

Detectie van antibiotica in gemedicineerd drinkwater: validatie en praktische toepassing van een aangepaste microbiologische inhibitietest

Detection of antibiotics in medicated water supplies: validation and practical application of a modified microbiological growth inhibition test

C. De Lathouwers, L. Okerman, L. De Zutter

Vakgroep Veterinaire Volksgezondheid
Faculteit Diergeneeskunde, Ugent,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

SAMENVATTING

Antibiotica en chemotherapeutica worden vaak toegediend aan voedselproducerende dieren via het drinkwater. Dit is niet altijd aangewezen of toegelaten. De controle op de aanwezigheid van deze geneesmiddelen is in vele gevallen wenselijk. Microbiologische inhibitietesten zijn eenvoudige en goedkope methoden om antibacteriële middelen te detecteren in meerdere matrixen. Daarom werd een dergelijke methode op punt gesteld voor water, met dezelfde voedingsbodem als de in de Belgische wetgeving voorgeschreven niertest. Vooreerst werden de detectielimieten bepaald van de meeste antibiotica. Deze waren meestal veel lager dan de therapeutische concentraties, doch voor sulfadimidine, lincomycine en spectinomycine was het verschil relatief klein. Zinkbacitracine werd niet gedetecteerd bij de concentratie ter preventie van mucoïde enteropathie bij konijnen.

In een varkensbedrijf werd aangetoond dat de concentraties van amoxicilline en doxycycline in gemedicineerd water opgenomen aan de drinknippels, sterk verschillend waren naargelang het aftappunt, ondanks het feit dat de doseerapparaten op dezelfde manier waren ingesteld. Dit toont aan dat niet alle dieren op dezelfde manier behandeld werden, en dat ze hoogstwaarschijnlijk niet allemaal dezelfde dosis opnamen. Zowel amoxicilline als doxycycline was 3 uur na de stopzetting van de behandeling niet meer aantoonbaar. Het aanzuren van drinkwater met organische zuren gaf eveneens kleine remzones. De kiemgroeiremming bij het onderzoeken van drinkwater is dus niet altijd te wijten aan de aanwezigheid van een antibioticum. Bij de interpretatie van deze methode moet met de mogelijkheid van valspositieve resultaten rekening gehouden worden. Deze methode is niet kwantitatief maar ze is toch zeer nuttig voor de controle op de drinkwatermedicatie in de veehouderij.

ABSTRACT

Antibiotics and other antibacterials are often applied to the drinking water of food animals. This type of medication is not always justified and allowed. Monitoring of drinking water for the presence of antibiotics may be indicated in many cases. Microbiological growth inhibition tests are cheap and simple methods intended to detect antibacterial activity in different matrixes. Therefore, a method intended for the detection of antibiotics in kidneys was modified and optimized for analyzing water.

The detection limits of most antibiotics used in animal husbandry were much lower than the therapeutic concentrations applied in drinking water. However, with sulphadimidine, lincomycin and spectinomycin, the range was relatively narrow. Zinc bacitracin was not detected at the level used in the prevention of mucoid enteropathy of rabbits.

Tests in a pig farm revealed high variability in the levels of amoxicillin and doxycycline in samples taken from different drinking nipples. This finding shows that not all animals were treated in the same way, and that they probably did not receive identical doses. Neither amoxicillin, nor doxycycline was detectable three hours after treatment.

Acidification of drinking water with organic acids produced small inhibition zones. Bacterial growth inhibition in drinking water is not always due to the presence of an antibiotic, because false positive results may occur. Although the method investigated is not quantitative, it is concluded that it may be useful in the monitoring of drinking water medication in animal farms.

INLEIDING

Antibiotica worden vaak toegediend aan groepen dieren via het drinkwater. Dit kan verantwoord en toegelaten zijn maar de middelen moeten wel voorgeschreven of verschaft worden door een dierenarts en alles moet gedocumenteerd en genoteerd worden in het bedrijf. Kwaliteitslabels leggen soms bijkomende beperkingen op in verband met het toedienen van geneesmiddelen aan voedselproducerende dieren, bijvoorbeeld een langere wachttijd dan door de fabrikant voorgeschreven.

Het opleggen van beperkingen impliceert dat er ook moet gecontroleerd worden of alle voorschriften nageleefd worden. Slachtdieren worden onderzocht op de aanwezigheid van residuen, maar dit geeft alleen informatie over het gebruik van antibiotica op het einde van de mestperiode, en dan nog enkel voor producten die geresorbeerd worden. Indien men wil controleren op het gebruik van antibiotica tijdens de hele mestperiode, dan moet men het drinkwater en/of het voeder analyseren. Sommige kwaliteitslabels die extra voorwaarden voor de veehouders opleggen, passen dit nu reeds toe. Een eenvoudige test is dus nodig om na te gaan of er antibiotica aanwezig zijn in het drinkwater.

Het is ook nuttig om na te gaan of er na een behandeling nog microbiologisch actieve residuen in het drinkwater aanwezig blijven. In veel gevallen worden geneesmiddelen rechtstreeks opgelost in een drinkwaterreservoir. Na het stopzetten van de behandeling moeten de leidingen en het reservoir goed gespoeld worden met zuiver water anders blijven er resten aanwezig in het systeem (Croubels *et al.* 2001). Zelfs die lage concentraties kunnen een selectie van resistente bacteriën in de hand werken (Catry *et al.* 2003; Williams en Sefton, 2007). Bovendien kan de aanwezigheid van dergelijke resten achteraf ongewenste residuen veroorzaken (Kennedy *et al.* 2000; McEvoy *et al.* 2000).

Antibiotica en chemotherapeutica remmen de groei van bacteriën. De microbiologische screeningstesten zijn gebaseerd op deze eigenschap. De voordelen van deze inhibitietesten zijn: de lage kostprijs, de eenvoud van de methode en het breed spectrumkarakter ervan (Okerman *et al.*, 1994).

De zogenaamde Nieuwe Belgische Niertest is een dergelijke inhibitietest, die gebruik maakt van een vaste voedingsbodem met neutrale pH en een *Bacillus subtilis* stam als testkiem (MB van 19/06/1995; Koenen-Dierick *et al.*, 1995). Antibioticaresiduen in de niercortex en in het niervocht worden aangetoond door het optreden van een remzone. Dit is een zone zonder zichtbare kolonies van de testkiem, rond het te onderzoeken materiaal. Een groot aantal antibiotica veroorzaakt remming op deze bodem, alhoewel de detectielimieten meestal te hoog zijn ten opzichte van de MRL's voorgeschreven door de Europese wetgeving (verordening (EG) nr. 2377/90). Voor het opsporen van residuen in vlees is deze methode dus eigenlijk niet geschikt, maar omdat de therapeutische concentraties van antibiotica in drinkwater uiteraard veel hoger zijn,

komt ze hiervoor wel in aanmerking. Een vergelijking van de detectielimieten met de gebruikelijke concentraties van geregistreerde antibiotica in water kan hieromtrent duidelijkheid verschaffen.

Om de bruikbaarheid van de methode voor de praktijk na te gaan, werden in eerste instantie de detectielimieten bepaald van antimicrobiële middelen, die via het drinkwater worden toegediend: één beta-lactam, twee tetracyclines, één sulfonamide, één fluoroquinolone, twee macroliden en verder nog lincomycine, spectinomycine en zinkbacitracine. Vervolgens werd de robuustheid van de methode onderzocht, door na te gaan in welke mate de detectielimieten in stadswater en in zeer hard en basisch water afwijken van de detectielimieten in gedistilleerd water. Tenslotte werden monsters geanalyseerd afkomstig uit een varkensbedrijf tijdens behandelingen met amoxicilline, doxycycline of organische zuren om de bruikbaarheid van de methode in de praktijk te testen.

MATERIAAL EN METHODEN

Methode

De samenstelling van de voedingsbodem was als volgt: 25 g 'standard II nutrient agar' (Merck, Darmstadt, Duitsland) en 4 g dextrose (Oxoid, Basingstoke, Engeland) werden in 1 liter gedistilleerd water gebracht, samen opgekookt en gesteriliseerd zoals voorgeschreven. De pH werd na het steriliseren, indien nodig, aangepast tot 7,0 +/- 0,1. Na het afkoelen tot 48 +/- 1°C werd een trimethoprim (Sigma, St Louis, USA) oplossing toegevoegd (uiteindelijk concentratie in de bodem 1 mg L⁻¹) en daarna een sporensuspensie van *Bacillus subtilis* (Merck) (1 ml L⁻¹). Op een waterpas oppervlak werd 14 +/- 0,5 ml vloeibare bodem in petriplaten met een diameter van 90 mm gegoten, zodat een uniforme dikte van 2 mm bekomen werd. Na het opstijven van de agarlaag werden deze beënte platen onmiddellijk gekoeld tot 4 +/- 1°C en bewaard gedurende maximum 1 week.

Kort voor gebruik werden op steriele wijze 2 tot 4 uithollingen geboord in de agarlaag met behulp van een kurkboor met diameter 10 mm en een spateltje, op ongeveer 1 cm afstand van de rand. Hierin werden 100 µl van de watermonsters gebracht. Na een overnachtingincubatie bij 30°C werden de platen afgelezen: de aanwezigheid van remzones rond de watermonsters en de diameter van de ringen, gemeten vanaf de rand van het putje tot waar weer zichtbare groei optrad, werden genoteerd.

Bij elke reeks analyses werden ook vier standaarden geanalyseerd. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een beënte plaat, waarop vier standardschijfjes werden gelegd die respectievelijk 0,25 µg oxytetracycline, 2,5 µg sulfadimidine, 0,5 µg tylosine en 0,1 µg enrofloxacin bevatten. De schijfjes werden als volgt gemaakt: op papierschijfjes met een diameter van 12,7 mm (Schleiger en Schuell, Dassel, Duitsland) werd 50 µl van een antibioticumoplossing in methanol gedrupt.

Deze schijfjes werden gedroogd en maximum 3 maanden bewaard in een diepvriezer bij -18°C of lager.

Bepaling van de detectielimieten (limits of detection, LOD)

De detectielimieten werden bepaald van 13 antibiotica die in België geregistreerd zijn of via een uitzonderingsregel toegelaten zijn voor het gebruik in het drinkwater van dieren (zinkbacitracine voor konijnen). De volgende standaarden werden bekomen bij Sigma (St. Louis, USA): amoxicilline, doxycycline, oxytetracycline, enrofloxacin, flumequine, erytromycine, tilmicosine, tylosine, lincomycine, sulfadimidine, tiamuline, spectinomycine, zinkbacitracine. Stockoplossingen van 1mg L⁻¹ werden bereid in methanol (tetracycline, sulfadimidine, doxycycline), in gedistilleerd water (amoxicilline, tylosine, lincomycine, tiamuline, spectinomycine), in 0,1N NaOH (flumequine, enrofloxacin) en in ethanol (erytromycine, tilmicosine).

LOD's werden bepaald door de remzones te meten van opeenvolgende tweevoudige verdunningen in gedistilleerd water, die telkens in viervoud getest werden. Vooraf werd een schatting gemaakt van deze concentratie door middel van tienvoudige verdunningen, zodat slechts 3 à 4 tweevoudige verdunningen voldoende waren voor de eigenlijke bepaling. De verdunningen werden geanalyseerd zoals hoger beschreven voor de routinemonsters. De laatste verdunning die in drie van de vier gevallen een remzone veroor-

zaakte van 2 mm of meer werd beschouwd als de detectielimiet.

Robuustheid van de methode

De detectielimieten werden bepaald met als matrix gedistilleerd water. Er werd nagegaan of deze LOD's ook behaald werden in water met afwijkende eigenschappen: zeer hard water (25°C) met pH8.

Praktijkproeven (Tabel 1)

Inrichting van het bedrijf

Waarnemingen werden verricht in een varkensbedrijf waar de afdeling voor biggen ingedeeld was in compartimenten en hokken. De drinkwatervoorziening was gelokaliseerd in een centrale gang met aan weerszijden 5 compartimenten. Elk compartiment was ingedeeld in 6 hokken. In de stal werden twee doseerpompen gebruikt:

- een mechanische Dosatrondoseerpomp (Schipers, Bladel, Nederland). Deze werkt op waterdoorstroming en kan ingesteld worden van 0,2% (1:500) tot 2% (1:50).

- een elektrische MSeasydoser (Schipers). Deze werkt met behulp van een sensor. Het waterverbruik en de instellingen verschijnen op een scherm.

Beide pompen werden door de veehouder steeds ingesteld op 2%.

Tabel 1. Overzicht van staalnamen van de drinkwatermonsters van amoxicilline en doxycycline tijdens en na het stopzetten van de behandeling van de gespeende biggen.

Nr. Compartiment	Hoknr.	Week-behandeling	Staalname		Doseerapparaat
			Datum	Tijdstip	
<i>Behandeling met amoxicilline</i>					
4	1→6	3	16/01/'08	Tijdens behandeling	MS easydoser
4	1→6	3	17/01/'08	3u na behandeling	MS easydoser
10	1→6	3	16/01/'08	7,5u na behandeling	MS easydoser
10	1→6	3	17/01/'08	26u na behandeling	MS easydoser
10	1,3,5	4	23/01/'08	Tijdens behandeling	MS easydoser
10	1→6	4	24/01/'08	2,5u en 4u na behandeling	MS easydoser
3	1→6	3	16/01/'08	Tijdens behandeling	MS easydoser
3	1→6	3	17/01/'08	3u na behandeling	MS easydoser
3	1,3,5	4	23/01/'08	Tijdens behandeling	MS easydoser
3	1,3,5	4	24/01/'08	2,5u en 4u na behandeling	MS easydoser
7	1→6	1	23/01/'08	Tijdens behandeling	Dosatron
8	1,3,5	1	23/01/'08	Tijdens behandeling	Dosatron
8	1,3,5	1	24/01/'08	Tijdens en 0,5u na behandeling	Dosatron
2	1,3,5	1	23/01/'08	Tijdens behandeling	MS easydoser
2	1,3,5	1	24/01/'08	0,5u en 1u na behandeling	MS easydoser
1	1,3,5	1	23/01/'08	Tijdens behandeling	MS easydoser
1	1,3,5	1	24/01/'08	0,5u en 1u na behandeling	MS easydoser
<i>Behandeling met doxycycline</i>					
5	1,3,5	3	23/01/'08	Tijdens behandeling	Dosatron
5	1,3,5	3	24/01/'08	3,5u en 4u na behandeling	Dosatron
4	1,3,5	1	24/01/'08	5u na behandeling	Dosatron

Behandelingen

In eerste instantie werd water onderzocht waar geen antibiotica aan toegevoegd waren. Dit water was aangezuurd met organische zuren en werd toegediend aan biggen, vijf weken na het spenen. Het mengsel Agrocid super Oligo (Perfect Animal, Wissenkerke, Nederland) heeft de volgende samenstelling: melkzuur (E270), mierenzuur (E236), propionzuur (E280), azijnzuur (E260), 1% koper chelaat (E4), 0,03% zink chelaat (E6). Volgens het voorschrift werd 200 tot 500 ml gebruikt op 1000 liter water. Het zuurmengsel werd via dosator 1 toegevoegd aan het drinkwater.

Verder werden monsters genomen tijdens twee periodes waarin de dieren behandeld werden met antibiotica. Een schema van de behandelingen en van de tijdstippen van monsternamen zijn te vinden in Tabel 1. In een eerste periode werd amoxicilline trihydraat (800 mg actief product per gram) (Origin, Intervet, Boxmeer, Nederland) gebruikt voor de 4 tot 6 weken oude biggen (20 mg/kg lichaamsgewicht/dag), amoxicilline 70%, (Kela laboratoria, Hoogstraten, België) voor de biggen ouder dan 6 weken (10-20 mg/kg lichaamsgewicht/dag). Deze producten werden toegevoegd tijdens de routinebehandelingen van gespeende biggen ter preventie van *Streptococcus suis* infecties. Deze behandelingen duurden telkens drie dagen en tussen twee behandelingen werden de dieren gedurende vier dagen niet behandeld. De dosis was afhankelijk van de leeftijd en het gewicht van de dieren: tijdens de eerste week na het spenen 80 g, tijdens de tweede week 100 g en tijdens de derde week 120 g per compartiment (gemiddeld 184 biggen/compartiment) per dag. Soluphar (Ecuphar, Zuienkerke, België) werd toegevoegd om de oplosbaarheid van amoxicillinetrihydraat te bevorderen (68 g per 1000 liter drinkwater). De berekende hoeveelheid geneesmiddel met dit hulpmiddel werd in een emmer van 10 liter opgelost. Via een dosator werd het mengsel met het drinkwater gemengd.

Doxycyclinehydraat (Soludox 50%, Eurovet, Bladel, Nederland) werd gegeven op een later tijdstip aan een groep gespeende hoestende biggen, eveneens 80 g (10 mg/kg lichaamsgewicht/dag) per compartiment en per dag in de eerste week van de behandeling, 100 g in de tweede week en 120 g in de derde week. Citroenzuur (500-1000 g/10 liter water/1000 g doxycycline) werd toegevoegd om de oplosbaarheid van doxycycline te bevorderen. Biggen tot 25 kg dronken minimum 0,1 liter per kg LG.

Tijdens alle behandelingen werd er dagelijks één emmer bereid rond 8 uur 's morgens. Zodra de emmer leeg was, rond de middag, werd het doseerapparaat uitgeschakeld. De rest van de dag kregen de dieren water zonder geneesmiddelen.

Monsters

Twee aangezuurde monsters werden genomen aan een kraantje tussen het doseerapparaat en de nippels. De pH werd gemeten met behulp van een door CID-lines (Ieper, België) ter beschikking gestelde pH-

meter. De monsters werden geanalyseerd zoals hoger beschreven.

Tijdens en na de behandeling met amoxicilline werden 33 drinkwatermonsters genomen in verscheidene hokken aan de drinknippels bij de verschillende leeftijdsgroepen. Nog eens 54 monsters werden genomen op 0,5, 1, 2,5, 3, 4, 7,5 en 26 uur na het stopzetten van de behandeling, ook telkens in verschillende hokken.

Tijdens een behandeling met doxycycline en op 3,5, 4 en 5 uur na het stopzetten ervan werden telkens 3 monsters in verscheidene hokken genomen.

RESULTATEN

De detectielimieten van 13 antibiotica met de gebruikte agardiffusietest worden weergegeven in Tabel 2 en vergeleken met de gebruikelijke doseringen zoals voorgeschreven en berekend voor mestkippen en varkens of van zinkbacitracine voor konijnen. Hierbij werd verondersteld dat een dagdosis opgelost was in de hoeveelheid water die door de dieren op één dag opgenomen werd. Bij de toediening via een doseerapparaat was die concentratie tijdens de behandeling minstens even hoog. Met uitzondering van zinkbacitracine waren de detectielimieten in $\mu\text{g mL}^{-1}$ steeds lager dan de therapeutisch aangeraden concentraties in het drinkwater en kon een correcte dosering dus steeds gedetecteerd worden. In het geval van amoxicilline, tetracyclines, erytromycine en tylosine was het verschil tussen beide waarden zeer groot, maar voor spectinomycine en lincomycine was de verdunningsfactor kleiner dan 10. Ook voor sulfadimidine was er niet veel verschil (LOD 20 maal lager dan therapeutische dosis). Bij sommige antibiotica had de kwaliteit van het water een invloed op de detectielimiet. Macroliden werden iets beter aangetoond in zeer hard basisch water, enrofloxacin werd nog duidelijker aangetoond. De tetracyclines werden minder goed gedetecteerd: de LOD van oxytetracycline was 1 verdunning minder ($0,5\mu\text{g mL}^{-1}$ in plaats van $0,25\mu\text{g mL}^{-1}$). De LOD van lincomycine was eveneens verhoogd: $5\mu\text{g mL}^{-1}$ in plaats van $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabel 2).

Praktijkproeven

Aangezuurde monsters

Water aangezuurd met organische zuren gaf kleine remzones tussen 13,3 en 16,9 mm (Tabel 3). Zones groter dan 15 mm werden positief geïnterpreteerd. Bij de laagste zuurtegraad werden positieve resultaten genoteerd.

Monsters tijdens en na de behandeling met antibiotica

De remzones tijdens behandelingen met de antibiotica amoxicilline en doxycycline waren in de meeste gevallen veel groter (Tabel 4). Slechts 2 van de 33 watermonsters met amoxicilline gaven een negatief resultaat. Er was wel een grote variatie in remzones, soms zelfs in hetzelfde compartiment en ook

Tabel 2. Detectielimieten van antibiotica in het drinkwater van dieren met de agardiffusietest.

Familie	Antibioticum	Detectielimiet in $\mu\text{g mL}^{-1}$		Voorgeschreven concentratie in mg L^{-1} *	
		Gedistilleerd water	Hard water met pH8	Mestkippen	Mestvarkens
Beta lactam	Amoxicilline	0,5	0,5	50-110	100-200
Tetracyclines	Doxycycline	0,25	0,25	130-280	100
	Oxytetracycline	0,25	0,5	180-390	200-400
Quinolones	Enrofloxacin	0,5	$\leq 0,5$	25-56	150
	Flumequine	2	NT	30-67	150
Macroliden	Erytromycine	0,2	$\leq 0,2$	50-110	geen
	Tilmicosine	1	≤ 1	40-80	150-200
	Tylosine	0,5	$\leq 0,5$	230-500	21-43
Lincosamiden	Lincomycine	2,5	5	13-28	50-100
Sulfonamiden	Sulfadimidine	25	25	500	geen
Pleuromutilinen	Tiamuline	10	≤ 10	125	88-200
Andere	Spectinomycine	100	100	300	100

* concentratie opgegeven door de fabrikant of berekend uit de dosering per kg lichaamsgewicht en de wateropname per dier en per dag.
De eenheden zijn gelijk: $\mu\text{g mL}^{-1} = \text{mg L}^{-1}$
NT = niet getest

Tabel 3. Diameter van de remzones en pH van het aangezuurde water.

	Zuurtegraad	Diameters in mm (n = 4)
Aangezuurd monster 1	6	13,3 – 14,0
Aangezuurd monster 2	5	14,2 – 16,9

Tabel 4. Remzones van drinkwater tijdens een behandeling met amoxicilline of doxycycline.

Afdeling en tijdstip na het spenen	Doseerapparaat	Aantal positief* / totaal aantal monsters	Diameter remzones in mm, indien aanwezig
<i>Behandeling met amoxicilline</i>			
Compartiment 1, week 1	MS easydoser	3/3	58,9 – 60,8
Compartiment 2, week 1	MS easydoser	3/3	58,2 – 61,3
Compartiment 3, week 3	MS easydoser	5/6	21,6 – 44,8
Compartiment 3, week 4	MS easydoser	3/3	66,3 – 65,9
Compartiment 4, week 3	MS easydoser	6/6	48,5 – 55,2
Compartiment 7, week 1	Dosatron	2/3	31,7 – 37,5
Compartiment 8, week 1, dag 1	Dosatron	3/3	56,5 – 59,4
Compartiment 8, week 1, dag 2	Dosatron	3/3	33,0 – 38,7
Compartiment 10, week 4	MS easydoser	3/3	66,7 – 68,1
<i>Behandeling met doxycycline</i>			
Compartiment 5, week 3	Dosatron	3/3	65,6 – 68,0

*positief: aanwezigheid van remzone groter dan 15 mm.

Tabel 5. Remzones na het stopzetten van de behandelingen.

Na behandeling met	Tijdstip na het stopzetten	Aantal positief/ aantal getest	Diameter remzones in mm, indien aanwezig
Amoxicilline	30 minuten	9/9	36,5 – 63,0
	60 minuten	6/6	40,6 – 62,0
	2,5 tot 3 uur	1/15	20,7
	4 tot 26 uur	0/24	
Doxycycline	3,5 uur	3/3	42,5 – 48,6
	4 uur	3/3	37,9 – 40,9
	5 uur	0/3	

tussen de compartimenten. Zeer grote remzones werden gemeten bij de behandeling met doxycycline.

Tot één uur na de behandelingen met amoxicilline bleef de antimicrobiële activiteit hoog. Vier uur later werd geen remming meer aangetoond. Doxycycline bleef langer aantoonbaar, doch vanaf 5 uur na de behandeling was de concentratie gedaald tot beneden de detectielimiet (Tabel 5).

DISCUSSIE

De hierboven beschreven microbiologische methode is eenvoudig, goedkoop en laat toe om op een korte tijd een groot aantal watermonsters te analyseren. Ze detecteert een breed spectrum van antibiotica bij gebruikelijke therapeutische concentraties. Anderzijds is er natuurlijk geen enkele indicatie over de aard van het antibioticum, wat bij onbekende monsters een nadeel kan zijn.

Vaak gebruikte producten, zoals amoxicilline, tylosine en doxycycline, worden zeer goed gedetecteerd, waarbij de detectielimieten minstens 100 maal lager zijn dan de berekende concentraties voor mestkippen. Spectinomycine wordt niet goed gedetecteerd; de verdunningsfactor bedraagt ongeveer 3. Hierbij moet opgemerkt worden dat spectinomycine meestal samen toegediend wordt met lincomycine. Zinkbacitracine, een antibioticum dat aan pasgespeende konijnen wordt gegeven, wordt helemaal niet gedetecteerd bij de therapeutische concentratie. Boisot *et al.* (2003) gebruikten een commercieel product aan 0,675 g per liter drinkwater, Coudert en Licois (2005) aan 0,7 g per liter. De NBNT-plaat detecteert 0,125 mg standaard in 1 ml, wat overeenkomt met 8,75 internationale eenheden (IU). De dosering gebruikt door Boisot *et al.* (2003) kwam overeen met 2,853 IU per ml. Een oudere officiële analysemethode voor veevoeder schreef een inhibitietest met *Micrococcus luteus* voor als testkies voor zinkbacitracine (Richtlijn 84/4/EEG).

Een andere beperking wordt veroorzaakt door het semikwantitatief karakter van agardiffusietesten. Binnen bepaalde grenzen was de diameter van de zone recht evenredig met het logaritme van de concentratie, maar vanaf 30 mm was dit niet meer het geval. Tussen 15 mm en 30 mm kwam een toename van 4 à 5 mm overeen met een verdubbeling van de concentratie actief product (eigen niet-gepubliceerde waarnemingen). Dit betekent dat de variatie in remzones, die in compartiment 3 werden gemeten, overeenkwamen met een enorm verschil in concentratie. Een mogelijke oorzaak daarvan was het tijdstip van monsternamen. Indien de leidingen nog niet (volledig) gevuld waren met gemedicineerd water werd niet aan alle nippels dezelfde concentratie afgeleverd. Een andere waarneming was het verschil in tijdsduur van de behandelingen tussen vergelijkbare leeftijdsgroepen. De ene emmer was veel vlugger leeg dan de andere (toevallige waarneming). Mogelijke oorzaken zijn: het onjuist afstellen van de doseerapparaten, vermorsing of dieren die in één compartiment veel meer drinken dan in de andere. Het laatste was weinig waarschijnlijk

omdat alle omstandigheden in de verschillende compartimenten vergelijkbaar waren. Vermorsing is mogelijk, alhoewel de nippels ogenschijnlijk niet lekten, maar het was wel nog mogelijk dat sommige dieren met de nippels speelden. De meest waarschijnlijke oorzaak was een verschillende afstelling van de doseerapparaten, want geen van beide werd regelmatig geijkt, alhoewel dit geadviseerd werd door de fabrikant.

Het voorgaande illustreert dat de methode alleen geschikt is om te screenen. Chromatografische methoden kunnen uiteraard ook gebruikt worden om antibiotica in drinkwater te detecteren, maar deze methoden zijn veel duurder. Indien een identificatie en/of kwantificatie nodig is, zijn deze methoden aangewezen.

De leidingen werden niet gespoeld na de behandeling. Nochtans was de concentratie actief product na korte tijd voldoende gedaald, zodat op geen enkel aftappunt nog waarden boven de detectielimiet gezien werden. Het gebruik van doseerapparaten bood duidelijk voordelen vergeleken met het bereiden van een mengsel in een waterreservoir. Hierbij werden tal van nadelen opgemerkt: een langdurige aanwezigheid van niet-opgeloste producten die later ongewild in de voedselketen terechtkomen, (Croubels *et al.*, 2001; Kennedy, 2000), moeilijke reiniging, algengroei, microbiële afbraak (Vermeulen *et al.*, 2002). Wanneer geneesmiddelen in het voorraadvat worden opgelost, wordt soms aangeraden om een tweede leiding te gebruiken tijdens behandelingen, wat uiteraard een veel duurere oplossing is dan het gebruik van een doseerapparaat. Als alternatief kunnen de leidingen gespoeld worden met neutraliserende oplossingen.

De waarnemingen in het varkensbedrijf tonen aan dat de toediening van geneesmiddelen via het drinkwater niet altijd gebeurt volgens *good veterinary practices* (GVP) principes: de doseerapparaten werden bijvoorbeeld nooit geijkt. Het verdient aanbeveling om de verschillende manieren van toediening, rechtstreeks in het reservoir en via doseerapparaten, te vergelijken zodat richtlijnen voor de veehouders kunnen opgesteld worden. De hogerbeschreven methode kan hierbij een goed hulpmiddel vormen.

BESLUIT

Een microbiologische inhibitietest is een goede opsporingsmethode om, uitgaande van bekende antibiotica, therapeutische concentraties op te sporen in het drinkwater bij voedselproducerende dieren. Zinkbacitracine wordt echter niet gedetecteerd. Indien de aard en de preciese concentratie van het antibioticum gevraagd worden, is een bevestiging nodig door middel van een chromatografische analyse.

DANKWOORD

Dit artikel is een samenvatting van het onderzoek dat uitgevoerd werd als onderdeel van het eindwerk van de eerste auteur. Graag een woord van dank aan

de verantwoordelijken van het varkensbedrijf en het konijnenbedrijf voor hun medewerking bij het collecteren van de watermonsters en aan Martine Boonaerts, Sandra Vangeenberghe en Carine Van Lancker voor de hulp bij de analyses.

LITERATUUR

- Boisot P., Duperray J., Guyonvarch A., Le Bihan A., Richard A., Licois D., Coudert P. (2003). Evaluation de l'efficacité de la bacitracine soluble (Bacivet S®) dans l'eau de boisson lors d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. *Journées de la Recherche Cunicole* 10, 275-278.
- Catry B., Laevens H., Devriese L.A., Opsomer G., de Kruif A. (2003). Antimicrobial resistance in livestock. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26, 81-93.
- Coudert P., Licois D. (2005). Epizootic rabbit enteropathy. Study of early phenomena with fresh inoculum and attempt at inactivation. *World Rabbit Science* 13, 229-238.
- Croubels S., Vrielinck J., Baert K., Vermaut I., Castryck F., De Backer P. (2001). A special case of an acute tiamulin-salinomycin intoxication in pigs due to residual tiamulin four months after medication. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 70, 54-58.
- Debackere M. (1996). Gezamenlijk gebruik van doxycycline en tylosine. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 65, 39-40.
- Kennedy D.G., Cannavan A., McCracken R.J. (2000). Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *Journal of Chromatography A* 882, 37-52.
- Koenen-Dierick K., Okerman L., De Zutter L., De Groot J.M., Van Hoof J., Srebrnik S. (1995). A one-plate test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method? *Food Additives and Contaminants* 12, 77-82.
- McEvoy J.D., Mayne C.S., Higgins H.C., Kennedy D.G. (2000). Transfer of chlortetracycline from contaminated feedingstuff to cows' milk. *The Veterinary Record* 146, 102-106.
- Mlot C. (2001). Antimicrobials in Food Production: Resistance and Alternatives. *ASM News* 67 (4), 196-200.
- NSW Department of primary industries (2006). Water medication for pigs. Internerreferentie: <http://www.dpi.nsw.gov.au/primefacts>
- Okerman L., Van Hoof J., Oosterom J., Laurier L., De Zutter L., Cornelis M. (1994). Maximale residulimieten voor antibiotica in eetwaren van dierlijke oorsprong. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 63, 179-186.
- Timmerman T., Dewulf J., Catry B., Feyen B., Opsomer G., de Kruif A., Maes D. (2006). Quantification and evaluation of antimicrobial-drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Preventive Veterinary Medicine* 74, 251-263.
- Van den Bogaard A.E.J.M., Breeuwsma A.J., Julicher C.H.M., Mostert A., Nieuwenhuijs J.H.M., Vaarkamp H., Verhoeff J., Vulto A. (1994). Veterinair antibioticumbeleid: aanbevelingen van een werkgroep. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 119 (6), 160-183.
- Vermeulen B., De Backer P., Remon J.P. (2002). Drug administration to poultry. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 795-803.
- Williams J.D., Sefton A.M. (2007). The prevention of antibiotic resistance during treatment. *Infection* 27, 29-31.