

OUDE EN NIEUWE OPSPORINGSTECHNIEKEN VOOR ANTIBIOTICARESIDUEN IN HET KADER VAN DE HUIDIGE BELGISCHE EN EUROPESE WETGEVING

L. Okerman¹, K. De Wasch¹, H. De Brabander¹, R. Abrams², J. Van Hoof¹,
M. Cornelis³, L. Laurier⁴

Vakgroep Toezicht op eetwaren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, België.

² CEAT - Hygantec, Prins Boudewijnlaan 97, 9100 Sint-Niklaas, België.

³ Instituut voor Veterinaire Keuring, Wetstraat 56, 1040 Brussel, België.

⁴ Ministerie van Sociale Zaken, Volksgezondheid en Leefmilieu, Bisschoffsheimlaan 33, 1000 Brussel, België.

SAMENVATTING

Als in een eetwaar van dierlijke oorsprong residuen van toegelaten antibiotica worden aangetroffen, en het gehalte ervan overschrijdt de maximale residulimiet, dan wordt de veehouder gesanctioneerd met een R-statuuut. Een positief resultaat wordt in de meeste gevallen bekomen na een reeks analyses. Om dergelijke residuen op te sporen worden de monsters eerst gescreend: door middel van relatief eenvoudige testen, bijvoorbeeld een inhibitietest, zoals de Nieuwe Belgische Niertest (NBNT), worden verdachte monsters opgespoord. Ook *enzyme immuno assays* en receptortesten worden vaak voor dat doel gebruikt. Meestal reageert de overgrote meerderheid van de monsters negatief. De verdachte monsters worden dan verder onderzocht door middel van technieken die in staat zijn het residu met een hoge mate van zekerheid te identificeren en de concentratie ervan te bepalen: de bevestigings- en kwantificatiemethoden. Deze laatste zijn zonder uitzondering chromatografische methoden. Een R-statuuut wordt dus niet toegekend op basis van een inhibitietest, maar wel na een positief resultaat van een chemische analyse. Zeer snelle resultaten zijn voorlopig niet mogelijk. Anderzijds garanderen de gebruikte methoden dat de resultaten zeer betrouwbaar zijn. Bij noodslachtingen daarentegen zijn dure analyses economisch niet verantwoord. Daarom worden in nood geslachte dieren afgekeurd, als het resultaat van de NBNT positief is, alhoewel dit geen bewijs is dat de MRL regelgeving overtreden werd. De afkeuring is een maatregel die de dierenarts-keurder neemt om de volksgezondheid te beschermen en is niet bedoeld als wettelijke sanctie.

Sinds enige tijd zijn strenge sancties voorzien voor veehouders die de wachttermijnen van de geneesmiddelen niet respecteren. Artikel 4, paragraaf 2 van het Koninklijk Besluit van 8/9/97, betreffende maatregelen inzake de verhandeling van landbouwhuisdieren, ten aanzien van bepaalde stoffen of residu's daarvan met farmacologische werking luidt als volgt: "Wanneer de aanwezigheid van residu's van een toegestane stof of stoffen in grotere hoeveelheden dan de maximumwaarden aangetoond wordt door de bevoegde diensten door een analyse van monsters die bij een controle op de bedrijven of in het slachthuis of bij een controle van vlees genomen werden, gaat de Dienst over tot een enquête in het beslag van herkomst om de oorzaak van de aanwezigheid van residu's van de toegestane stof of stoffen te bepalen en tot de merking van alle landbouwdieren van dezelfde soort van het beslag of van de identificatiedocumenten van deze dieren". Met "de Dienst" wordt bedoeld de Veterinaire Diensten van het Ministerie van Middenstand en Landbouw. Met "beslag" wordt bedoeld "het geheel van dieren die op een plaats worden gehouden en een afzonderlijk geheel vormen op epidemiologisch gebied zoals vastgesteld door de inspecteur-dierenarts". "Grotere hoeveelheden

dan de maximumwaarden" zijn concentraties hoger dan de maximale residulimieten (MRL) die gelden voor het betreffende weefsel en voor de betreffende diersoort (Anoniem, 1997a). In het ministerieel besluit van 10 september 1997, houdende uitvoering van het hogervermeld Koninklijk Besluit, wordt bepaald op welke manier en hoe lang slachtdieren afkomstig uit bedrijven in overtreding zullen worden gemerkt (Anoniem, 1997b). De regelgeving is van toepassing op alle toegelaten farmacologisch werkzame substanties.

Vrij vertaald luiden deze wetteksten: wanneer in een eetbaar weefsel van een slachtdier (of bij dierlijke producten, zoals melk, eieren en honing) residuen van een toegelaten antibioticum worden gevonden in een concentratie hoger dan de MRL, dan zal het bedrijf van waar dit dier afkomstig is daar ernstige financiële gevolgen van ondervinden. Gedurende 8 weken krijgt dit bedrijf een zogenaamd "R-statuuut". Tijdens die periode zijn de identificatiebewijzen van alle dieren die ter slachting worden aangeboden op één of andere manier gemerkt met een "R" en moeten de karkassen onderzocht worden op aanwezigheid van de betreffende stof of groep stoffen (1 analyse per 10 aangeboden dieren of fractie daarvan). Deze periode wordt ver-

lengd met 26 weken indien een nieuwe inbreuk wordt vastgesteld. Wanneer bij een slachtdier echter residuen aangetroffen worden van een niet toegestane stof, bijvoorbeeld chloramphenicol, dan krijgt het bedrijf een "H-statuu" en zijn de sancties nog zwaarder: het H-statuu duurt 52 weken, die met 104 weken worden verlengd, indien nogmaals een inbreuk wordt vastgesteld. Tijdens die periode mag geen enkel dier worden verhandeld, tenzij om naar een in het binnenland gelegen slachthuis te worden gebracht (Anoniem, 1997a, 1997b, 1997c). Ook hier moet een vast percentage van de aangeboden dieren worden onderzocht op kosten van de eigenaar.

De behandelende dierenarts en het laboratorium spelen elk een rol in het residubeleid. De rechtstreekse oorzaak van elk "R-statuu" is een positief resultaat van een laboratoriumanalyse. De resultaten van deze technieken zijn op hun beurt een onmiddellijk gevolg van een diergeneeskundige behandeling. Het is nuttig dat ook praktijkdierenartsen op de hoogte zijn van de laboratoriumtechnieken, zodat ze de resultaten kunnen interpreteren en aan hun klanten de nodige uitleg kunnen verschaffen.

Daarom geven wij in dit overzicht toelichting omtrent de methoden gebruikt bij het opsporen van antibioticaresiduen en vooral over de wijze waarop de resultaten gebruikt worden in het kader van de MRL verordeningen. Op die manier wordt duidelijk gemaakt op welke basis een veehouder gesanctioneerd wordt met een R-statuu.

SCREENINGTECHNIEKEN VERSUS CONFIRMATIE OF BEVESTIGINGS- EN KWANTIFICATIEMETHODEN: DEFINITIES EN KARAKTERISTIEKEN

Residuen van antibiotica worden opgespoord in erkende laboratoria (Anoniem, 1998) en met diverse technieken. Een eerste groep technieken omvat de (micro)biologische methoden (Korsrud *et al.*, 1998). Een tweede soort testen maakt gebruik van een stof die één analyt of een groep analyten specifiek bindt. Hiertoe behoren de immunologische testen (Martlbauer *et al.*, 1994) en de receptortesten (Korsrud *et al.*, 1992). De derde groep tenslotte zijn de chromatografische methoden (Oka *et al.*, 1995). Elk van deze technieken heeft zijn eigen rol binnen een strategie die gebruikt wordt om antibiotica op te sporen.

Om te onderzoeken of een eetwaar al dan niet voldoet aan de MRL regelgeving wordt een monster ervan in de meeste gevallen eerst gescreend. Door middel van relatief eenvoudige testen worden verdachte monsters onderscheiden van monsters die de opgespoorde residuen niet bevatten of waarvan het residugehalte de betreffende MRL's niet overschrijdt. Meestal reageert de overgrote meerderheid van de monsters negatief. De verdachte monsters worden dan verder onderzocht door middel van een techniek die in staat is het actief product en zijn eventuele metaboliëten met een hoge mate van zekerheid te identificeren en de concentratie ervan te bepalen: de bevestigings- en kwantificatiemethoden. Zoals we verder zullen aantonen, zijn alleen chromatografische methoden gekop-

peld aan geavanceerde detectietechnieken in staat om een betrouwbaar kwantitatief en kwalitatief resultaat te geven.

Accreditatie en validatie

Laboratoria worden door de bevoegde autoriteiten slechts erkend voor de officiële controle op residuen wanneer ze geaccrediteerd zijn (Anoniem, 1996). Een geaccrediteerd laboratorium is een laboratorium dat bewezen heeft dat alle activiteiten, waarvoor de accreditatie geldt, uitgevoerd worden volgens strenge kwaliteitsnormen. Dit wordt gecontroleerd door en staat onder toezicht van een accreditatie-instelling. Elke analysemethode waarvoor het laboratorium geaccrediteerd is, moet gevalideerd zijn; dit bewijst dat de methode geschikt is. Dat het laboratorium in staat is de methode toe te passen is een eerste garantie voor de betrouwbaarheid van de resultaten. Voor de testen die gebruikt worden in de residuanalyse betekent dit onder andere dat detectielimieten werden bepaald van de analyten die opgespoord worden. Ook moet statistisch aangetoond worden dat de variatie in de resultaten gering is, met andere woorden dat een monster dat vandaag positief reageert, morgen niet negatief zal zijn en omgekeerd.

Een validatie gebeurt één maal, doch daarnaast wordt in geaccrediteerde laboratoria de performantie van de gebruikte testen continu beoordeeld, door middel van zogenaamde eerstelijns-, tweedelijns- en/of derdelijnscontroles. Dit houdt in dat negatieve en positieve monsters mee geanalyseerd worden en dat de bekomen resultaten van deze controles geëvalueerd worden. Bij een eerstelijnscontrole weet degene die de analyse uitvoert wat de controlemonsters bevatten en kan dus zelf nagaan of de resultaten binnen de verwachte grenzen liggen. Elke reeks analyses is in principe vergezeld van een eerstelijnscontrole, in de vorm van minstens één negatief controlemonster en minstens één monster belast met een gekende concentratie van het analyt. Belaste of gespikete monsters (*spiked samples*) zijn onafhankelijke blanco monsters waaraan een bepaalde hoeveelheid van het analyt is toegevoegd. Bij een tweedelijns- en derdelijnscontrole weet de uitvoerder zelf niet welke resultaten moeten worden bekomen. Een tweedelijnscontrole wordt in het laboratorium zelf georganiseerd, terwijl de zogenaamde ringtesten (derdelijnscontroles) georganiseerd worden buiten het laboratorium en toelaten om de resultaten van verschillende laboratoria onderling te vergelijken.

De validatiekarakteristieken, met andere woorden de voorwaarden waaraan een methode moet voldoen, zijn verschillend naargelang deze methode beschouwd wordt als screeningtest dan wel als kwantitatieve bevestigingstechniek. Het percentage vals-negatieve resultaten moet altijd zo laag mogelijk zijn. Enkele vals-positieve resultaten kunnen getolereerd worden bij een methode die gebruikt wordt als screening, omdat alle positieve monsters toch verder onderzocht worden (Okerman *et al.*, 1997). Een bevestigingsmethode daarentegen moet een betrouwbaar positief resultaat opleveren. In de eerste plaats moet er een zo groot mogelijke zekerheid zijn betreffende de identiteit van het

residu en wanneer de MRL overschreden is moet er zekerheid bestaan omtrent de concentratie van het analyt. Bij de bespreking van de verschillende soorten analyses zal hier verder worden op ingegaan.

(MICRO)BIOLOGISCHE INHIBITIE-TESTEN: OP- SPOREN VAN KIEMGROEI-REM- MENDE STOFFEN

Algemene karakteristieken

Antibiotica behoren tot een aantal chemisch niet-verwante groepen van stoffen die één gemeenschappelijke eigenschap bezitten: ze remmen de groei van bacteriën. De microbiologische testen zijn gebaseerd op deze eigenschap. Hieruit volgt dat ze niet specifiek zijn voor één bepaalde stof of groep van stoffen, alhoewel er natuurlijk verschillen bestaan in gevoeligheid (Korsrud *et al.*, 1998).

Er bestaan meerdere soorten inhibitietesten. Melk wordt geanalyseerd met behulp van een snelgroeiende bacterie; de voedingsbodem bevat een indicator die aangeeft of de kiem groeit (negatief resultaat) of geremd wordt (positief resultaat). Bij slachtdieren daarentegen worden vooral agardiffusietesten gebruikt: het te onderzoeken materiaal wordt op een vaste voedingsbodem gelegd, die vooraf beënt werd met een gevoelige bacterie. Na incubatie overnacht inspecteert men de platen op aanwezigheid van een zone zonder groei rond dit materiaal.

Deze inhibitietesten werden in eerste instantie ontwikkeld om melk te onderzoeken op aanwezigheid van residuen die de kaas- en yoghurtbereiding storen. In dat opzicht zijn ze zeer betrouwbaar, omdat de kiemgroei-remmende eigenschap juist de ongewenste factor is. De aanwezigheid van residuen is niet alleen ongewenst om technologische redenen, maar ook vanuit het standpunt van de volksgezondheid, en niet alleen in melk maar ook in vlees. Oorspronkelijk werd aangenomen dat antibioticaresiduen bij slachtdieren het langst aantoonbaar bleven in het nierweefsel en daarom werden kiemgroei-remmende stoffen daarin opgespoord. Zodra de niertest negatief was, werd het dier beschouwd als vrij van residuen (Nouws *et al.*, 1988). Nu er voor nagenoeg alle farmacologisch actieve substanties MRL waarden (Europa) of *safe levels* (VS) gelden, is het verband tussen het resultaat van een niertest en de residustatus van het dier niet meer zo evident.

Inhibitietesten blijven waardevolle hulpmiddelen bij het onderzoek naar antibioticaresiduen. Zowel bij melk als bij vlees kan men met dit soort testen echter geen scherp onderscheid maken tussen monsters met residugehalten boven of onder de MRL. Microbiologische testen kunnen dus alleen gebruikt worden als screeningstest en dit op voorwaarde dat er (bijna) geen vals-negatieve resultaten voorkomen, dit wil zeggen dat alle monsters met een residugehalte gelijk aan of groter dan de MRL gedetecteerd worden. Geen enkele van de inhibitietesten die in verschillende landen gebruikt worden voor slachtdieren is ideaal in dit opzicht; de meeste detecteren slechts een beperkt aantal antibio-

tica tot op MRL niveau (Korsrud *et al.*, 1998). Indien antibiotica opgespoord worden waarvoor geen enkele inhibitietest voldoende gevoelig is, moet gebruik gemaakt worden van andere screeningstesten.

Niertesten

In België wordt zowel bij noodslachtingen als bij de uitvoering van het residuplan de Nieuwe Belgische Niertest (NBNT) gebruikt. Volgens de Belgische wetgeving wordt een slachtdier afgekeurd bij een positief resultaat van de NBNT. Daarom wordt in detail ingegaan op de uitvoering en aflezing van deze test. De NBNT moet uitgevoerd worden op een verse nier die kort na het slachten uit de karkas genomen wordt en dezelfde dag nog onderzocht wordt. De pH van de voedingsbodem is neutraal (pH7,2), trimethoprim is toegevoegd om de detectie van sulfonamiden mogelijk te maken en *Bacillus subtilis* wordt als testkiem gebruikt. Op de vooraf beënte voedingsbodem worden twee papierschijfjes doordrenkt met niervocht en één stukje niercortex onderzocht. De plaat wordt daarna overnacht geïncubeerd en gecontroleerd op remming van de groei rond het testmateriaal. Indien remming wordt vastgesteld, worden de diameter van de remzones rond de schijfjes (schijfjes inbegrepen) en de diameter van de remrand rond het stukje cortex (weefsel niet inbegrepen) gemeten. Het resultaat is positief als rond de papierschijfjes een remzone voorkomt waarvan de gemiddelde diameter minstens gelijk is aan 20mm of als rond de cortex een remrand optreedt die minstens gelijk is aan 2mm. Na het inzetten van de niertest wordt de nier ingevroren (Anoniem, 1995; Dierick *et al.*, 1994).

Een positieve niertest is alleen een bewijs voor de aanwezigheid van een stof met kiemgroei-remmende eigenschappen. Hij geeft geen indicatie omtrent de aanwezigheid van een specifiek antibioticum, noch omtrent de concentratie ervan. Met deze test zijn de detectielimieten van sommige antibiotica relatief hoog en van andere laag. Dieren behandeld met de eerste groep kunnen negatief reageren wanneer de residuconcentratie in de weefsels nog hoger is dan de MRL, terwijl dieren behandeld met de tweede groep soms nog positief reageren wanneer de concentratie in de weefsels reeds lager is dan de MRL. Een slachtdier dat parenteraal behandeld werd met aminoglycosiden (bijvoorbeeld met streptomycine) kan nog lang nadat de weefsels vrij zijn een positieve niertest vertonen, omdat deze antibiotica zich opstapelen in het nierweefsel (Nouws en Verdijk, 1991). Ook dieren die behandeld werden met sommige tetracyclinen kunnen nog positief reageren wanneer ze eigenlijk al voldoen aan de MRL regelgeving. Recent werd dit aangetoond bij een experiment met varkens behandeld met doxycycline. Op het einde van de voorgeschieden wachtermijn waren de resultaten van 2 op 4 onderzochte dieren positief, telkens bij slechts één van de 2 nieren. De concentratie van doxycycline in de nier en in het spierweefsel was op dat ogenblik reeds beduidend lager dan de MRL (Croubels *et al.*, 1999). Deze zeer beperkte studie illustreert dat sancties niet rechtstreeks kunnen gekoppeld worden aan resultaten van inhibitietesten.

Het R-statuuut wordt dus niet toegekend op basis van de resultaten van de NBNT. Bij een noodslachting daarentegen worden dieren wel afgekeurd wanneer de NBNT positief is. De afkeuring is een maatregel die door de keurende dierenarts wordt genomen om de volksgezondheid te beschermen en niet om de veehouder te sanctioneren. Dure bijkomende analyses zijn bij in nood geslachte dieren immers niet verantwoord wegens hun geringe handelswaarde en de NBNT geeft toch enigszins een indicatie omtrent de residustatus.

Inhibitietesten voor spierweefsel

Praktisch gezien is het uitvoeren van de Nieuwe Belgische Niertest op gekweekte diersoorten andere dan grootvee, zoals gevogelte, konijnen en vissen, onmogelijk. Voor deze diersoorten schrijft de Belgische wetgeving (nog) geen test voor op aanwezigheid van kiemgroeiremmende stoffen. Nochtans moet ook vlees van deze diersoorten voldoen aan de MRL wetgeving. Kiemgroeiremmende stoffen worden bij deze diersoorten meestal in het spierweefsel opgespoord. Uiteraard kan ook spierweefsel van grote slachtdieren op die manier worden onderzocht: vele Europese landen gebruiken de vier-platentest (zie verder) op spierweefsel bij de toepassing van hun residuplan. Vlees dat zich reeds in de handel bevindt, en waarbij de nier uiteraard niet meer aanwezig is, kan alleen gescreend worden met optimaal gevoelige methoden. De MRL's van veel antibiotica zijn immers lager in spierweefsel dan in nieren.

Om zo laag mogelijke detectielimieten van de opgespoorde antibiotica te bekomen, wordt dikwijls een combinatie van platen gebruikt met verschillende voedingsbodems en geïnoculeerd met verschillende bacteriesoorten. De voedingsbodem wordt hierbij zeer dun gegoten. Bij gebruik van een dunne laag voedingsbodem diffundeert het antibioticum verder en worden er grotere remzones bekomen.

Een voorbeeld van een dergelijk systeem is de Vier-Platentest (*Four Plate Test, FPT*), (Heitzman, 1994). Oorspronkelijk was de FPT bedoeld om vijf groepen antibiotica op te sporen. Stukjes bevroren spierweefsel worden rechtstreeks op de voedingsbodems gelegd. Drie platen bevatten media ingeënt met *B. subtilis*, doch de zuurtegraden zijn verschillend. De vierde plaat is beënt met *Micrococcus luteus*. Recent hebben wij aangetoond dat het met dit systeem onmogelijk is om sulfonamiden, sommige macroliden, lincosamiden en aminoglycosiden op te sporen tot op MRL niveau. De detectielimieten van deze antibiotica zijn te hoog, of het is onmogelijk om ze op te sporen in bevroren spierweefsel omwille van het matrixeffect: de invloed die het stukje spierweefsel uitoefent op de groei van de testkiem, waardoor hij minder gevoelig is voor het antibioticum. Tetracyclinen kunnen met de FPT aangetoond worden, beta-lactam antibiotica vermoedelijk ook (Okerman *et al.*, 1998a; Okerman *et al.*, 1998b). Om een aantal quinolonen tot op MRL niveau op te sporen dient een plaat geïnoculeerd met een gevoelige *Escherichia coli* stam aan het systeem toegevoegd te worden (Ellerbroek *et al.*, 1997).

Ook vissen worden gescreend op aanwezigheid van antibioticaresiduen, doch het gebruik van *B. subtilis* als testkiem wordt afgeraden omdat spierweefsel van sommige vissoorten aanleiding geeft tot vals-positieve reacties (Valset *et al.*, 1989, Ellerbroek *et al.*, 1997). Tetracyclinen worden bij vissen gedetecteerd in bevroren spierweefsel met behulp van *Bacillus cereus*, quinolonen met *E. coli*, en beta-lactam antibiotica kunnen aangetoond worden met *M. luteus*.

Validatie en eerstelijns-, tweedelijns- en derde-lijnscontrole van inhibitietesten

Bij de NBNT worden schijfjes doordrenkt met niervocht en een stukje niercortex onderzocht, hogerbeschreven methoden voor vis en spierweefsel onderzoeken intact bevroren spierweefsel. In al deze gevallen is het niet mogelijk om belaste monsters te onderzoeken, althans niet op de wijze die voorgeschreven wordt voor immunologische en chromatografische methoden. Detectielimieten worden meestal alleen bepaald met waterige oplossingen van antibiotica. Deze detectielimieten worden het best uitgedrukt in absolute waarde (nanogram: ng). Ze kunnen omgerekend worden per gram weefsel, doch er kunnen grote verschillen bestaan tussen de theoretische en de werkelijke detectielimieten. Deze verschillen kunnen te wijten zijn aan een matrixeffect (zie hoger). Het is ook lang niet zeker of bij natuurlijk besmette monsters, dit wil zeggen afkomstig van behandelde dieren, elk analyt volledig vrijkomt en in de bodem diffundeert.

Eerstelijnscontroles worden met elke reeks te analyseren monsters uitgevoerd: de remzone veroorzaakt door een welbepaalde concentratie van een welbepaald antibioticum moet min of meer constant zijn. Voor een tweedelijnscontrole worden andere concentraties en/of andere antibiotica onderzocht. Een ringtest, waaraan meerdere laboratoria deelnemen, kan bestaan uit onderzoek van weefsels van één of meer behandelde dieren, waarbij de concentratie van de analyten door middel van chromatografische methoden vooraf werd bepaald.

GROEPSPECIFIEKE METHODEN: IMMUNOLOGISCHE TESTEN EN RECEPTORTESTEN

De immunologische testen (enzyme immuno assays, EIA en radio immuno assays, RIA) en de receptortesten worden samen besproken omdat de reacties gelijkwaardig verlopen. In beide gevallen wordt een binding aangetoond tussen het analyt (in dit geval, één antibioticum of meerdere antibiotica behorende tot dezelfde groep) en een stof die specifiek is voor dit analyt: een antistof of een receptor.

Het meest voorkomende principe van de immunologische residutesten is als volgt: een drager wordt gecoat met de antistof; deze drager wordt in contact gebracht met een extract van het onderzoeksobject en tegelijk met een gemerkt antigeen (de tracer). Wanneer het extract residuvrij is, zal een maximale hoeveelheid tracer binden op de gecoate drager. Bij aanwezigheid van het analyt echter wordt een deel van de beschikbare plaatsen ingenomen door niet-gemerkte moleculen.

De tracer is gemerkt met een radioactieve isotoop (RIA), of met een enzyme (EIA). Bij EIA wordt de reactie achteraf zichtbaar gemaakt door een substraat toe te voegen en de kleurreactie wordt gemeten. In beide gevallen gaat het om competitieve testen (Martlbauer *et al.*, 1994).

Receptortesten zijn eveneens competitieve testen, doch in plaats van een antigen-antistof reactie wordt hier gebruik gemaakt van de reactie antibacterieel werkzame stof - bacteriële receptor. Receptoren zijn stoffen die geïsoleerd worden uit gevoelige bacteriën en die de antibiotica binden. Meestal zijn ze specifiek voor één familie antibiotica vermits alle leden hetzelfde werkingsmechanisme bezitten. De meest bekende receptortesten, waarbij de tracer gemerkt is met ^{14}C of ^3H , zijn geschikt om beta-lactam antibiotica, sulfonamiden, aminoglycosiden, macroliden en chloramphenicol op te sporen (Korsrud *et al.*, 1992).

Immunologische testen en receptortesten worden gebruikt als screening voor antibiotica waarvoor de inhibitietesten niet of onvoldoende gevoelig zijn, bijvoorbeeld chloramphenicol, of op monsters die positief reageerden bij de microbiologische screening, om na te gaan welke antibioticumfamilie aanwezig is. Testen die niet al te specifiek zijn, die dus meerdere of alle antibiotica behorende tot één familie opsporen, zijn het meest interessant in dit opzicht.

Zelden kan men zich baseren op de resultaten van een EIA of een receptortest om te besluiten of een voedingsmiddel residuen van de opgespoorde stoffen bevat in concentraties hoger dan de MRL (Martlbauer *et al.*, 1994). Technische gegevens, vermeld in de bijsluiters van de LacTek BL kit, een commerciële kit gebruikt om beta-lactam antibiotica op te sporen, illustreren dit voldoende. De test werd uitgevoerd zoals voorgeschreven op melkmonsters belast met verschillende concentraties penicilline. Het resultaat van de analyse was positief voor respectievelijk 13%, 80%, 90% en 97% van melkmonsters die 2, 3, 4 of 5 ppb penicilline bevatten. De MRL bedraagt 5 ppb; een aantal monsters die minder penicilline bevatten reageren positief, terwijl er toch nog 3% monsters met 5 ppb penicilline G door de mazen van het net glijpen. Geen enkele kwalitatieve EIA of receptortest is in staat om een zeer scherp onderscheid te maken tussen monsters met gehalten boven en onder de MRL: rond de detectielimiet is er een zone waarbij het resultaat zowel positief als negatief kan zijn.

Veel immunologische testen, zoals de bovenvermelde LacTek test, geven alleen een kwalitatief resultaat (aanwezig - afwezig). Andere EIA's die gebruik maken van microtiterplaten kunnen kwantitatief afgelezen worden. Bij elke reeks analyses wordt een standaardreeks mee geanalyseerd; een ijklijn wordt opgesteld en de concentraties worden berekend. De fout op zulke kwantitatieve bepalingen is bij routine-analysen nogal groot: binnen dezelfde reeks analyses kan de relatieve standaarddeviatie, bepaald door herhaalde analyse van hetzelfde melkmonster, meer dan 10% bedragen. Bovendien heeft een kwantitatieve bepaling bij testen die meerdere antibiotica van dezelfde familie aantonen geen zin, omdat de kruisreagerende stoffen meestal

minder efficiënt worden aangetoond (Martlbauer *et al.*, 1994).

Algemeen kan dus gesteld worden dat EIA, RIA en receptortesten zeer geschikt zijn voor screening, zelden voor bevestiging en kwantificatie.

Validatie van EIA

Er zijn (voorlopig) geen strikte voorschriften over de wijze waarop immunologische testen gevalideerd moeten worden, in tegenstelling tot de chromatografische methoden (zie verder). Wij valideren immunologische testen als volgt. De eindstap van de door ons gebruikte EIA is een kleurreactie. Deze geeft aanleiding tot een optische densiteit (OD) die gemeten wordt door middel van een microtiterplaatreader. OD waarden bekomen door testen van negatieve monsters moeten voldoende verschillend zijn van deze bekomen door testen van monsters waaraan een welbepaalde concentratie van het analyt is toegevoegd. In geval van toegelaten producten komt deze concentratie overeen met de MRL. Door statistische verwerking van een aantal dergelijke resultaten kan een *cut-off* waarde bepaald worden waarbij het aantal vals-negatieve resultaten zo laag mogelijk is, indien mogelijk lager dan 0,5%. Dit werd uitgewerkt in een vroeger artikel (Okerman *et al.*, 1997). Elke reeks routine-analysen gaat vergezeld van een negatief monster en van een monster gespike met een hoeveelheid analyt die overeenkomt met de MRL. Aan de hand van de gegevens bekomen bij de validatie worden dan voorwaarden gesteld waaraan de resultaten van het positief en het negatief monster moeten voldoen.

CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

De moderne methoden voor het opsporen van residuen werden onlangs uitgebreid besproken in dit tijdschrift. Details betreffende *dunnelaagchromatografie* (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC), gaschromatografie (GC), vloeistofchromatografie (Liquid Chromatography, LC) en dezelfde methoden gekoppeld aan massa-spectrometrie (MS) zijn te vinden in dit overzicht (De Brabander *et al.*, 1998).

In vergelijking met de hogerbesproken microbiologische en immunologische testen en receptortesten vereisen de chromatografische methoden in de meeste gevallen een ingewikkelde extractie en een opzuivering van het monster. De extractiestap bestaat uit het verkleinen van het monster, dat dan grondig gemengd wordt met een vloeistof, waarin het analyt of de analyten volledig oplost of oplossen. Dit oorspronkelijk extract wordt dan verder opgezuiverd (*clean-up*) via allerlei technieken om zo veel mogelijk onzuiverheden, die de detectie storen, te verwijderen.

Dunnelaagchromatografie is de oudste methode en vindt nu vooral nog toepassing als screeningtest. Een kwalitatieve identificatie van een analyt is mogelijk, maar een precieze kwantitatieve aflezing niet. Wanneer een monster moet worden onderzocht op aanwezigheid van sulfonamiden in het algemeen, dan is HPTLC een

zeer geschikte screeningmethode (Heitzman, 1994). Ook quinolones kunnen door middel van HPTLC als groep opgespoord worden (Juhel-Gaugain, 1997).

Gaschromatografische en vloeistofchromatografische technieken geven veel preciezere resultaten. Een analyserapport van een positief monster vermeldt zowel de chemische identiteit en de concentratie van een residu. Dit resultaat wordt bijna altijd bekomen door middel van een van deze twee technieken.

In de eerste plaats moet de chromatografische techniek zekerheid verschaffen omtrent de identiteit van het gevonden product. In vergelijking met vroegere methoden, waarbij de detectie gebaseerd was op een of andere fysische of chemische eigenschap van het analyt, geven de methoden die gekoppeld zijn aan een massaspectrometer rechtstreekse informatie omtrent zeer specifieke, chemische eigenschappen. De aanwezigheid van het analyt in een chromatogram wordt weergegeven door een piek met een bepaalde retentietijd. Bij de koppeling van zo'n chromatografische techniek met een massaspectrometrische detectie wordt deze retentietijd gekoppeld aan een massaspectrum specifiek voor het analyt. Gaat men hierbij nog een stapje verder en worden de typische ionen, eigen aan het analyt, gefragmenteerd om aldus een dochter- of fragmentatiespectrum te bekomen, dan is dit een éénduidige identificatie of een vingerafdruk van de molecule die bijna elke kans op een verkeerde interpretatie uitsluit. Het aantal ionen en de verhouding van de intensiteiten van de verschillende ionen maken deel uit van de criteria voorgelegd in de Europese Richtlijn 93/256 die op dit moment herzien wordt. Deze criteria moeten een verantwoorde identificatie en kwantificatie verzekeren. De kans op een foutieve interpretatie wordt met GC-MS en LC-MS dus praktisch onbestaande.

Resultaten bekomen door middel van chromatografische technieken kunnen ook kwantitatief afgelezen worden. Het oppervlak onder de piek is een maat voor de concentratie of de hoeveelheid. Meestal is de respons van het meetsignaal (het piekoppervlak) recht evenredig met de concentratie of de hoeveelheid analyt. Dit wil zeggen dat een ijklijn kan opgesteld worden met verschillende concentraties of hoeveelheden analyt, al dan niet in matrix: piekoppervlak in de y-as en concentratie of hoeveelheid in de x-as, $y = ax + b$, a is de helling, b de intercept (Fig 1). Voor een onbekend monster zal het oppervlak onder de piek worden ingevoerd in de vergelijking van die ijklijn om daaruit de bijhorende concentratie of hoeveelheid te bepalen. Op die manier kan de aanwezigheid van een analyt worden gekwantificeerd.

Chromatografische methoden, zoals GC-MS en LC-MS, vereisen dure apparatuur en daarenboven is de monstervoorbereiding arbeidsintensief in vergelijking met screeningmethoden als (micro)biologische inhibitietesten of immunologische methoden. Bij de voorbereidende stappen zijn vaak ook dure reagentia nodig. Onderzoek van een slachtdier op aanwezigheid van residuen van een groot aantal geneesmiddelen door middel van chromatografische methoden zou meer kosten dan het dier waard is. Daarom vormen deze methoden de eindstap in een strategie (zie verder).

Validatie van chromatografische methoden

De validatieprincipes, die in de inleiding werden besproken, zijn in de eerste plaats geldig voor de chromatografische methoden. Belangrijke parameters zijn de *recovery* (de hoeveelheid analyt die teruggevonden wordt nadat het monster alle extractie- en opzuiveringsstappen heeft doorlopen), de detectie- en kwantificatielimieten die verschillend kunnen zijn naargelang de matrix waarin het residu wordt opgespoord en de fout op een kwantitatieve bepaling. De detectielimiet of aantoonbaarheidsgrens (*limit of detection, LOD*) is het laagst gemeten gehalte waaruit de aanwezigheid van een analyt met een redelijke, statistische zekerheid kan worden afgeleid. De kwantificatielimiet of bepaalbaarheidsgrens (*limit of quantification, LOQ*) is het laagst gemeten gehalte van een analyt in het analysemonster dat met redelijke, statistische zekerheid kwantitatief kan worden bepaald (Su, 1998). Hierbij dient opgemerkt te worden dat de relatieve fout zeer groot kan zijn bij zeer lage detectielimieten (Horwitz, 1998).

Net zoals bij de screeningtesten gaan de analyses steeds vergezeld van eerstelijnscontroles. Dit garandeert een continue controle op alle stappen van de procedure, extractie, opzuivering en detectie.

ANALYTISCHE "STRATEGIEËN" OM ANTIBIOTICARESIDUËN OP TE SPOREN

Grote aantallen dieren kunnen slechts gecontroleerd worden als er betrouwbare screeningtesten beschikbaar zijn, zodat de negatief reagerende monsters (meestal de grote meerderheid) niet meer verder moeten worden onderzocht. Een microbiologische screening (opsporen van kiemgroeiremmende stoffen) is in de meeste gevallen een multi-residu test, doch wordt nog te vaak beschouwd als een zeer algemene test die in staat is om alle antibiotica te detecteren tot op MRL niveau. Dit is duidelijk niet het geval (zie hoger). Het heeft dus geen zin om alle KGRS positieve slachtdieren verder te onderzoeken op alle mogelijke antibiotica. Een dergelijke strategie is zinloos en geeft aanleiding tot eindeloos durende procedures. Geen enkel laboratorium is bovendien uitgerust om residuen van alle bij landbouwhuisdieren gebruikte antibiotica te kwantificeren.

Het is eenvoudiger en meer aangewezen om zich te beperken tot enkele groepen antibiotica, de gebruikte chromatografische methoden grondig te valideren en vooraf na te gaan welke de meest geschikte screening is voor elk van deze groepen: een microbiologische test indien mogelijk of een immunologische test of een receptortest, wanneer die een voldoende aantal stoffen van de opgespoorde groep detecteert, of een TLC methode. Soms, maar lang niet altijd, is het nuttig om tussen de microbiologische screening en de chemische bevestiging een tweede, zogenaamde post-screening, dus een groepspecifieke analyse uit te voeren. Tabel 1 geeft een aantal methoden die voor de verschillende antibioticumfamilies geschikt zijn.

Immunologische en chemische analyses worden om praktische redenen altijd gegroepeerd: EIA-kits moe-

Tabel 1. Voorbeelden van methoden geschikt voor de detectie van de belangrijkste antibiotica bij slachtdieren

Antibioticum familie	Geschikte screeningtesten ⁵	Mogelijke confirmatie-technieken
Beta-lactam antibiotica	Microbiologisch EIA	HPLC LC-MS
Tetracyclines	Receptortest Microbiologisch EIA RIA	HPLC LC-MS
Sulfonamiden	Receptortest HPTLC EIA	HPLC LC-MS
Quinolonen	Microbiologisch HPTLC	LC-MS HPLC
Macroliden	Receptortest	LC-MS
Aminoglycosiden	EIA	
Nitrofuranen ⁶	HPTLC	HPLC LC-MS
Chloramphenicol ⁷	EIA RIA HPTLC	HPLC GC GC-MS

⁵ Slechts enkele screeningtesten vertonen voldoende kruisreactiviteit om alle leden van de familie tot op MRL niveau te detecteren.

⁶ Nitrofuranen zijn verboden; de aanwezigheid van residuen geeft aanleiding tot het H-statuuut.

⁷ Chloramphenicol is verboden; de aanwezigheid van residuen geeft aanleiding tot het H-statuuut.

ten immers vlug opgebruikt worden nadat de reagentia opgelost zijn en voor elke groep analyten moeten de chromatografische condities (eluens, kolom,...) en detectieparameters aangepast worden.

Het is duidelijk dat er heel wat tijd kan voorbijgaan voor een definitief positief resultaat gerapporteerd wordt wanneer een positief KGRS monster verder moet worden onderzocht. Ter verduidelijking: meestal reageert meer dan 95% van de monsters negatief voor de eerste microbiologische screening. Er blijven dan slechts enkele monsters over die gegroepeerd worden voor een eventuele immunologische analyse, als die tussenstap nodig geacht wordt. Om een EIA-test rendabel te maken moeten meerdere monsters onderzocht worden; hoe minder KGRS positieve monsters gevonden worden, hoe langer het duurt tot er voldoende verzameld zijn. Daarna worden de monsters opnieuw gespaard, tot er per groep analyten zoveel monsters zijn dat het de moeite loont om een bepaalde chromatografische procedure op te starten.

Voor de betrokken inspectiediensten is het anderszins onaanvaardbaar dat het bewijs dat iemand die op een bepaald ogenblik in overtreding is slechts maanden nadien kan geleverd worden en dat de maatregelen pas kunnen genomen worden als er misschien al lang geen probleem meer is. Zo komt de hele controle op naleving van de wachttijden en op de MRL regelgeving in het gedrang. Daarom worden tussen meerdere Belgische laboratoria die antibioticaresiduen opsporen sinds 1999 afspraken gemaakt, zodat de activiteiten beter gecoördineerd verlopen. Zeer snelle resultaten

kunnen echter voorlopig niet verwacht worden, doch de gebruikte methoden garanderen wel dat ze uiterst betrouwbaar zijn.

LITERATUUR

- Anoniem (1995). Ministerieel besluit van 19 juni 1995 tot wijziging van het ministerieel besluit van 18 december 1973 tot bepaling van de laboratoriumtechnieken voor het opsporen van residuen van stoffen met een kiemgroeiremmende werking. Belgisch Staatsblad, 28.07.95, 20386-20370.
- Anoniem (1996). Koninklijk Besluit van 29 januari 1996 betreffende de erkenning van de laboratoria die voedingsmiddelen en andere producten ontleiden. I.V.K. / Warenwetgeving (4) 4.3.1.
- Anoniem (1997a). Koninklijk Besluit betreffende maatregelen inzake de verhandeling van landbouwdieren, ten aanzien van bepaalde stoffen of residu's daarvan met farmacologische werking. Belgisch Staatsblad van 07.10.97, 26283-26285.
- Anoniem (1997b). Ministerieel besluit houdende uitvoering van het Koninklijk Besluit betreffende maatregelen inzake de verhandeling van landbouwhuisdieren, ten aanzien van bepaalde stoffen of residu's daarvan met farmacologische werking. Belgisch Staatsblad van 07.10.97, 26285-26286.
- Anoniem (1997c). Warenwetgeving - Deel 4. Veterinaire keuring. 2. Vlees van slachtdieren. 2.2. Keuring van vlees (KB van 11/10/97).

- Anoniem (1998). Beschikking van de commissie van 23 februari 1998 houdende vaststelling van uitvoeringsbepalingen met betrekking tot de officiële bemonstering in het kader van de opsporing van bepaalde stoffen en residuen daarvan in levende dieren en dierlijke producten. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen van 5.3.98, L65/31-34.
- Croubels S., Baert K., Okerman L., Robrecht V., Arden L., De Backer P. (1999). The detection of residues of doxycycline in porcine kidney and muscle tissue: correlation between results of microbiological screening and confirmation tests. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 68, 22-26.
- De Brabander H.F., De Wasch K., Okerman L., Batjoens P. (1998). Moderne analysemethoden voor additieven, contaminanten en residuen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 67, 96-105.
- Ellerbroek L., Schwarz C., Hildebrandt G., Weise E., Bernoth E.-M., Pluta H.-J., Arndt G. (1997) Zur mikrobiologischen Erfassung von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe beim Fisch. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 48, 1-24.
- Heitzman (1994). *Veterinary Drug Residues - Residues in Food Producing Animals and their Products: Reference Materials and Methods*. Report Eur 15127-EN, Second edition. Blackwell Scientific Publication, London, 1994
- Horwitz W. (1998). Uncertainty - A chemist's view. *Journal of AOAC International* 81, 785-794.
- Juhel-Gaugain M. (1997). Screening of quinolone residues in pork muscle by planar chromatography. In: N. Haagsma en A. Ruiter (Eds), *Residues of veterinary drugs in food - proceedings of the EuroResidue III conference*. pp. 578-581.
- Koenen-Dierick K., Okerman L., De Zutter L., De Groodt J.M., Van Hoof J., Srebrnik S. (1995). A one-plate test for antibiotic residue testing in kidney and meat: an alternative to the EEC four-plate method? *Food Additives and Contaminants* 12, 77-82.
- Korsrud G.O., Salisbury C.D.C., Fesser A.C.E., MacNeil J.D. (1992). Evaluation and testing of Charm Test II Receptor Assays for the detection of antimicrobial residues in meat. In: V.K. Agarwal (ed.), *Analysis of Antibiotic Drug Residues in Food Products of Animal Origin*. Plenum Press, New York.
- Korsrud G.O., Boison J.F., Nouws J.F.M., MacNeil J.D. (1998). Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial drug residues in slaughtered animals. *Journal of AOAC International* 81, 21-24.
- Martlbauer E., Usleber E., Schneider E., Dietrich R. (1994). Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. *Analyst* 119, 2543-2548.
- Nouws J.F.M., Verdijk Th.M. (1991). Hoe is de incidentie van antibioticaresiduen bij slachtdieren te minimaliseren? *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 116, 833-840.
- Nouws J.F.M., Broex N.J.G., Den Hartog J.M.P., Driessens F. (1988). The New Dutch Kidney Test. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 39, 133-156.
- Oka H., Nakazawa H., Harada K.-I., MacNeil J.D. (1995). Chemical Analysis for Antibiotics used in Agriculture. AOAC International, Arlington, VA.
- Okerman L., Van Hende J., Van Hoof J., De Brabander H. (1997). Interpretatie van resultaten van screeningtesten toegepast bij het opsporen van residuen in eetwaren van dierlijke oorsprong. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 66, 68-74.
- Okerman L., Van Hoof J., Debeuckelaere W. (1998). Evaluation of the Four-Plate Test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *Journal of AOAC International* 81, 51-56.
- Okerman L., De Wasch K., Van Hoof J. (1998). Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix. *Analyst* 123, 2361-2365.
- Su G.C.C. (1998). A comparison of Statistical and Empirical Detection Limits. *Journal of AOAC International* 81, 105-110.
- Valset G., Losnegard N., Yndestad M. (1989). Routine Microbiological Method for the detection of antibiotics and chemotherapeutics in fish. Werkvoorschrift afkomstig van het Directorate of Fisheries, Department of Quality Control, Bergen, Noorwegen en van het Norwegian College of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene, Oslo, Noorwegen.