cloxacilline | 0.05 |
| Novobiocine | 0.5 * |
| Rifamycine | 0.25 * |
| Rifampicine | 0.025 |
| Kanamycine | 50 |

* Opgelost in water, omdat melk de remming maskeert.