

KEUZE VAN GESCHIKTE SCREENINGSTESTEN VOOR DE DETECTIE VAN ANTIBIOTICARESIDUEN BIJ PLUIMVEE

L. Okerman, J. Van Hoof, L. Devriese

Veterinaire Volksgezondheid en Voedselveiligheid, Faculteit Diergeneeskunde,
Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
Lieve.okerman@UGent.be

SAMENVATTING

In dit overzicht, aangevuld met enige praktijkervaring, wordt een aantal methoden vergeleken die kunnen toegepast worden voor screening van spierweefsel van pluimvee op aanwezigheid van antibioticaresiduen. Hierbij werd vooral rekening gehouden met de specifieke situatie van braadkippen, die individueel weinig waarde vertegenwoordigen, in grote groepen worden gehouden en op zeer korte tijd slachtrijp zijn. Een beperkt aantal geneesmiddelen is geschikt voor perorale toediening aan deze dieren en ze behoren tot alle bekende families, met uitzondering van de cefalosporinen en de verwanten van chlooramfenicol. In de praktijk worden vooral amoxicilline, tylosine, doxycycline, flumequine, verscheidene sulfonamiden en lincosamine + spectinomycine toegediend. Een combinatie van twee eenvoudige testen, een agardiffusietest met *Bacillus subtilis* en de Premi test, die beide weinig of geen monstervoorbereiding vergen, geeft al een goede indicatie omtrent de aan- of afwezigheid van residuen van deze antibiotica. Snelle immunologische testen of receptortesten zijn soms aangewezen voor de autocontrole in de slachterijen, maar die zijn nog niet voor alle families van antibiotica beschikbaar. Fout-conforme (vals-negatieve) resultaten moeten vermeden worden bij officiële controles en in dat geval moet een meer uitgebreide reeks analyses uitgevoerd worden.

INLEIDING

Antibioticaresiduen worden bij slachtdieren traditioneel opgespoord in de nier door middel van een microbiologische techniek. De analyse wordt vooral uitgevoerd bij in nood geslachte dieren en een positief resultaat is een wettelijke reden voor afkeuring. Van 1973 tot 1995 werd daarbij een methode gebruikt met *Micrococcus luteus*, daarna werd overgegaan tot een analoge test doch met *Bacillus subtilis* als testkiem; deze methode is sindsdien algemeen bekend als de Nieuwe Belgische Niertest (NBNT) (Koenen-Dierick *et al.*, 1995; Anoniem, 1995). Ook in Nederland worden grote slachtdieren op een min of meer analoge manier gescreend (Nouws *et al.*, 1988).

De Belgische wetgeving voorziet geen dergelijke methode voor andere diersoorten, zoals pluimvee of aquacultuurdieren. De NBNT kan niet zomaar toegepast worden op alle gekweekte diersoorten, omdat er ook strikte voorschriften zijn in verband met de monstername. Zo moeten twee schijfjes met een diameter van 12,7 mm doordrenkt worden met vocht uit de medulla, op de rand van het nierbekken, en moet ook een

cilindervormig stukje cortex van 8 mm diameter en ongeveer 2 mm dik onderzocht worden. Dit is al onmogelijk bij kleine zoogdieren, zoals konijnen. De monstername kan helemaal niet toegepast worden zoals voorgeschreven bij vogels, omdat de anatomie van de vogelnier verschillend is. Bij dergelijke dieren is het meer aangewezen om spierweefsel te onderzoeken; dit vereist een andere aanpak.

Om meerdere redenen moet een analysemethode voor spierweefsel gevoeliger zijn dan een voor nieren. Ten eerste zijn de maximale residulimieten (MRL) (zie kaderstuk) van toegelaten geneesmiddelen heel dikwijls hoger in de nier dan in de andere weefsels en bij tal van antibiotica blijven de residuconcentraties het langst hoog in de nieren. Ten tweede wordt bij de Belgische en de Nederlandse niertesten niervocht onderzocht, waarin de analyten vaak in hogere concentratie voorkomen dan in het nierweefsel zelf. Daardoor is het resultaat van een niertest toch nog een goede parameter om de residustatus van een slachtdier te beoordelen, ondanks de relatief te hoge detectielimieten (LOD) van tal van antibiotica. Deze overwegingen zijn echter niet geldig voor spieren, waar men terdege

DEFINITIES

In de tekst die hierna volgt, worden termen gebruikt die minder of niet gekend zijn bij personen die niet vertrouwd zijn met residuanalyse. Daarom volgen hier een aantal definities. De meeste zijn overgenomen uit de recente Europese wetgeving (Anoniem, 2002).

Maximale residulimiet, (MRL)

Dit is een concentratie van analyt, uitgedrukt in $\mu\text{g}/\text{kg}$ die aanwezig mag zijn in een bepaald eetwaar.

Kiemgroeiremmende stoffen (KGRS)

De oudste analysetechnieken voor antibioticaresiduen steunen op de bacteriegroeiremmende eigenschappen, het gemeenschappelijk kenmerk bij uitstek van deze geneesmiddelen. Andere inhibitoren, bijvoorbeeld natuurlijk voorkomende inhibitoren, zoals lysozyme of ontsmettingsmiddelen, worden met deze methode eveneens aangetoond. Een positieve KGRS-test is een aanwijzing voor de aanwezigheid van een antibioticum maar geen bewijs.

Screeningstest

Dit is een test die geschikt is om uit grote aantallen de verdachte monsters te selecteren, dit wil zeggen deze die (misschien) niet voldoen aan de MRL-wetgeving.

Positief of negatief resultaat

Deze termen worden niet gedefinieerd in het besluit. Nochtans kunnen ze niet verbannen worden uit het laboratorium (zie hieronder).

Conform of niet-conform resultaat

De aanvrager van de analyses wil vooral te weten komen of monsters al dan niet voldoen aan de wetgeving. Een antwoord "positief" of "negatief" kan verwarring scheppen en daarom werden die termen vervangen door "niet-conform" of "conform". Een negatief resultaat van een inhibitietest betekent dat een monster conform is wat betreft één of meerdere antibiotica of groepen van antibiotica, waarvan bewezen is dat ze in voldoende lage concentratie aangetoond worden. Bij een positief resultaat kan alleen besloten worden dat het monster verdacht is, voor dezelfde of eventueel voor andere antibiotica. Als het gaat om toegelaten geneesmiddelen moet men de identiteit van het residu en de concentratie ervan kennen om te bewijzen dat een monster niet-conform is.

Detectielimiet, *limit of detection* (LOD)

Deze parameter wordt niet gedefinieerd in het hogervermelde besluit. In het geval van de agardiffusietesten, één type van inhibitietesten, wordt met LOD bedoeld de kleinste hoeveelheid of de kleinste concentratie van analyt in water die een remzone veroorzaakt gelijk aan 12 mm. Dit komt overeen met de remzone vanaf waar beslist wordt of een monster conform is dan wel verdacht. Een LOD mag niet zomaar omgerekend worden naar een concentratie in het vlees, omdat tal van andere parameters een invloed kunnen hebben op de detectie.

α - en β -fouten

α -fout betekent de waarschijnlijkheid dat een monster conform is terwijl een niet-conform resultaat is verkregen, en is dus de kans op een vals niet-conform besluit.

β -fout betekent de waarschijnlijkheid dat een monster niet conform is terwijl een conform resultaat is verkregen, en is dus dat de kans op een vals conform besluit.

CC β

Dit is de kleinste hoeveelheid van een substantie die met een foutkans β gedetecteerd wordt. In het geval van toegelaten antibiotica, waarvoor een MRL bepaald is, betekent dit dat de CC β gelijk moet zijn aan of lager dan de MRL, met een foutkans β kleiner dan 5%.

CC α

Dit is de beslissingslimiet: vanaf waar met een foutkans α kan worden besloten dat een monster niet-conform is. Resultaten van inhibitietesten laten niet toe om te besluiten dat een monster niet-conform is, resultaten van immunologische testen of receptortesten meestal ook niet. De bepaling van CC α is niet vereist voor screeningstesten.

Kunstmatig besmet, belast of gespiked vlees (*spiked meat*)

Vlees waaraan een welbepaalde hoeveelheid analyt is toegevoegd, vooraan met de onderzoeksprocedure te starten. Dit is nodig om een analysemethode te evalueren.

Natuurlijk besmet vlees (*incurred meat*)

Vlees afkomstig van behandelde dieren. Omwille van ethische en praktische redenen wordt dit minder gebruikt dan kunstmatig besmette weefsels.

rekening moet houden met de MRL's. Om te bewijzen dat een methode voldoet voor een product of voor een groep producten moet men aantonen dat zo goed als alle monsters met gehalten gelijk aan de MRL gedetecteerd worden (Anoniem, 2002).

Het is algemeen bekend dat mestkippen vaak behandeld worden met antibiotica. De residugehalten in het vlees zullen echter onder het toegelaten niveau gedaald zijn als de pluimveehouder rekening hield met de voorgeschreven wachttermijnen. De kippen die moeten geslacht worden, moeten vergezeld zijn van een "document begeleiding slachtpluimvee" waarop alle behandelingen zijn aangegeven. Dit document moet de naam van de geneesmiddelen vermelden als ook de dagen waarop ze toegediend werden, zodat de inspectiediensten kunnen nagaan of de wachttermijn gerespecteerd werd. De aanwezigheid van residuen kan dan gecontroleerd worden via steekproeven, zoals bij de programmatieonderzoeken voorgeschreven door de EG, of als autocontrole door de afnemers (bijvoorbeeld de pluimveeslachterijen).

In beide gevallen wil men bij een groot aantal dieren zoveel mogelijk antibiotica opsporen in een zo kort mogelijke tijdspanne en met een zo laag mogelijke kostprijs. Geavanceerde chromatografische technieken zijn hiervoor te duur en te omslachtig. Als geschikte methoden komen in aanmerking: microbiologische inhibitietesten en immunologische technieken. Dit overzicht, aangevuld met enige praktijkervaring, is bedoeld als hulp bij de keuze van een geschikte techniek voor pluimvee en gekweekt wild.

GEBRUIK VAN ANTIBIOTICA BIJ PLUIMVEE EN GEKWEKT WILD

Bij de keuring wordt een onderscheid gemaakt tussen verschillende categorieën van pluimvee. Met gevogelte worden bedoeld: de als huisdieren levende hoenderachtigen, duifachtigen en zwemvogels. Braadkippen vormen de grootste groep. Daarnaast zijn er ook nog soepkippen (meestal oude legkippen of fokdieren) en piepkuikens die heel jong geslacht worden. Andere hoenderachtigen die gekweekt worden voor de handel zijn kalkoenen en parelhoentjes. De laatste behoren voor de geneesmiddelenwetgeving tot de *minor species*, evenals de duiven en de struisvogels. Ten slotte is er de niet verwaarloosbare groep van de konijnen, ook een *minor species*, die strikt genomen niet bij het pluimvee hoort maar ook niet bij het andere slachtvee (Anoniem, 2000).

Het aanbod van antibiotica die kunnen toegediend worden aan grote groepen dieren, is beperkt vergeleken met de antibiotica die geregistreerd zijn voor grote slachtdieren met een hoge individuele waarde. Mestkippen worden zeker niet individueel behandeld. Het heeft geen zin om antibiotica die alleen in inspuitbare vorm of in individuele porties verkrijgbaar zijn bij braadkippen op te sporen. Er zijn wel inspuitbare geneesmiddelen voor kippen geregistreerd maar die worden alleen aan waardevolle dieren toegediend, bijvoorbeeld in de hobbykweek. Struisvogels en kalkoenen zijn waarschijnlijk een uitzondering alhoewel daaromtrent niet veel gegevens beschikbaar zijn. Industrieel gehouden konijnen worden evenmin vaak ingespoten en bij deze diersoort wordt een aantal antibiotica afgeraden omdat ze toxisch zijn voor de darmflora. Sulfonamiden, tetracyclinen, quinolonen, tilmicosine en tiamuline hebben geen nadelige effecten. Voor deze diersoort zijn weinig geneesmiddelen geregistreerd en moet de dierenarts zich houden aan de voorschriften die gelden voor de zogenaamde weesgeneesmiddelen (Anoniem, 2000).

Geneesmiddelen die slecht of niet worden geresorbeerd na toediening in het drinkwater of het voeder, bijvoorbeeld de aminoglycosiden, zullen bij mestkippen geen aanleiding geven tot residuen in het spierweefsel, en daar moet dan ook niet gericht naar gezocht worden.

Een aantal specialiteiten die geschikt zijn voor perorale toediening aan nutpluimvee, is te vinden op de website van het Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische Informatie (www.bcfi-vet.be). Tabel 1 bevat gegevens uit de praktijk, aangevuld met wat op deze website te vinden is.

COURANTE MICROBIOLOGISCHE SCREENINGSTECHNIEKEN VOOR SPIERWEEFSEL (KGRS-TESTEN): AGARDIFFUSIETESTEN

De vierplatentest (four plate test, FPT)

De FPT, beschreven in het referentiewerk van Heitzman (1994), is een microbiologische methode om spierweefsel te analyseren op antibacteriële substanties door middel van vier platen. Drie van de platen bevatten elk een verschillende voedingsbodem, pH6, pH7,2 en pH8, alle drie beënt met *B. subtilis*, de vierde een pH8-voedingsbodem beënt met *M. luteus*. Aan de pH7,2-bodem wordt trimethoprim toege-

Tabel 1. Antibiotica beschikbaar voor toediening in het drinkwater of als geneesmiddel voormengsel aan pluimvee.

Groep	Substantie	Wachtijd voor pluimvee *
Beta-lactam-antibiotica	Amoxicilline	24 uur tot 3 dagen
Aminoglycosiden	Spectinomycine	1 dag
	Paromomycine	30 dagen
	Neomycine	0 dagen
Tetracyclinen	Oxytetracycline	7 tot 14 dagen
	Doxycycline	3 tot 12 dagen
Sulfonamiden (met of zonder trimethoprim)	Sulfadiazine	24 uur tot 3 dagen
	Sulfaclozine	14 dagen
	Sulfadimidine	Geen gegevens beschikbaar
	Sulfachloropyridazine	1 dag
	Sulfamethoxazole	7 dagen
Quinolonen	Difloxacin	24 uur
	Enrofloxacin	10 dagen
	Flumequine	48 h tot 4 dagen
Lincosamiden	Lincomycine	0 dagen
Pleuromutilinen	Tiamuline	5 dagen
Polymyxinen	Colistine	0 tot 2 dagen
Macroliden	Erytromycine	72 uur
	Spiramycine	7 dagen
	Tilmicosine	12 dagen (19 dagen voor kalkoenen)
	Tylosine	24 uur tot 5 dagen
Combinaties	Lincomycine + spectinomycine	3 dagen

* De wachttijden kunnen verschillend zijn naargelang de specialiteiten.

voegd om op die manier de gevoeligheid voor sulfonamiden te verhogen.

Een belangrijk verschil met analoge testen, zoals de NBNT, is de dikte van de voedingsbodem: de 90 mm diameter petrischalen worden gevuld met slechts 5 ml agarbodem. Een dunnere agarlaag maakt de test gevoeliger: de detectielimieten zijn lager en dezelfde concentratie van analyt geeft grotere remzones. Tabel 2 bevat een vergelijking van de detectielimieten (LOD's)

van meerdere antibiotica op de platen van de FPT en op de voedingsbodem van de Belgische Niertest. Met de FPT worden veel lagere LOD's bekomen. Deze LOD's werden bepaald met waterige oplossingen, niet met artificiëel besmette monsters, en de concentraties kunnen niet zonder meer geëxtrapoleerd worden (zie verder).

De analyse wordt uitgevoerd met intact diepgevroren spierweefsel. Van een cilinder weefsel genomen

Tabel 2. Detectielimieten (LOD's) van verschillende antibiotica opgelost in water met de *Four Plate Test* (FPT) en met de Nieuwe Belgische Niertest (NBNT): concentraties en absolute hoeveelheden die een remzone veroorzaken van 12 mm diameter (schijfjes inbegrepen) *.

	FPT (5ml voedingsbodem/plaat)			Andere platen (5 ml voedingsbodem/plaat)			NBNT (14 ml voedingsbodem/plaat)		
	Referentielabo µg/l	Eigen waarnemingen Ng/schijfje	µg/l	B. cereus pH6 µg/l	Ng/schijfje	E. coli Bayer 14 pH6 µg/l	Ng/schijfje	µg/l	Ng/schijfje
PENICILLINEN									
Ampicilline	50	1,5	300	>8000	>80	>8000	>80	650	6,5
Amoxicilline	80	2,4	300	>8000	>80	>8000	>80		
TETRACYCLINEN									
Oxytetracycline	250	7,5	800	300	3	1000	10	2800	28
Tetracycline	200	6	500	400	4	2000	20	2000	20
Chloortetracycline	30	0,9	50	30	0,3	700	7	510	5,1
Doxycycline			100	60	0,6	2000	20	360	3,6
MACROLIDEN-LINCOSAMIDEN									
Spiramycine	130	3,9						1700	17
Erythromycine	30	0,9	100		1			4400	44
Tylosine	250	7,5	1000		10			>16000	>160
Lincomycine			2000		20				
QUINOLONEN									
Flumequine	350	10,5	400	4000	40	150	1,5		
Enrofloxacin			1000	4000	40	50	0,5		
Ciprofloxacin			400	3000	30	150	1,5		
Difloxacin			200		2	400	4		
SULFONAMIDEN									
		Onvoldoende		Onvoldoende	Niet gedetecteerd	Niet gedetecteerd			Onvoldoende

* Bronnen: Heitzman (1994); Okerman *et al.*, (2001).

met een kurkboor van 8 mm diameter, worden 8 schijfjes van 2 mm dikte gesneden. Op elk van de vier platen worden twee schijfjes vlees gelegd. Het geheel wordt dan overnacht geïncubeerd bij de vereiste temperatuur en de volgende dag gecontroleerd op aanwezigheid van remzones rond de stukjes. Als er remrandjes voorkomen, en als de diameter ervan groter is dan 2 mm bij beide stukjes op minstens één van de platen, dan is het resultaat van de KGRS-test positief; het vlees wordt in dit geval als verdacht beschouwd.

De drieplatentest voor spierweefsel van vissen

Vals-positieve resultaten kunnen optreden bij onderzoek van vissen op een voedingsbodem beënt met *B. subtilis*. Daarom werd in Noorwegen een andere combinatie van platen op punt gesteld, beënt met drie verschillende testkiemen: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATTC 11303 en *M. luteus*. Met die testen zouden de volgende groepen moeten gedetecteerd worden: tetracyclinen, quinolonen, nitrofuranen en sulfonamiden (de laatste met de plaat beënt met *M. luteus*, waaraan ook trimethoprim werd toegevoegd) (Valset en Yndestad, 1989).

Toen de methode voorgeschreven werd, was de MRL-regelgeving in Europa nog niet van kracht. Sindsdien werden de nitrofuranen opgenomen in annex IV en zijn ze bijgevolg verboden; het is ook duidelijk dat sulfonamiden onvoldoende of niet gedetecteerd kunnen worden met dergelijke technieken. De drieplatentest voor vissen heeft echter een groot voordeel: de drie testkiemen vertonen grote verschillen in gevoeligheid voor de verschillende antibioticumfamilies en dus geven de remzonepatronen een indicatie omtrent de groep die de remming veroorzaakt. Om die reden kan een dergelijke combinatie van platen ook voordelen opleveren voor onderzoek van andere diersoorten en in het bijzonder van pluimvee (Okerman *et al.* 2001).

Andere analoge testen

In de literatuur worden nog tal van andere dergelijke testen beschreven. In de Verenigde Staten en Canada worden de *Swab Test On Premises* (STOP), de *Calf Antibiotic and Sulfa Test* (CAST) of de *Fast Antimicrobial Screening Test* (FAST) gebruikt voor nieren van grote slachtdieren. STOP gebruikt *B. subtilis* als testkiem, beide andere *Bacillus megaterium* (Korsrud *et al.* 1998).

Ellerbroek (1991) stelde een voedingsbodem pH8 beënt met *E. coli* Bayer 14 voor als bijkomende plaat bij de FPT om op die manier de detectie van quinolonen te verbeteren. Braham *et al.* (2001) ontwikkelden een KGRS-test die gebruik maakt van één plaat beënt met *Bacillus stearothermophilus* en waarbij ook een indicator toegevoegd werd aan het milieu. De monstername gebeurde hier door het impregneren van papierschijfjes in een insnede in de weefsels (de zogenaamde sandwichtechniek). Alhoewel tal van antibiotica op die plaat gedetecteerd werden, waren de LOD's vaak hoger dan de corresponderende MRL's in het spierweefsel.

Tsai en Kondo (2001) stellen een combinatie voor van vier agardiffusietesten bestaande uit 4 media elk beënt met een verschillende testkiem, om een optimale gevoeligheid te bekomen voor de meest gebruikte antibiotica.

Op het 4th *International Symposium on hormone and veterinary drug residue analysis* werd een combinatie van 6 platen voorgesteld, Poultry Scan genaamd. Hierbij worden extracten geanalyseerd, maar er wordt niet aangegeven op welke manier die extracten bereid worden. Ook de testkiemen en de samenstelling van de voedingsbodems zijn niet bekend. De detectielimieten zijn wel zeer laag, voor de meeste producten lager of zelfs veel lager dan de MRL. De analyse werd ontwikkeld in het RIKILT (Wageningen, Nederland).

Tekortkomingen van de FPT en van andere agardiffusietesten

Om de performantie van een methode te bepalen, wordt meestal als volgt tewerkgegaan: aan een bepaalde hoeveelheid monster dat geen residu bevat, wordt het op te sporen analyt toegevoegd in een welbepaalde concentratie; het belast of gespiked monster wordt dan onderworpen aan alle bewerkingen die nodig zijn voor de extractie, concentratie en detectie. Deze handelswijze kan niet toegepast worden bij methoden, zoals de FPT, omdat hier een stukje intact vlees van ongeveer 0,1g wordt onderzocht. Zoals hoger vermeld, worden detectielimieten van antibiotica met de FPT en andere agardiffusietesten meestal bepaald in een waterige oplossing en uitgedrukt in µg/ml of in een absolute hoeveelheid ng/schijfje. Als men ervan uitgaat dat alle residu uit het stukje vlees, dat ongeveer 0,1g zou wegen, vrijkomt en aangetoond wordt, dan mag de LOD, omgerekend naar µg/kg spierweefsel, niet hoger zijn dan de MRL. De sulfonamiden bijvoorbeeld kunnen niet tot op MRL-niveau gedetecteerd worden.

Tabel 3. Validatie van agardiffusietesten voor screening van spierweefsel op aanwezigheid van tetracyclinen en quinolonon, in aanwezigheid van 0,1g matrix. Geschiktheid van de verschillende testkiem/voedingsbodem combinaties voor de detectie van concentraties gelijk aan de MRL.

	Aantal gedetecteerd/aantal onderzocht op plaat beënt met			
	<i>B. subtilis</i> bij pH6	<i>B. cereus</i> bij pH6	<i>E. coli</i> Bayer 14 bij pH6	<i>E. coli</i> Bayer 14 bij pH8
TETRACYCLINEN				
Oxytetracycline 10ng	4/20	20/20		
Tetracycline 10ng	5/20	20/20		
Chloortetracycline 10ng	20/20	20/20		
Doxycycline 10ng	20/20	20/20		
QUINOLONEN				
Flumequine 20ng	0/20		20/20	19/20
Enrofloxacin 10ng	5/20		20/20	20/20
Ciprofloxacin 10ng	0/20		20/20	20/20

teerd worden in intact spierweefsel met de FPT, omdat ze zelfs in waterige oplossing onvoldoende actief zijn op de platen (zie hoger).

Dit is niet de enige factor die de detectielimieten in weefsels bepaalt. De voedingsbodems zijn relatief arm aan nutriënten en de pH is aangepast om ze zo gevoelig mogelijk te maken voor de te detecteren stoffen: voor de detectie van macroliden werkt men bijvoorbeeld met een relatief hoge pH, omdat deze groep het meest actief is in een basisch milieu. Door toevoeging van een stuk spierweefsel rijk aan proteïnen en met een pH lager dan 6,0, worden die gunstige omstandigheden echter tenietgedaan. Ook kan de relatief lange incubatie in aanwezigheid van weefselenzymen bijdragen tot de afbraak van weinig stabiele antibiotica. Deze matrixeffecten oefenen een belangrijke invloed uit op de detectie van sulfonamiden, aminoglycosiden en macroliden en in mindere mate op de detectie van beta-lactamantibiotica (Okerman *et al.* 1998a). Uiteindelijk blijven alleen de tetracyclinen en de quinolonon over, waarvan de detectie veel minder wordt beïnvloed door de aanwezigheid van het stukje vlees. Beide worden gedetecteerd met voedingsbodems beënt met *B. subtilis*, doch de meeste

quinolonon worden beter opgespoord op een plaat beënt met een *E. coli* stam die oorspronkelijk niet tot de FPT behoort, terwijl de tetracyclinen selectief aangetoond kunnen worden op een iets gevoeliger plaat beënt met een *B. cereus* stam.

In ons laboratorium werd rekening gehouden met deze matrixeffecten bij de validatie van de FPT en verwante technieken. Volgens de Europese Verordening voldoet een screeningstest als hij minstens 95% van de monsters die residu bevatten in een concentratie gelijk aan de MRL detecteert. Dit werd als volgt onderzocht: een papierschijfje werd doordrenkt met een oplossing die een hoeveelheid analyt gelijk aan de MRL van het antibioticum bevat, en erbovenop werd een stukje spierweefsel gelegd dat op dezelfde manier werd voorbereid als voorgeschreven voor de FPT. Na incubatie werden de remzones gemeten rond elk van 20 onderzochte "spikes". De voedingsbodem pH6 beënt met *B. subtilis* voldeed niet voor een aantal antibiotica in deze omstandigheden, de meer specifieke agardiffusietesten wel (Tabel 3).

Ook hiermee is nog niet definitief bewezen dat een methode in de praktijk werkzaam is. Een tweede factor die de detectie kan beïnvloeden, is het al dan niet

vrijkomen van het residu uit het monster. Dit kan alleen onderzocht worden met behulp van spierweefsel afkomstig van behandelde dieren, dus met *incurred* in plaats van *spiked samples*. De bereiding van dergelijke monsters met residuconcentraties gelijk aan de MRL is natuurlijk onmogelijk, omdat de behandelde dieren moeten geslacht worden op het juiste moment. Met behulp van een reeks monsters, waarvan de residuconcentraties een *range* vormen, kan wel al het één en ander afgeleid worden. Een aantal methoden werd geëvalueerd met dergelijke reeksen vleesmonsters, natuurlijk besmet met doxycycline of oxytetracycline. Beide tetracyclinen bleken goed aangetoond te worden in intact vlees op platen beënt met *B. cereus*, oxytetracycline net niet voldoende op platen beënt met *B. subtilis* (Okerman *et al.*, 2004). Tot nu toe hebben we te weinig gegevens over de quinolonen. Enrofloxacin samen met ciprofloxacin en ook flumequine, worden af en toe gevonden met de FPT bij kippen en andere dieren (Okerman *et al.*, 1998b en niet gepubliceerde waarnemingen), maar we weten niet of alle niet-conforme monsters op die manier gedetecteerd worden.

SNELLE KGRS-TEST MET INDICATOR: DE PREMI TEST

De Premi test, in de handel gebracht door DSM Food Specialties (Delft, Nederland), gebruikt net als de hogervermelde methode van Braham *et al.* (2001) *B. stearothermophilus* als testkiem. Vleesvocht wordt in afzonderlijke buisjes bovenop een kleine hoeveelheid voedingsbodem gebracht en na 20 minuten im-pregnatie weggespoeld. Remzones worden hier niet gemeten, maar de inhibitie wordt bepaald door middel van een indicator: een vertraging van de kleuromslag duidt op de aanwezigheid van een KGRS. Het resultaat is dus zuiver kwalitatief, terwijl de plaatsten ook semi-kwantitatief kunnen geïnterpreteerd worden.

De buisjes worden geïncubeerd bij 64°C en afgelezen na ongeveer 3 uur. In vergelijking met de hogervermelde agardiffusietesten, die een overnachting vereisen, wordt hier een relatief snel resultaat bekomen, wat in de praktijk een voordeel kan zijn.

De Premi test wordt gepromoot als algemene test voor antibioticaresiduen. De firma zelf geeft detectielimieten op. Uit die gegevens kan afgeleid worden dat de methode niet voldoet voor de quinolonen, een groep die veel gebruikt wordt bij pluimvee. Eigen onderzoek heeft ook bewezen dat de methode evenmin voldoet voor de tetracyclinen, noch in kunstmatig be-

smet noch in natuurlijk besmet spierweefsel (Okerman *et al.* 2004). Enkele groepen die niet (of minder goed) worden aangetoond met de FPT, zoals de sulfonamiden, de macroliden en de beta-lactam-antibiotica, worden met de Premi test dan weer beter en sommige producten zelfs zeer goed gedetecteerd. Niet alle sulfonamiden en niet alle macroliden worden tot op MRL-niveau teruggevonden maar de Premi test is de enige die deze kan detecteren na een minimale monstervoorbereiding (Tabel 4).

IMMUNOLOGISCHE TECHNIEKEN EN RECEPTORTESTEN

Het niet-specifieke karakter van inhibitietesten waardoor meerdere groepen van antibiotica in één stap worden aangetoond, heeft ook een nadeel: er is geen enkele aanwijzing omtrent de natuur van de kiemgroeiremmende stof. Immunologische technieken en receptortesten daarentegen detecteren één of een aantal chemisch verwante antibiotica. Bij immunologische methoden wordt gebruik gemaakt van de antigen-antistof reactie, terwijl het analyt bij receptortesten aan een bacteriële receptor bindt. Bij klassieke *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) wordt de binding zichtbaar gemaakt door middel van een enzyme, dat een kleurreactie in gang zet.

Talrijke min of meer handige kits zijn de voorbije jaren in de handel gebracht als middel om antibioticaresiduen op te sporen, meestal in melk maar ook in andere voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong. In de residuanalyse zijn immunologische testen of receptortesten alleen interessant als ze een ganse groep opsporen. Kits die bijvoorbeeld alleen sulfadimidine detecteren en niet de andere sulfonamiden, vinden weinig toepassing in de praktijk. Het blijkt echter zeer moeilijk te zijn om een antistof te produceren die alle belangrijke sulfonamiden in voldoende mate detecteert (Haasnoot *et al.* 2000). Een andere reden waarom deze testen minder gebruikt worden dan verwacht, is de hoge kostprijs en de beperkte houdbaarheid van de reagentia.

Dit type testen werd wel al voorgesteld als hulpmiddel om een groep verwante producten te detecteren na een positieve inhibitietest, om op die manier de juiste chromatografische techniek te selecteren voor een kwantitatieve bevestiging. Vooral in de melkanalyse worden ze tegenwoordig ook veel als enige test gebruikt: daar waar een snel resultaat economisch

Tabel 4. MRL's ($\mu\text{g}/\text{kg}$) van een aantal antibiotica in spierweefsel van kippen of vocht uit dit spierweefsel en LOD's van dezelfde producten met de Premi test.

Antibioticum	MRL voor kip ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) bepaald door DSM (publiciteitsfolder)	Eigen onderzoek:aantal positief bij de gegeven concentraties *
PENICILLINEN			
Amoxicilline	50	5	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 30/30
Ampicilline	50	5	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 30/30
MACROLIDEN			
Tylosine	100	50	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1
Erythromycine	400	100	400 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1
Spiramycine	200	1000	200 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1
Lincomycine	100	100	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1
TETRACYCLINEN			
Tetracycline	100		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/3
Chloortetracycline	100	100	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/3
Oxytetracycline	100	100	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/3; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1
Doxycycline	100	100	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/3; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1
SULFONAMIDEN			
Sulfamethazine (= sulfadimidine)	100	75	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/3; 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/5; 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/5
Sulfadiazine	100	75	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/2
Sulfadimethoxine	100		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 2/2
Sulfachloropyridazine	100		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/2; 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1
Sulfathiazole	100		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1/1; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 2/2
Sulfamerazine	100		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 2/2
QUINOLONEN			
Enrofloxacin	100	>600	
Flumequine	400	>100	400 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1; 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1
ANDERE			
Tiamuline	100		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1
Spectinomycine	300		300 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1; 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0/1

* De methode werd door ons volledig gevalideerd voor de penicillinen, niet voor de andere groepen.

voordeel oplevert, speelt de kostprijs van de analyse een veel kleinere rol.

Ook bij het vlees wordt autocontrole in de slachthuizen belangrijk, alhoewel dit tot nu toe nog niet volledig ingeburgerd is. Zodra dat het geval is, kunnen snelle groeps-specifieke testen een noodzaak worden, zeker wanneer het vlees pas mag verwerkt of vrijgegeven worden na een gunstig resultaat van een screening.

Tetracyclinen kunnen opgespoord worden met een receptortest (Tetrasensor, Unisensor, Luik, België) na een eenvoudige monstervoorbereiding en een incubatie van 10 minuten (Okerman *et al.*, 2004). Voor de penicillinen zijn meerdere handige en snelle testkits in de handel en alhoewel ze ontwikkeld werden voor melk, kunnen sommige ook gebruikt worden voor andere weefsels (Okerman *et al.* 2003). Er zijn ook kits beschikbaar voor tylosine, streptomycine, neomycine en voor de fluoroquinolonen. Kits die één of enkele sulfonamiden opsporen bestaan al langer, doch zoals hoger vermeld vinden ze niet zo veel toepassing omdat geen enkele kit alle in Europa gebruikte sulfonamiden aantoot.

DE THEORIE GETOETST AAN DE PRAKTIJK

Aan de hand van volledig onbekende praktijkmonsters is het niet mogelijk om de waarde van een testmethode te evalueren. Negatieve resultaten worden immers als conform beschouwd en verder niet meer onderzocht, zodat men geen idee heeft over het aantal fout-conforme resultaten. Bij een screening zijn het juist deze fout-conforme resultaten die moeten vermeden worden. Om een methode te evalueren, is dus vlees nodig met bekende antibioticumconcentraties afkomstig van behandelde dieren.

Door de Nederlandse Pluimveeverwerkende Industrie (NEPLUVI) werd een proef op punt gesteld met acht frequent gebruikte antibiotica: twee tetracyclinen (doxycycline en oxytetracycline), twee fluoroquinolonen (enrofloxacin en flumequine), één penicilline (amoxicilline), één sulfonamide gecombineerd met trimethoprim (sulfamethoxazole), één macrolide (tylosine), één aminoglycoside (neomycine) (Schilt *et al.*, 2002). De dieren kregen de geneesmiddelen toegediend gedurende de maximaal voorgeschreven behandelingsduur en werden daarna geslacht: een groep onmiddellijk na de behandeling, een groep na de helft van de voorgeschreven wachttijd en een groep na de volledige

wachttijd (telkens drie dieren per groep). Het vlees werd ingevroren vooraleer het te onderzoeken met ofwel de Premi test, ofwel met zes platen: de FPT aangevuld met een pH6-plaat beënt met *B. cereus* en een pH8-plaat beënt met *E. coli*. De werkelijke residuconcentraties werden bepaald door middel van meer geavanceerde technieken, zoals High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Enkele interessante resultaten werden hier bekomen. Residuconcentraties hoger dan de MRL werden slechts bij vijf van de acht producten aangetroffen, en dit alleen bij dieren die onmiddellijk na het beëindigen van de behandeling geslacht werden (wat in de praktijk niet gebruikelijk is). Deze concentraties bedroegen een veelvoud van de MRL bij enrofloxacin, sulfamethoxazole en doxycycline en waren net boven de MRL bij flumequine en oxytetracycline. Na de helft van de wachttijd werden bij geen enkel dier nog te hoge concentraties aangetroffen. De groepen waren wel klein. Dit illustreert hoe moeilijk het is om *in-curred meat* te bekomen met concentraties die ongeveer gelijk zijn aan de MRL.

Een kritische analyse van de resultaten toont aan dat noch de Premi test noch de zes platen in staat waren om alle niet-conforme resultaten te detecteren. Een combinatie van één plaat met de Premi test was in deze omstandigheden wel voldoende. NEPLUVI besliste echter om alleen de Premi test te gebruiken voor autocontrole in pluimveeslachthuizen. Fout-conforme resultaten zijn in dit geval echter onvermijdelijk voor de quinolonen en volgens onze bevindingen ook voor de tetracyclinen (zie hoger).

Ook uit onze eigen praktijkwaarnemingen is gebleken dat de meeste antibiotica bij kippen zelden aanleiding geven tot aantoonbare residugehalten nadat de voorgeschreven wachtermijn afgelopen is. Belgische pluimveehouders zijn verplicht om alle geneesmiddelen die toegediend werden, te noteren op de begeleidende documenten en die op het slachthuis te laten controleren. Als men ervan uitgaat dat deze gegevens betrouwbaar zijn, kan men de meest geschikte techniek uitkiezen om het vlees te screenen: de Premi test voor penicillinen, macroliden en sulfonamiden, agardiffusietesten voor tetracyclinen en quinolonen. Voor de laatste groepen is er nog de keuze tussen een algemene test met *B. subtilis* als testkiem, of een specifieke plaat voor tetracyclinen met *B. cereus* en één voor quinolonen met *E. coli*.

Tabel 5. Resultaten van screeningstesten uitgevoerd op spierweefsel van kippen die behandeld werden tijdens de mestperiode en geslacht nadat de verplichte wachttermijnen afgelopen zijn. De gegevens over de behandelingen zijn afkomstig uit de begeleidende documenten op het slachthuis.

Behandeld met	KGRS-test	Aantal positief/aantal onderzocht
Niet behandeld	Premi test	0/109
	<i>B. subtilis</i> pH6	0/70
Amoxicilline	Premi test	0/35
Doxycycline	Premi test	0/6
	<i>B. subtilis</i> pH6	0/4
Sulfadiazine	Premi test	0/2
Sulfachloropyridazine	Premi test	0/8
Sulfamethoxazole	Premi test	0/5
Tylosine	Premi test	0/16
Enrofloxacin	<i>B. subtilis</i> pH6	0/3
Multi	<i>E. coli</i> pH6	0/3
	<i>B. subtilis</i> pH6	1/16
Flumequine	<i>E. coli</i> pH6	0/12
	Premi test	0/5
Amoxicilline + sulfonamide	Premi test	0/2
Amoxicilline + tylosine	Premi test	0/2
Amoxicilline + flumequine	<i>B. subtilis</i> pH6	0/2
	Premi test	0/2
Doxycycline + tylosine	<i>B. subtilis</i> pH6	1/3
	Premi test	0/3
Lincomycine + spectinomycine	Premi test	0/9
Flumequine + sulfonamide	<i>B. subtilis</i> pH6	0/3
	Premi test	0/2
	<i>E. coli</i> pH6	0/2
	Premi test	0/1
Amoxicilline + doxycycline + sulfamethoxazole	Premi test	0/1
Tylosine + lincomycine + spectinomycine	Premi test	0/1
Amoxicilline + tylosine + flumequine + doxycycline	<i>B. subtilis</i> pH6	0/1
Amoxicilline + tylosine + lincomycine + spectinomycine	Premi test	0/7

In tabel 5 worden gegevens samengevat over de behandelingen die ons bezorgd werden door pluimveeslachthuizen, en de resultaten van de screenings-testen die door ons uitgevoerd werden bij de onderzochte mestkippen. Bij deze groep behandelde dieren werd amoxicilline het meest gebruikt, gevolgd door tylosine. Een relatief groot aantal dieren werd met meer dan één antibioticum behandeld; dit is een gegeven waarmee rekening moet worden gehouden bij de residu-analyse.

De meeste dieren reageerden conform bij de screeningstesten: er waren slechts twee verdachte resultaten. Bij geen enkele van de uitgevoerde Premi testen werd een vertraging van de kleuromslag vastgesteld. Twee maal werden kleine remzones waargenomen op de plaat beënt met *B. subtilis*. Eén van deze twee dieren werd behandeld met doxycycline en tylosine en het ander met flumequine. Het eerste positief resultaat werd bevestigd op een plaat beënt met *B. cereus*, doch niet met Tetrasensor, de hogervermelde receptortest. De aanwezigheid van doxycyclineresiduen in een lage concentratie, in elk geval veel lager dan de MRL, is een voor de hand liggende verklaring van deze waarneming. Het tweede positief resultaat werd niet bevestigd met de *E. coli* plaat die nochtans gevoeliger is. Het afkeuren van een toom kippen op grond van een positieve screeningstest is zeker niet aangewezen, maar uit onze resultaten blijkt dat dit niet frequent zal gebeuren als de pluimveehouders de voorgeschreven wachttijden in acht nemen.

BESLUIT

Eén enkele test volstaat niet om kippenvlees te screenen op residuen van antibiotica die veel gebruikt worden bij kippen en bovendien residuconcentraties kunnen geven die hoger zijn dan de MRL. Een combinatie van de Premi test en een agardiffusietest met een voedingsbodem pH6 beënt met *B. subtilis*, die beide een minimale monstervoorbereiding vergen, geeft een goede indicatie terwijl de kostprijs toch nog beperkt blijft. De agardiffusietest moet wel overnacht incuberen, maar anderzijds is de uitvoering zo eenvoudig dat één enkele analyst zeer veel monsters kan verwerken. Niet alle relevante antibiotica worden tot op het vereiste niveau gedetecteerd maar de detectielimieten liggen wel in de buurt van de MRL.

Meer zekerheid wordt bekomen als de Premi test samen met twee platen gebruikt wordt: een plaat beënt

met een *E. coli* stam voor de detectie van quinolonen en één beënt met *B. cereus* voor de detectie van tetracyclinen.

Als zeer snelle resultaten nodig zijn, bijvoorbeeld bij de autocontrole in slachterijen of vleesverwerkende bedrijven, kunnen immunologische technieken of receptortechneken worden toegepast, maar deze zijn wel veel duurder.

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 van 18.07.1995*, 20368-20370.
- Anoniem (2000). Weesgeneesmiddelen (orphan drugs) in de diergeneeskunde. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 69, 59-61. Samenvatting van: Urbain B., Laurier L., Falize F., Pastoret P.P. (2000). Les molécules orphelines en médecine vétérinaire. *Annales de Médecine Vétérinaire* 144, 5-11.
- Anoniem (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities* 17.8.2002, L221/8-36.
- Braham R., Black W.D., Claxton J., Yee A.J. (2001). A rapid assay for detecting sulfonamides in tissues of slaughtered animals. *Journal of Food Protection* 64, 1565-1573.
- Ellerbroek L. (1991). Zum mikrobiologischen Nachweis der Chinoloncarbonsäurederivate Enrofloxacin, Ciprofloxacin und Flumequin. *Fleischwirtschaft* 71, 187-189.
- Haasnoot W., Du Pre J., Casemier G., Kemmers-Voncken A., Verhijen R., Jansen B.J.M. (2000). Monoclonal antibodies against a sulfathiazole derivative for the immunochemical detection of sulfonamides. *Food and Agricultural Immunology* 12, 127-138.
- Heitzman (1994) (Editor). *Residues in food producing animals and their products: reference materials and methods*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Koenen-Dierick K., Okerman L., De Zutter L., Degroodt J.M., Van Hoof J., Srebrnik S. (1995). A one-plate microbiological screening 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.
- Korsrud G.O., Boison J.O., Nouws J.F.M., MacNeil J.D. (1998). Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals. *Journal of AOAC International* 81, 21-24.
- Nouws J.F.M., Broex N.J.G., den Hartog J.M.P., Driessens F., Driessen-van Lankveld W.D.M., (1988). De Nieuwe Nederlandse Niertest II. Gevoeligheid van het testsysteem. *Tijdschrift Diergeneeskunde* 113, 247-253.

- Okerman L., De Wasch K., Van Hoof J. (1998a). Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix. *Analyst* 123, 2361-2365.
- Okerman L., Van Hoof J., Debeuckelaere W. (1998b). Evaluation of the European 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., Croubels S., De Baere S., Van Hoof J., De Backer P., De Brabander H. (2001). Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Additives and Contaminants* 18, 385-393.
- Okerman L., De Wasch K., Van Hoof J., Smedts W. (2003). Simultaneous determination of different antibiotic residues in bovine and porcine kidneys by solid-phase fluorescence immunoassay. *Journal of AOAC International* 86, 236-240.

- Okerman L., Croubels S., Cherlet M., De Wasch K., De Backer P., Van Hoof J. (2004). Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues. *Food Additives and Contaminants* 21, 145-153.
- Schilt R., van Heeringen-Overmars N.E.G., Dam P., van der Vlis E. (2002). Onderzoek naar residuen van antibiotica in pluimveevlees – validatie van de Premi® test. TNO rapport V4933 /1/.
- Tsai C.E., Kondo F. (2001). Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents. *Journal of Food Protection* 64, 361-366.
- Valset G., Yndestad M. (1989). Routine microbiological method for the detection of antibiotics or chemotherapeutics in fish etc. Technical note originating from the Directorate of Fisheries, Bergen, Norway and the Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Norway.

Uit het verleden

PAARDEN SNEUVELEN ... OF WORDEN OPGEGETEN

Op de slagvelden sneuvelen tot het midden van de veertiende eeuw meer paarden dan mensen omdat de tot dan gebruikelijke cavaleriecharges het best konden worden gehinderd door doelbewust de paarden te kwetsen of te doden. Willem Brito (+ ca. 1227) evoceerde een slagveld waar 'paarden liggend in het gras hun laatste adem uitbliezen; andere, gewond in de buik, braakten hun ingewanden uit, terwijl anderen neerlagen met gebroken poten'. Vele dieren bezweken tijdens een veldtocht ook door gebrek aan voldoende water of voedsel. Tijdens de raid van de Zwarte Prins in Frankrijk in 1355 drenkte men paarden noodgedwongen met wijn; de gevolgen waren rampzalig. Philippe de Comynes (+ 1511) herinnerde zich niettemin hoe zijn oude knol ooit een emmer wijn had verzwolgen: 'Ik heb hem nooit in zo goede vorm en zo verfrist geweten'. Lange en snelle ritten van meerdere opeenvolgende dagen of overbelasting konden de paarden tot stervens toe uitputten. Ongelukken bij het inschepen of bij het ophijzen of neerlaten langs steile bergflanken kwamen

altijd weer voor. In 1379 verdwenen 19 Engelse schepen met de erin gestouwde paarden in de golven.

Nu en dan richtte in de legers maar ook daar buiten een epidemie een grote sterfte onder de paarden aan. In buitengewone omstandigheden verslond een be-rooide troep, van elke bevoorrading verstoken, zijn eigen rijdieren. Dat was dan wel het laatste redmiddel want de dieren waren duur en dierbaar. Meer nog, er hing rond paardenvlees een heel oud taboe. Het werd in het begin van de kerstening geassocieerd met de offers en begrafenisrituelen van de heidense Germanen. Paus Gregorius III had daarom rond 732 het eten van vlees van wilde en tamme paarden verboden. Later geraakte het verbod in onbruik; in Engeland, waar het taboe ook bekend was, werd het al in de achtste en negende eeuw dikwijls genegeerd.

Uit: van Uytven, R. (2003), *De papegaai van de paus. Mens en dier in de middeleeuwen*. Davidsfonds, Leuven – Waanders, Zwolle, p. 125-126.