



SCREENING ANTIBIOTICARESIDUEN: MOGELIJKHEDEN EN BEPERKINGEN

Wim Reybroeck

14 oktober 2010
VNA

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

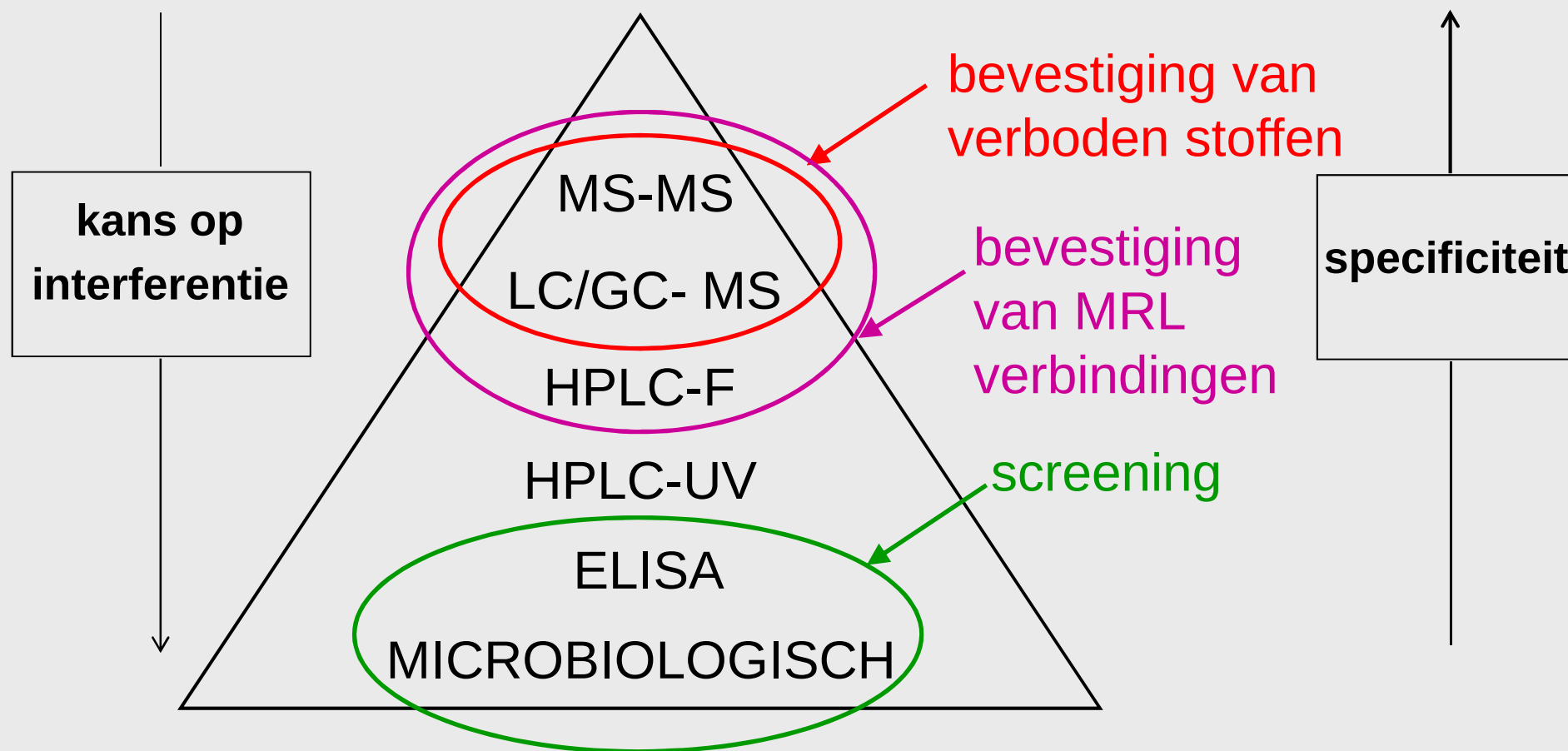
Eenheid Technologie & Voeding

www.ilvo.vlaanderen.be

Beleidsdomein Landbouw en Visserij



ALGEMENE AANPAK VOOR MONITORING VAN RESIDUEN VAN INFECTIEWERENDE STOFFEN



INFECTIEWERENDE STOFFEN (antibiotica & chemotherapeutica)

sulfonamiden

diaminopyrimidine derivaten

penicillines

lincosamiden

cefalosporines

aminoglycosiden

quinolones

andere antibiotica

macroliden

polypeptiden

florfenicol & verwante stoffen

beta-lactamaseremmers

tetracyclines

polymyxines

ansamycines

orthosomycines

pleuromutilinen

ionoforen

WETGEVING INFECTIEWERENDE STOFFEN

- Verordening 37/2010 & aanvullingen

- Tabel 1: toegelaten substanties

MRL (maximale residulimiet) per matrix (melk, spier, ei,...)
in $\mu\text{g/kg}$

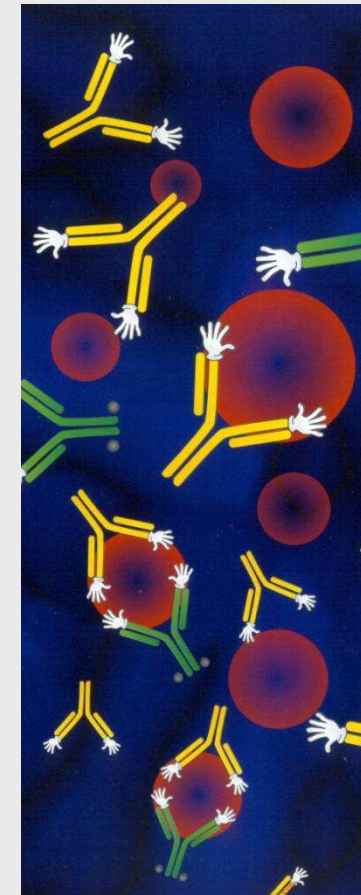
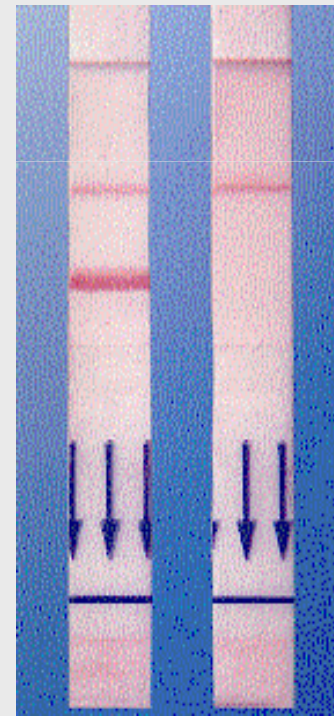
- Tabel 2: verboden substanties

nultolerantie (MRPL (minimum required performance limit))

Substanties zonder MRL: recommended concentration for
detection (CRL)

TYPE SCREENINGSTESTEN

- MICROBIOLOGISCHE INHIBITORTESTEN
- ENZYMATISCHE TESTEN
- RECEPTORTESTEN
- IMMUNOLOGISCHE TESTEN



ENZYMATISCHE, IMMUNOLOGISCHE EN RECEPTORTESTEN

ENZYMATISCHE METHODEN

- PENZYM 100(S) - TG (tetracycline galactosidase) - test

IMMUNOLOGISCHE EN RECEPTORTESTEN

- Dipstick testen:
 - detectie 1 substantie: Charm ROSA Enrofloxacin Test, ...
 - detectie 1 familie: SNAP, β ETA- s.t.a.r., TetraSensor Tissue, SulfaSensor Honey,...
 - detectie 2 families: TwinSensor, SNAP test Combo, Charm ROSA BL-TET, β ETA- s.t.a.r. Combo,...
 - detectie 3 families: TriSensor
- Charm II testen: β -lactam, tetracyclines, aminoglycosiden, macroliden/lincosamiden, sulfonamiden, amfenicolen, novobiocine
- ELISA's:
 - detectie 1 substantie : chlooramfenicol, flumequine, AOZ,...
 - detectie 1 familie: tetracyclines, fluoroquinolones,...

MICROBIOLOGISCHE TESTMETHODEN

Testorganismen

GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS var. *CALIDOLACTIS*

STREPTOCOCCUS SALIVARIUS ssp. *THERMOPHILUS*

BACILLUS CEREUS (tetracyclines)

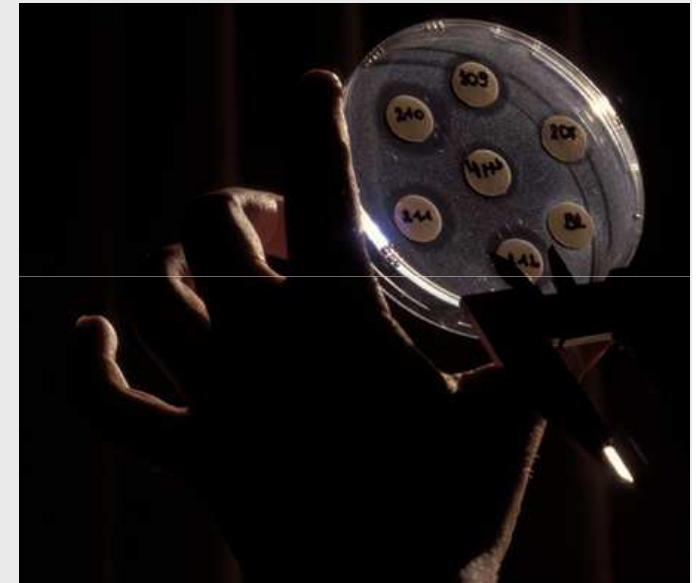
ESCHERICHIA COLI (quinolones)

BACILLUS SUBTILIS

KOCURIA VARIANS

Test criteria

- inhibitie groei testorganisme
- zuurvorming (pH-daling)
- stremming
- activiteit (ATP of enzymatische activiteit)
- lichtproductie (Valio T102)



VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

– Eenvoudig

- Uitvoerbaar door niet-gekwalificeerd personeel,
 - producent (melkveehouder, imker,...)
 - RMO-chauffeur
- Sommige testen uitvoerbaar buiten het laboratorium
 - hoeve
 - kade melkontvangst

– Vereisen weinig apparatuur

- Geen apparatuur en visuele aflezing: Tetrasensor Honey
- Kleine incubator, tips en pipettor vaak in kit ingesloten
- Specifiek afleestoestel of scanner
- Waterbad, broedstoof, spectrofotometer

VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

– Goedkoop

- Geen of kleine investering in apparatuur
- Microbiologische testen: 0,10 € - 3,50 € per test
- Sneltesten: 2 - 7 € per test
- ELISA: 350 - 500 € per 96 testen
- Beperkte loonkosten

– Automatiseerbaar

- Opbrengen monster: pipetteerrobot
- Aflezing: vlakbedscanner voor kleuraflezing ampullen & microtiterplaten
- Incubatie , eindpuntbepaling en aflezing: Delvotest Accelerator
- Automatisatie ELISA: Parallax
- BIACORE: gebaseerd op biosensortechnologie



VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

- Meeste testen steeds voorhanden en uitvoerbaar
- Weinig staal vereist
- Meestal weinig staalvoorbereiding
- Veel stalen tegelijkertijd analyseerbaar

Vb. onderzoek remstoffen in boerderijmelk

- Nederland: QLIP
 - » 4.110.910 monsters onderzocht in 2009
- België: MCC-Vlaanderen & Comité du Lait
 - » 1.374.801 monsters onderzocht in 2009

VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

– Relatief snel

- Microbiologische testen: te traag voor ingangscontrole
 - 2 - 6 uur
 - 16-24 uur: mesofiele kiemen als testorganisme
- Sneltesten:
 - melk: 2 minuten (β eta-s.t.a.r. 1+1) - 8 minuten
 - vlees: 13 - 90 minuten ; honing: 30 - 90 minuten
 - ELISA's: 45 - 90 minuten (+ extra tijd staalvoorbereiding)

Snelheid resultaat soms minder van belang:

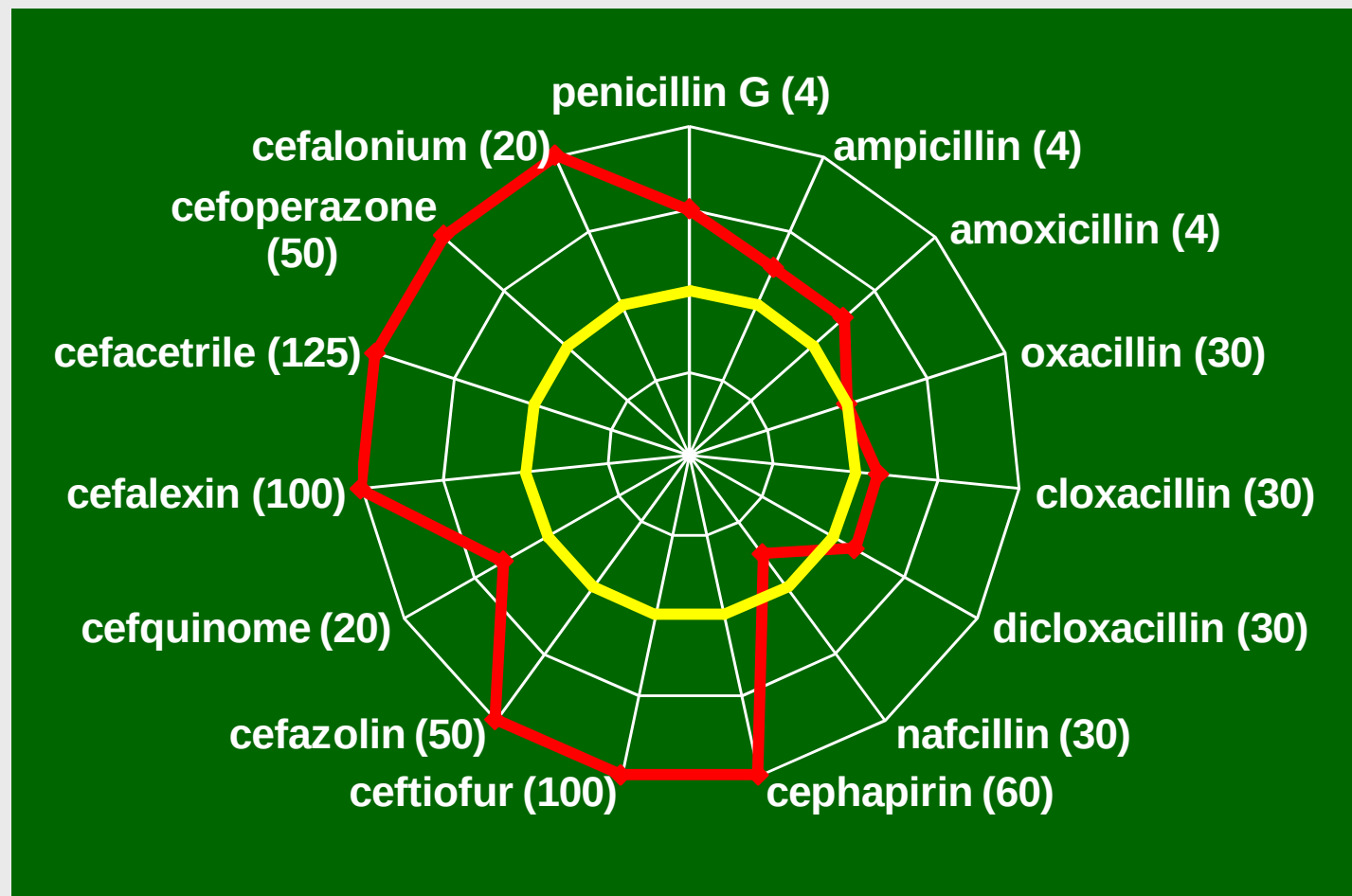
- bij monitoring in het kader van het nationaal residuplan
- analyses van honing, vlees,...

VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

- Breedspectrum gevoeligheid van sommige testen
 - Goede detectiecapaciteit (t.o.v. MRL)
 - Gevoeligheid kan verbeterd worden door opconcentrering staal in staalvoorbereiding
 - Premitest na solventextractie,
 - ELISA's na solventextractie, droogdampresten heropgelost in reconstitutiebuffer
- vb. CAP EIA: 0,1 µg/kg chlooramphenicol opspoorbaar
(ook in melkpoeder → 0,01 µg/kg in gereconstitueerde vorm)

VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

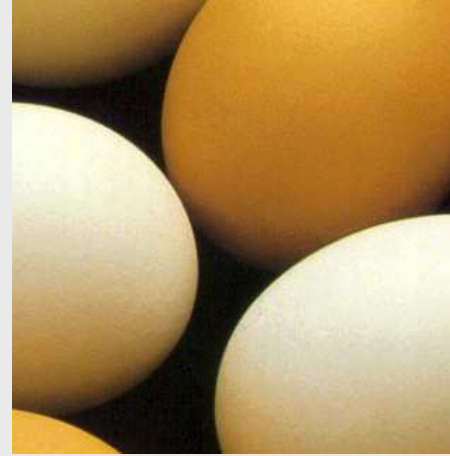
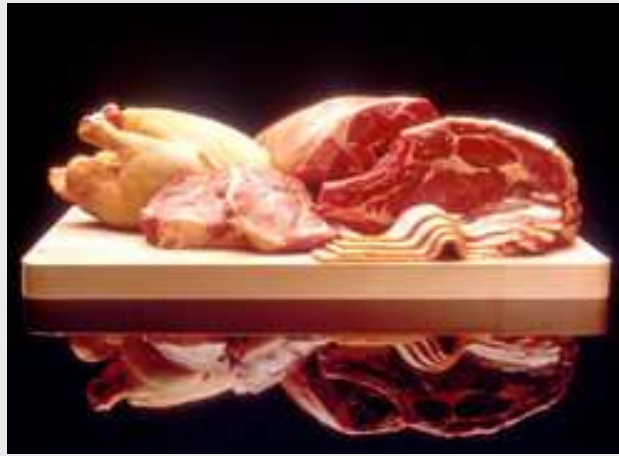
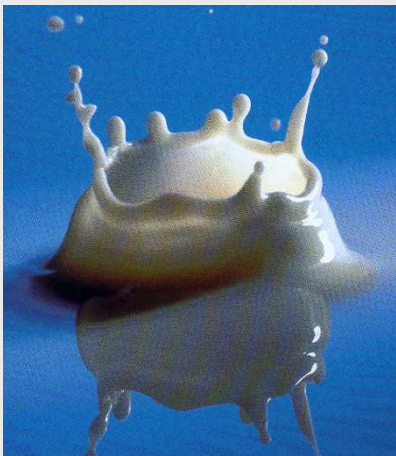
Voorbeeld goede testgevoeligheid: CHARM MRL (ROSA)



binnencirkel = 2 MRL, cirkel 2 = **MRL**, cirkel 3 = 0,5 MRL, buitencirkel = 0,25 MRL

VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

- Steeds meer sneltesten die tegelijkertijd meerdere antibioticafamilies detecteren
- Sommige receptortesten en ELISA's inzetbaar op meerdere matrices



VOORDELEN SCREENINGSTESTEN

- Sneltesten inzetbaar op kritisch controlepunt (HACCP)
- Resultaat vóór verwerking
- Directe sensibilisering

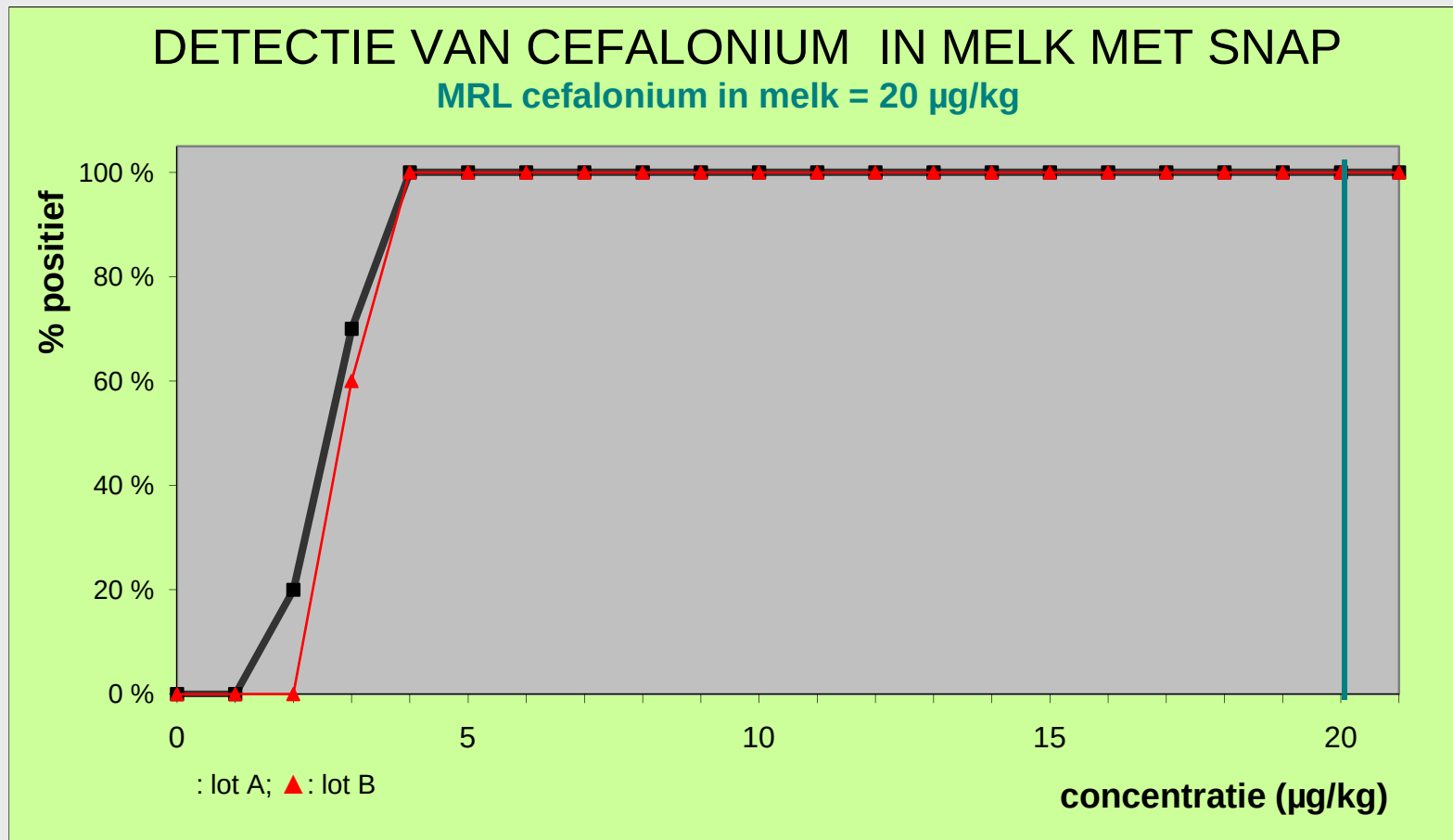


NADELEN SCREENINGSTESTEN

- Meestal geen identificatie remstof
 - Uitzondering: kits voor bepaling CAP, AOZ, AMOZ, ...
 - Wel groepsspecifieke testen
 - Indirecte groepsindicatie: penicillinase (β -lactam), PABA (sulfa's), CaCl_2 & NaCl (tetracyclines),...
- Geen kwantitatief resultaat: MRL overschreden?
 - Diameter remmingszone is evenredig met logaritme van de concentratie (indien substantie gekend)
 - ELISA's wel gebied met semi-kwantitatief resultaat

NADELEN SCREENINGSTESTEN

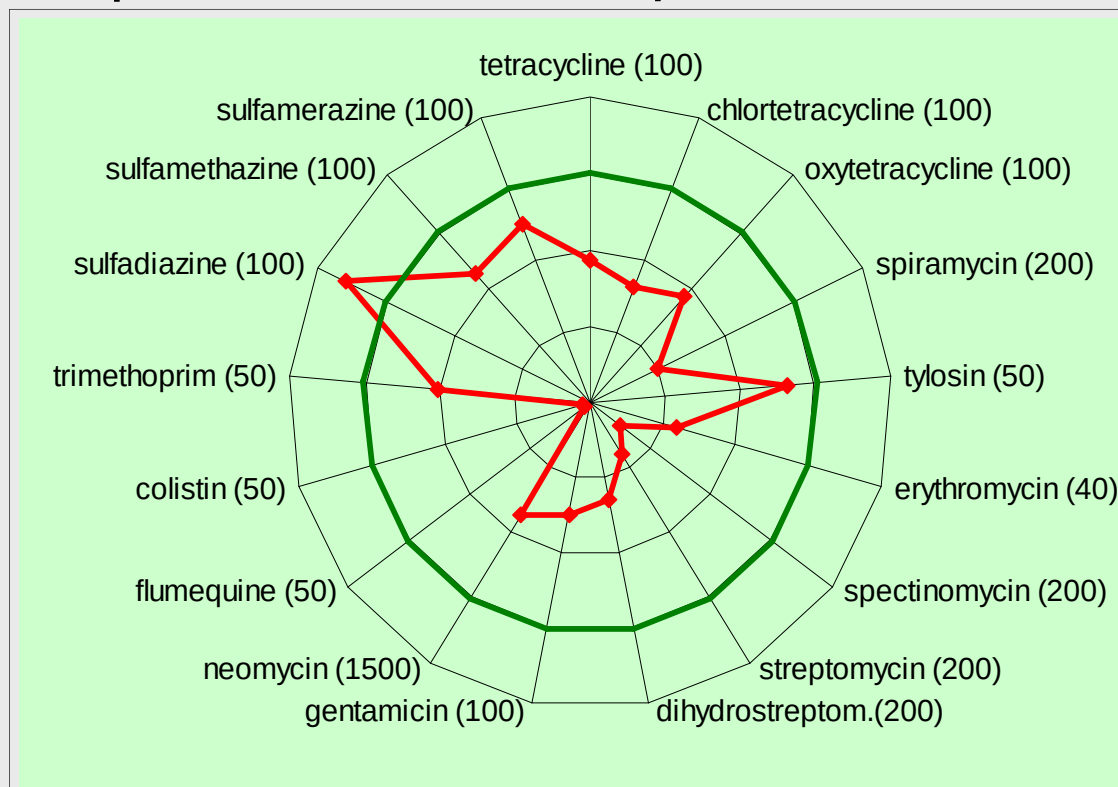
- Testgevoeligheid niet steeds in de buurt MRL



NADELEN SCREENINGSTESTEN

– Testgevoeligheid niet steeds in de buurt MRL

Vb: Copan Milk Test: niet- β -lactamverbindingen



binnencirkel = 10 MRL, cirkel 2 = 2 MRL, cirkel 3 = **MRL**, buitencirkel = 0,5 MRL

NADELEN SCREENINGSTESTEN

– Kans op valspositive resultaten

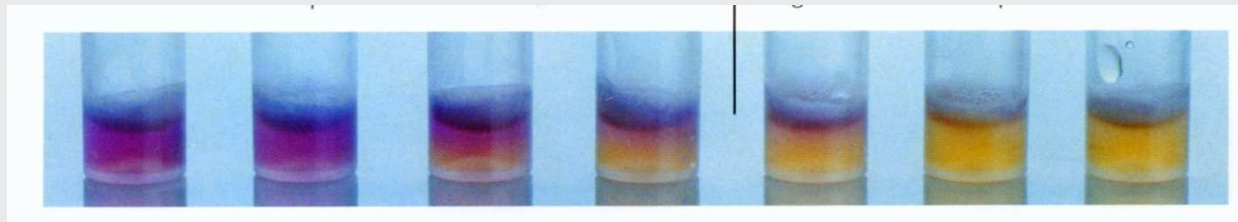
- Natuurlijke bacteriegroeiremmende stoffen
 - lactoferrine, lysozyme, bacteriocines,...
- Matrixeffecten
 - verhoogde pH melk, melk van schaap, geit, paard
 - zouten in vis of garnalen
 - honingdauwhoning
 - eiwitten: niet specifieke binding

Opmerking: voor screeningstest zijn valspositieve resultaten minder problematisch dan valsnegatieve resultaten.

Soms heranalyse verdachte stalen na opzuivering extract over kolom

NADELEN SCREENINGSTESTEN

- Soms geen detectie van de metabolieten
- Geen methoden voor bepaalde antibiotica
 - AMOZ in melk, ADH en SEM in vlees en melk
 - bepaalde aminoglycosiden,...
- Geen testen of methoden voor bepaalde matrices
- Lotverschillen
- Houdbaarheid microbiologische testen
- Dubieuze kleuraflezing



ONDERZOEK VOEDERS

Gafner (1999, J. AOAC Int. 82(1): 1-8)

- Extractie: 25 g voeder + 50 ml fosfaatbuffer pH 6.5
 - Schudden, centrifugatie
 - Helder supernatans gebruikt in testen
- Bodems:
 - 5 ml agar in Petriplaat
 - Filterschijfjes van 12.7 mm



ONDERZOEK VOEDERS GAFNER

5 Test organismen:

Bacillus cereus ATCC11778

Bacillus subtilis ATCC 6633

Micrococcus luteus ATCC 9341

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

Corynebacterium xerosis NCTC 9755



ONDERZOEK VOEDERS

VVR – 5 platentest

Extractie: 10 g voeder + 90 ml methanol/water (1+1) opl.

- Schudden, centrifugatie
- Helder supernatans gebruikt in testen

- *Bacillus subtilis*
 - in Test agar pH 6.0
 - in Test agar pH 8.0
 - In Test agar pH 7.2 (+ trimethoprim)
- *Micrococcus luteus*
 - in Test agar pH 6.0
 - in Test agar pH 8.0



ONDERZOEK VOEDERS T&V-ILVO

- Extractie
- Gebruik immuno assay of receptortest
- Charm II test Feed & Grain ($\neq$ families)
- β eta-s.t.a.r. (penicillines & cefalosporines)
- TetraSensor
- Fluoroquinolones EIA

Extractie afh. type voeder, steeds standaardadditie,
valspositieve resultaten niet uitgesloten, meestal zeer
gevoelig

ONDERZOEK VOEDERS

Groeibevorderaars

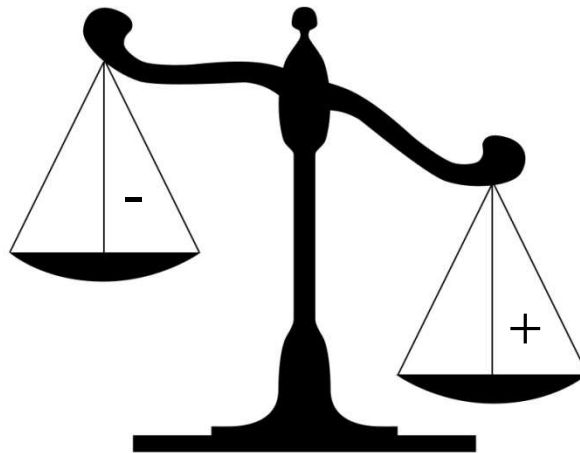
- bacitracine, tylosine, spiramycine, virginiamycine, olaquinox

Multi-AGP ELISA 5151 AGPM (Euro-Proxima)

- bacitracine, tylosine, spiramycine : ook ELISA kit beschikbaar voor elke verbinding apart

BESLUIT

Het gebruik van microbiologische, immunologische of receptortesten blijft de meest economische aanpak om levensmiddelen te screenen op de aanwezigheid van antibioticaresiduen om zo de technologische verwerkbaarheid en de voedselveiligheid te verzekeren.





Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

Dank voor uw aandacht

Wim Reybroeck

14 Oktober 2010
VNA

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

Eenheid Technologie & Voeding

www.ilvo.vlaanderen.be

Beleidsdomein Landbouw en Visserij

