Project 303.7900

Voorbereidende en controlewerkzaamheden voor de RVV

Rapport 87.44 juni 1987

DE EVALUATIE VAN DE NIEUWE NEDERLANDSE NIERTEST.

drs J.M.P. den Hartog, N.J.G. Broex en dr J.F.M. Nouws

Goedgekeurd door: ir G.S. Roosje

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL

8744

VERZENDLIJST

INTERN:
directeur
sectorhoofden
coördinator dierlijke produkten
ir H. Stegeman
drs M.M.L. Aerts
projectbeheer
circulatie
bibliotheek

EXTERN:
directie Veterinaire Dienst
directie Rijksdienst voor de Keuring van Vee en Vlees
directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden
directie Landbouwkundig Onderzoek
directie RVV-kringen
Veterinaire Hoofdinspektie
directie Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne
directie Rijks Keuringsdienst van Waren
Faculteit Diergeneeskunde, Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke Oorsprong
  afd. Hygiëne
  afd. Levensmiddelenchemie
Produktschap Vee en Vlees, ing. J.N.M. v. Beurden
Produktschap voor Veevoeder, dhr J. den Hartog
secretariaat ORA, drs M.H. Vertommen
hoofden RVV-kringlaboratoria
drs P. v.d. Berg (RVV-Centraal)
dr G. v.d. Bosch (CHV-Veghel)
drs W.F.G.L. Droppers (VD)
dr B.H.W. Engel (RIVM)
mw drs N. Haagsma (VVDO)
dhr F.M. v. Leusden (RIVM)
dr ing. H. Mol (RKvW-Utrecht)
mw dr R.H.M. Julicher (VKA)
ir D. Oostendorp (PR)
drs A. Ottevanger (VD)
drs F.H. Pluimers (RVV-centraal)
drs J.F.M. Smeets (VVDO)
dr J.M.A. Snijders (VVDO)
drs H. Verburg (VHI)
drs J. de Vries (RVV)
dr J.F. Westendorp (RVV-Centraal)

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

INHOUD

	blz
SAMENVATTING	II
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL	1
3 METHODEN	6
4 RESULTATEN	7
5 DISCUSSIE	10
6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	14
7 REFERENTIES	16
8 TABELLEN	18
BIJLAGEN	

SAMENVATTING

De Nieuwe Nederlandse Niertest (NNNT), een éénplaatmethode, werd onlangs geïntroduceerd als alternatief voor de Nederlandse Niertest (NNT).
Dit voor de praktijk bestemde testsysteem moet enerzijds geschikt zijn om in het kader van de concept-EEG-referentiemethoden (EGT) op voldoende gevoelig niveau de antibiotica/chemotherapeutica residuen te screenen. Anderzijds moet het testsysteem betrekkelijk eenvoudig zijn om dit in de praktijk op grote schaal toe te passen.
Bij de evaluatie van het testsysteem werd bij een in vitro onderzoek de absolute gevoeligheid van de testplaat van de NNNT vergeleken met de testplaten van de EGT en de NNT.
Hieruit blijkt onder andere dat met deze testplaat in tegenstelling tot die van de NNT, de sulfonamiden kunnen worden aangetoond.
De praktijkomstandigheden werden bij een in vivo onderzoek nagebootst. De NNNT, de NNT en EGT werden hier vergelijkend beoordeeld. Vastgesteld kon worden dat wanneer het resultaat van de EGT positief of verdacht is, dit ook geldt voor de NNNT. De NNT scoort in die gevallen vaak negatief.
Tijdens het gehele onderzoek werd gebruik gemaakt van referentiemonsters. Een dergelijke aanpak zal onderdeel gaan uitmaken van NNNT.
Experimenten werden uitgevoerd om de reproduceerbaarheid onder andere in gevallen van een uitgesteld onderzoek en onderzoek in herkeuringsgevallen te meten.
Reproduceerbare waarden kunnen verkregen worden, bij het inzetten van het onderzoek, tot 3 dagen na het slachten, indien de nier, tot het moment van de feitelijke keuring in het kapsel blijft.
Wanneer bij het eerste onderzoek, materiaal onder geconditioneerde omstandigheden wordt bewaard, zijn in het kader van een eventuele herkeuring, tot twee weken na het eerste onderzoek reproduceerbare waarden te krijgen.
Vals-positieve uitslagen konden door identificatie-onderzoek worden uitgesloten. Ook de in dit onderzoek betrokken tranquillizers hebben hierop geen invloed.

Een eerder ingesteld inventariserend onderzoek met de NNNT op het aantonen van antibiotica/chemotherapeutica residuen in nieren werd vervolgd en uitgebreid naar verschillende soorten slachtdieren. Ook hier bleek een duidelijke toename van het aantal positieve uitslagen ten opzichte van de resultaten met de NNT.
Dit onderzoek is uitgevoerd door de RVV kringlaboratoria in Assen, Apeldoorn, Oss, het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie van het RIVM in nauwe samenwerking met het RVV kringlaboratorium Nijmegen en het RIKILT. Hierdoor werd onder andere een brede ervaring met de NNNT opgedaan. Een gedetailleerde beschrijving van de NNNT, zoals deze voor de keuringspraktijk wordt voorgesteld, is opgenomen in bijlage 1.

1 INLEIDING

Uit voorgaand onderzoek en uit literatuurgegevens bleek dat de in de Vleeskeuringswet beschreven antibiotica-chemotherapeuticatest, de Nederlandse Niertest (NNT), niet voldeed aan de in discussie zijnde EEG-norm als screeningsmethode voor het opsporen van residuen van antibacteriële middelen in slachtdieren (1,2,3,4,5).
Recentelijk werd een alternatieve methode, een éénplaatsysteem, de zogenaamde Nieuwe Nederlandse Niertest (NNNT) ontwikkeld en geïntroduceerd. De toepasbaarheid was reeds uitgetest door enkele kringlaboratoria van de Rijksdienst voor keuring van Vee en Vlees en gerapporteerd (10).
Naar aanleiding van dit eerste rapport is, in overleg met het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, aanvullend onderzoek verricht met speciale aandacht voor:

- de in vitro gevoeligheid van de testplaten aan de NNT, de NNNT en de EGT
- de in vivo gevoeligheid van de NNT, de NNNT en de EGT-systemen
- het maximale residu-niveau in vlees bij negatieve NNNT- en EGT-bevindingen
- de referentiemonsters
- het inventariserend onderzoek
- de identificatie van de bacteriegroeiremmende stoffen
- de reproduceerbaarheid bij uitgesteld onderzoek en herkeuringsonderzoek
- invloed van het gebruik van tranquillizers.

Aan dit onderzoek werd meegewerkt door de kringlaboratoria van kring 2, 5, 6 en 13 en het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie van het RIVM.

2 MATERIAAL

2.1 De in vitro gevoeligheid van de testplaten van de NNT, de NNNT en de EGT

Om een inzicht te krijgen in de absolute gevoeligheid van de bij dit onderzoek betrokken testplaten, zijn experimenten uitgevoerd met in de praktijk veel gebruikte antimicrobiële farmaca.

Van deze in gedestilleerd water opgeloste preparaten werden standaardreeksen, met opklimmende rekenkundige concentraties, gemaakt (b.v. voor ampicilline 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,32, 0,625, 1,25 en 2,5 µg/ml). De papierschijfjes werden op de testplaten gelegd en van iedere verdunning werd in duplo 80 µl op een filtreerschijfje gepipetteerd. De testplaten werden geïncubeerd bij de temperatuur en tijd, voorgeschreven in het voorschrift van de betreffende methode. De remzones werden gemeten. De laagste concentratie waarbij nog een bacteriegroeiremmende werking (minimaal 1 mm rondom het papierschijfje) waarneembaar was, werd als detectieniveau aangegeven.

2.2 In vivo gevoeligheid van de NNT, de NNNT en de EGT-systemen

Om een inzicht te krijgen in de in vivo gevoeligheid van de hier gebruikte testsystemen is onderzoek verricht met nieren en vlees van met de diverse preparaten (bijlage 2) behandelde varkens. Opgemerkt dient te worden dat de onderzoekmatrices voor de NNT, de NNNT, de EGT respectievelijk het niervocht uit de schors, het nierbekkenvocht en het vlees zijn en dus in tegenstelling tot de matrices in het in vitro onderzoek, overeenstemmen met de praktijksituatie.

De varkens werden eenmalig intramusculair behandeld en afhankelijk van het gebruikte preparaat 5 tot 96 uur na behandeling geslacht. Onmiddellijk na het slachten zijn de nieren en de middenriffen, in duplo, bemonsterd. Tot het moment van onderzoek, is het onderzoekmateriaal gekoeld bewaard. Het onderzoek is parallel uitgevoerd door het laboratorium van RVV-kring 6 en de afdeling Microbiologie van het RIKILT.

De NNT werd uitgevoerd door papierschijfjes in de nierschors, de NNNT door papierschijfjes in het nierbekken te impregneren. De EGT werd als volgt uitgevoerd: de middenriffen werden van hun vliezen ontdaan, ingevroren gedurende 3 uur bij -20°C. Met een kurkboor werden stukjes vlees met een diameter van 9 mm uitgeponst. Deze uitgeponste stukjes werden in duplo op de betreffende voedingsbodems gelegd.

2.3 Maximale residu-niveaus in vlees bij negatieve NNNT en EGT-bevindingen

Om een inzicht te krijgen in de maximale residu-niveaus die nog kunnen voorkomen bij negatieve bevindingen met de NNNT en de EGT werd kwantitatief onderzoek verricht.

Hiertoe werden in vlees van alle behandelde dieren met behulp van de agar diffusie methode (4) kwantitatieve bepalingen uitgevoerd. Voor de kwantificering van het betreffende preparaat is gebruik gemaakt van het meest gevoelige beschikbare testsysteem.

Met absoluut antibiotica-vrij varkensvlees werd van een preparaat opgelost in gedestilleerd water een standaardreeks gemaakt. Het vlees werd daartoe gemalen, gemengd met de standaardoplossing, gehomogeniseerd en gecentrifugeerd (4).

Het supernatant werd in cupjes in de voedingsbodem gebracht. De te onderzoeken vleesmonsters werden eveneens gemalen, gehomogeniseerd met gedestilleerd water, gecentrifugeerd en het supernatant in de cupjes van de voedingsbodem gebracht. Wat betreft sulfonamiden en chloramfenicol zijn HPLC bepalingsmethoden toegepast.

Op deze wijze verkregen kwantitatieve waarden werden gerelateerd aan de kwalitatieve resultaten verkregen met de NNNT en de EGT. Indien de residu-concentraties beneden het detectieniveau van de gebruikte kwantitatieve testmethoden lagen, is voor wat de waarden met de EGT betreft, ook gebruik gemaakt van de resultaten uit eerder door Nouws verricht onderzoek (4,6,7,8,9).

2.4 Referentiemonsters

Als onderdeel van de kwaliteitsborging werden tijdens dit onderzoek de reeds eerder ontwikkelde standaardcontroleschijfjes gebruikt (10). Op papierschijfjes (Schleicher en Schull, diameter 12,7 mm) werd 50 µl van de standaardoplossingen van tylosine, oxytetracycline en sulfadimidine gepipetteerd, zodanig dat de respectievelijke hoeveelheden van 2 µg, 5 µg en 0,5 µg per schijfje werden verkregen. Deze standaardcontroleschijfjes werden gevriesdroogd en per charge naar de deelnemende laboratoria verstuurd. Tot op het moment van onderzoek werden deze controleschijfjes bij ca. 4°C bewaard. Bij ieder onderzoek werden behalve de papierschijfjes met nierbekkenvocht ook de standaardcontroleschijfjes op de testplaten gelegd.

De diameters van de heldere zone werden gemeten. Voor de beoordeling van de reproduceerbaarheid van de test werden de remzones, verkregen met de standaardcontroleschijfjes, geïnterpreteerd.
De bovengenoemde antibiotica werden gekozen omdat hiermee onder andere indicaties over juiste pH-instelling (tylosine, oxytetracycline en sulfadimidine) en trimethoprim toevoeging (sulfadimidine) worden verkregen.
Van de remzones van de standaardcontroleschijfjes zijn de gemiddelden en standaardafwijkingen berekend.

2.5 Inventariserend onderzoek
Om de test op zijn praktische consequenties te toetsen werd het reeds eerder uitgevoerde inventariserend onderzoek (10) uitgebreid op een aantal kringlaboratoria (categorie "aanhouders") en op het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie van het RIVM en het kringlaboratorium van RVV 5 (categorie "1/2% onderzoek").
Werden bij het eerste inventariserend onderzoek (10) voornamelijk varkens onderzocht, bij dit onderzoek zijn naast varkens zoveel mogelijk andere diersoorten onderzocht.
In totaal werden ca. 3000 nieren van de verschillende diersoorten onderzocht met de NNT en de NNNT. Van deze 3000 nieren zijn bovendien 87 nieren eveneens met de EGT onderzocht.

2.5.1 Categorie "aanhouders"
Door de kringlaboratoria werden de dieren van de categorie "aanhouders", die voor bacteriologisch- en antibiotica-onderzoek in onderzoek genomen waren, onderzocht omdat bij deze dieren de kans op positieve bevindingen groot is en er dus binnen redelijk snelle termijn gegevens beschikbaar komen. Het onderzoekmateriaal is via het op de kringen gangbare systeem van gekoeld transport, naar de laboratoria vervoerd.
De NNT en de NNNT werden simultaan uitgevoerd.

2.5.2 Categorie "1/2% onderzoek"
Door het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie van het RIVM is, in het kader van een surveillance, onderzoek verricht met nieren van dieren uit het zogenaamde "1/2% onderzoek".

Deze nieren zijn ad random genomen bij verschillende slachterijen in het land, gekoeld verstuurd naar het RIVM en binnen 24 uur na slachten in onderzoek genomen. Ook RVV kring 5 heeft onderzoek verricht aan nieren uit deze categorie.
Met het reeds eerder uitgevoerde onderzoek (10) zijn nu meer dan 8000 nieren in het kader van dit vergelijkend onderzoek onderzocht.

2.6 Identificatie van bacteriegroeiremmende stoffen
Van een aantal (> 100) met de NNNT positief beoordeelde nieren (remming > 20 mm) werd de bacteriegroeiremmende stof geïdentificeerd met behulp van Hoogspanningselektroforese of, indien het vermoeden bestond dat het een sulfapreparaat betrof, met de Para-amino-benzoëzuur test bevestigd (PABA-test: 25 µl 0,1% Para-amino-benzoëzuuroplossing opdruppelen op geïmpregneerd papierschijfje of in cupje met onderzoekmateriaal).
De positieve nieren werden door het kringlaboratorium diepgevroren en in koelboxen naar het RIKILT verstuurd. Tot het moment van onderzoek werden de nieren diepgevroren bewaard.

2.7 Reproduceerbaarheid
In de praktijksituatie is het gewenst dat reproduceerbare waarden verkregen worden indien het onderzoek niet direct (b.v. in het weekend) of in het kader van herkeuring moet worden uitgevoerd.

2.7.1 Uitgesteld onderzoek
Om te onderzoeken binnen welke termijn, na het slachten, een antibioticumonderzoek dient te worden ingezet, is vergelijkend onderzoek verricht met de tweede karkasnier.
Indien het eerste onderzoek positief bleek is de tweede, nog aan het karkas vastzittende nier onderzocht. Bij RVV kring 2 was deze van het kapsel ontdaan, bij RVV kring 6 werd de nier in het kapsel gelaten.

2.7.2 Keuring-herkeuring
Zoals reeds eerder gerapporteerd (10) is de reproduceerbaarheid met een reeds geopende en vervolgens diepgevroren nier slecht. Dit is een ongewenste situatie omdat hierdoor de eventuele herkeuringsresultaten negatief worden beïnvloed.

Onderzoek is verricht naar de mogelijkheid om op het moment van het eerste onderzoek, duplo papierschijfjes in de nier te impregneren en deze in afgesloten plastic doosjes bij -20°C te bewaren in afwachting van een eventuele herkeuring.

2.8 Invloed van het gebruik van tranquillizers
Ter beoordeling van eventuele invloeden op de NNNT door tranquillizers (vals-positieve bevindingen) werden varkens met 5 verschillende tranquillizers geïnjecteerd en 2 of 5 uur na injectie geslacht. Onmiddellijk na het slachten werden de nieren bemonsterd en in onderzoek genomen.

3 METHODEN

3.1 Bepaling van de in vitro gevoeligheid van de testplaten van de NNT, de NNNT en de EGT (zie tekst).

3.2 Bepaling van de in vivo gevoeligheid van de NNT, de NNNT en de EGT-systemen (4).

3.3 Kwantitatief antibiotica-onderzoek in vlees (4).

3.4 Instructie gebruik standaardcontroleschijfjes (10).

3.5 Nederlandse Niertest (2).

3.6 EEG-vierplatentest (2).

3.7 Nieuwe Nederlandse Niertest (10).

3.8 Identificatie met behulp van Hoogspanningselektroforese (2,10).

3.9 Bevestiging van Sulfapreparaten met behulp van de PABA-test.

3.10 Analytisch-chemisch onderzoek (intern analysevoorschrift RVV Kring 6).

4 RESULTATEN

4.1 In vitro gevoeligheid van de testplaten van de NNT, de NNNT en de EGT

In tabel 1 wordt de in vitro gevoeligheid van een aantal preparaten, opgelost in gedestilleerd water, op de testplaten van de NNT, de NNNT en de EGT weergegeven.
In de tabel is de laagste concentratie vermeld waarbij een bacteriegroeiremmende werking van minimaal 1 mm rondom het papierschijfje meetbaar is. Voor de EGT is hierbij aangegeven welke testplaat het meest gevoelig is.
Duidelijk blijkt de ongevoeligheid van de NNT ten opzichte van sulfonamiden en aminoglycosiden. De NNNT-plaat is voor sulfonamiden gevoeliger dan de NNT- en EGT-plaat.
Wat betreft de tetracyclinen, aminoglycosiden en macroliden neemt de NNNT een middenpositie in.

4.2 De in vivo gevoeligheid van de NNT, de NNNT en EGT-systemen

In tabel 2a en 2b is de in vivo traceerbaarheid van een aantal preparaten, nadat deze bij varkens intramusculair ingespoten zijn, met de NNT, de NNNT en de EGT, weergegeven.
Tevens is de absolute residu-concentratie in het vlees vastgesteld. Deze concentraties werden microbiologisch dan wel analytisch-chemisch bepaald.
Uit de tabellen blijkt dat indien de EGT positief is, dit in het algemeen correspondeert met een positieve, of verdachte, bevinding met de NNNT.
In een aantal gevallen waarin de NNNT positief of verdacht was, was de EGT negatief (ampicilline, amoxycilline, oxytetracycline, chlooramfenicol, spiramycine, erythromycine, tylosine en de sulfapreparaten).
Ten opzichte van de NNT kan gezegd worden dat, daar waar de NNT positief was, dit ook geldt voor de NNNT. Een groot aantal positieve met de NNNT is echter negatief met de NNT (oxytetracycline, chlo mfenicol, spiramycine, erythromycine en de sulfapreparaten).
Dit blijkt ook uit tabel 3 waarin die kwantitatieve residu-concentraties van beide testsystemen in de matrices, waarbij een positief testresultaat verkregen wordt, zijn samengevat.

4.3 Maximale residu-niveaus in vlees bij negatieve NNNT en EGT

Bij een negatieve NNNT ligt het residu-niveau in het spierweefsel beneden, of benadert (oxytetracycline en erythromycine) het detectieniveau van de EGT. Deze residu-niveaus staan vermeld in tabel 4.

4.4 Referentiemonsters

Tabel 5 geeft een overzicht van de gemiddelde diameters en de standaardafwijkingen van de standaardcontroleschijfjes per preparaat. In totaal zijn de remzones van ca. 300 schijfjes verwerkt.

Per type controleschijfje dienen de grenzen en de te accepteren spreiding aangegeven te worden.

Een spreiding van $\pm$ 2 mm voor tylosine en oxytetracycline en voor sulfadimidine $\pm$ 3 mm is mogelijk.

4.5 Inventariserend onderzoek

4.5.1 Categorie "aanhouders"

In tabel 6 is aangegeven het aantal positieve bevindingen met de NNT en de NNNT per diersoort.

Duidelijk blijkt het hogere percentage positieve dieren (alle diersoorten) met de NNNT. Gemiddeld 5,3% positief met de NNNT, in tegenstelling tot 2,2% met de NNT.

In tabel 7 zijn de gegevens per kring gerubriceerd. Hieruit blijkt dat er tussen de kringen verschillen in percentage positieve bevindingen zijn. Een verklaring hiervoor is wellicht de aard van het te onderzoeken materiaal dat per kring sterk kan wisselen. Een kring heeft b.v. voornamelijk transportdoden (lage frequentie antibiotica-positieven) terwijl een andere kring meer "wrakke en zieke dieren" voor onderzoek krijgt aangeboden. Een andere verklaring zou kunnen zijn, de mogelijk bestaande disuniformiteit in het hanteren van de indicaties tot het in onderzoek nemen van afwijkende dieren.

4.5.2 Categorie "1/2% onderzoek"

Door het RIVM, laboratorium voor Parasitologie en Mycologie, is in het kader van een surveillance, onderzoek verricht aan de categorie dieren uit het zogenaamde "1/2% onderzoek".

Vergelijkend onderzoek is uitgevoerd met de NNT, de NNNT en de EGT.

Door de RVV kring 5 is het "1/2% onderzoek" uitgevoerd met de NNT en de NNNT.
De resultaten zijn in tabel 8 verwerkt.
Met de NNNT zijn bij varkens positieve uitslagen gevonden. Met de EGT en de NNT waren de bevindingen negatief.

4.6 Identificatie van de bacteriegroeiremmende stoffen
In ca. 100 nieren, waarmee een positieve NNNT werd verkregen, is aansluitend de bacteriegroeiremmende stof door middel van HVE-onderzoek of PABA-test geïdentificeerd.
In tabel 9 is een overzicht gegeven van de geïdentificeerde stoffen en in welke mate deze werden geconstateerd. Voornamelijk penicilline-, aminoglycoside- en tetracyclineresiduen werden aangetoond.
Een aantal stoffen van de groep "overige antibiotica en/of chemotherapeutica" is niet geïdentificeerd. De oorzaak hiervan moet gezocht worden in de vermoedelijk opeenvolgende behandeling met een combinatie van antibioticapreparaten. Het patroon van de remzone was niet vergelijkbaar met een bekende standaard.

4.7 Reproduceerbaarheid

4.7.1 Uitgesteld onderzoek
In dit onderzoek is de tweede karkasnier onderzocht om aan te geven binnen welke termijn na het slachten een dergelijk onderzoek moet worden ingezet.
De gegevens van dit onderzoek zijn verwerkt in tabel 10 en 11. Hieruit blijkt, onder niet geconditioneerde omstandigheden (tabel 10), een achteruitgang van de remzone van gemiddeld 3 mm. Deze achteruitgang is statistisch significant van nul afwijkend (t-toest $\alpha < 0{,}001$). Wordt de beslissinggrens van 20 mm gehanteerd bij positief bevinden van de test, dan is er geen verschil tussen het eerste onderzoek en het onderzoek uitgevoerd met de 3 dagen gekoelde nier.
Bij geconditioneerde omstandigheden (onder andere nier in het kapsel laten tot het moment van de feitelijke keuring) is er geen statistisch significant verschil aangetoond (tabel 11).

4.7.2 Keuring-herkeuring

In tabel 12 en 13 zijn de resultaten van het effect van invriezen van geïmpregneerde papierschijfjes weergegeven bij de respectievelijke categorieën varkens, kalveren en paarden.

Het verzoek tot herkeuring wordt in het algemeen gedaan binnen een termijn van 72 uur. Uit dit onderzoek blijkt dat er geen statistisch significant verschil is opgetreden binnen 2 weken na het eerste onderzoek. Hetgeen ook blijkt bij nieren van de categorie "experimenteel" (tabel 13).

Bij instabiele antibiotica, zoals ampicilline en amoxycilline, kan de inactivatie voorkomen worden door middel van invriezen van extra geïmpregneerde filtreerschijfjes.

4.8 Invloed van tranquillizers op de testsystemen

Geen van de onderzochte tranquillizers gaf een vals-positief resultaat met de NNT, NNNT en de EGT.

5 DISCUSSIE

De NNNT dient beoordeeld te worden als een alternatief voor de NNT en als een screeningstest, waarmee op voldoende gevoelig niveau, in relatie tot de EEG-referentiemethode, residuen kunnen worden opgespoord. Daar de EGT bewerkelijk is dient gestreefd te worden naar de eenvoud van een testsysteem die kenmerkend is voor de NNT.

In de keuringspraktijk moet een toe te passen testsysteem voldoende reproduceerbaar zijn om b.v. in geval van een uitgesteld onderzoek in het weekend of in het kader van een herkeuringsonderzoek goede resultaten te geven.

Vervolgens moet de analysemethode geen of slechts zeer weinig vals-positieve (in feite ook geen vals-negatieve) resultaten opleveren.

Daarnaast wordt steeds vaker de eis gesteld dat het onderzoek voldoet aan zekere kwaliteitsvoorwaarden, opdat de resultaten voldoende betrouwbaar geacht kunnen worden.

5.1 Gevoeligheid

Bij de in vitro experimenten wordt de maximale gevoeligheid van de testplaat bepaald, dit in tegenstelling tot de in vivo experimenten waarbij het testsysteem beoordeeld wordt.

De testplaat van de NNNT is zeer gevoelig voor de sulfonamiden. De NNT toont deze chemotherapeutica niet aan.
De gevoeligheid van de NNNT-plaat is voor de tetracyclinen beter vergeleken met de plaat voor de NNT, maar minder gevoelig dan een van de platen van de EGT.
In een vergelijking met de EGT-platen kan gesteld worden dat de gevoeligheid voor neomycine, kanamycine, dihydrostreptomycine, gentamycine, spiramycine en tylosine voor de NNNT-plaat minder is, zoals uit dit onderzoek is gebleken.
Het gaat evenwel bij de beoordeling van de NNNT niet alleen om de gevoeligheid van de testplaat, doch om de gevoeligheid van het testsysteem. De traceerbaarheid voor residuen in slachtdieren wordt bepaald door allerlei facetten van dit testsysteem. Het systeem is een combinatie van testplaat, matrix, uitvoeringswijze en beoordelingsafspraken.
Bij de keuze van b.v. de matrix moet rekening worden gehouden met de verdeling van het diergeneesmiddel in het lichaam en de te verwachten validiteit (vals-positieve-, vals-negatieve uitslagen) voor de methode. Uit het in vivo onderzoek blijkt b.v. dat met de NNNT, die nierbekkenvocht als onderzoeksmatrix heeft, op een gevoeliger wijze ampicilline residuen opgespoord kunnen worden dan met de EGT, hetgeen in tegenstelling is met de in vitro resultaten. Bekend is dat in het nierbekkenvocht de ampicillineconcentraties hoger zijn dan in het vlees. Dit geldt overigens voor alle antibiotica en chemotherapeutica. Dit is de verklaring waarom de NNNT geëxtrapoleerd naar de residu-niveaus in vlees gevoeliger is dan de EGT. Met andere woorden, bij een negatieve NNNT is de residu-concentratie in het vlees lager dan met de EGT (tabel 4).

5.2 Reproduceerbaarheid bij praktische toepassing van de NNNT

5.2.1 Uitgesteld onderzoek

In geval van een uitgesteld onderzoek is het van groot belang dat de nier in het kapsel gekoeld bewaard blijft tot het moment van de feitelijke keuring. Indien deze condities niet in acht worden genomen moet met een achteruitgang van de activiteit van met name de penicillinederivaten gerekend worden.

Het uitgesteld onderzoek, onder geconditioneerde omstandigheden, is uitgevoerd door het RVV kringlaboratorium 6. Op dit laboratorium wordt de kleinste spreiding met de standaardcontroleschijfjes bereikt (tabel 5). Dit laboratorium heeft in het algemeen meer ervaring met dit type onderzoek dan de andere laboratoria.
De resultaten van het hier gerapporteerde onderzoek komen overeen met de resultaten die eerder werden verkregen (10). In dat onderzoek was slechts één bijzondere slachtplaats betrokken, hetgeen een "uniforme" benadering mogelijk maakt.
Bij het onderzoek op het RVV laboratorium van kring 2 waren meerdere bijzondere slachtplaatsen betrokken en de condities waren vooraf niet gestandaardiseerd.
Verwacht mag worden dat op andere laboratoria een goede reproduceerbaarheid bereikt kan worden, hetgeen door middel van vervolgonderzoek zal moeten worden aangetoond.

5.2.2 Keuring-herkeuring

Om voorbereid te zijn op een verzoek tot herkeuring, moet hiermee aan het begin van het eerste onderzoek reeds rekening worden gehouden.
Ook het hier beschreven onderzoek heeft aangetoond dat indien bij aanvang van het eerste onderzoek een tweede set papierschijfjes wordt geïmpregneerd en bewaard bij -20°C, reproduceerbare uitslagen worden verkregen bij een eventuele herkeuring.
Uit eerder onderzoek (10) was gebleken, dat bij remzones beneden 20 mm de kans op vals-positieve resultaten niet uitgesloten kon worden, aangezien de identificatie van de bacteriegroeiremmende stof niet altijd mogelijk was. Als oorzaken van het niet kunnen identificeren werden aangegeven: de achteruitgang in antimicrobiële activiteit van vooral penicillinederivaten tijdens de opslag, het tekort schieten in de identificatie van sulfonamiden en de verandering in residuconcentratie in het nierbakken na het ontdooien van de ingevroren nier (soms en verdunningseffekt ten gevolge van dripsap).
Gericht op de keurings/herkeuringsproblematiek zijn er twee mogelijkheden:

- de beslisgrens bij het keuringsonderzoek te leggen bij 20 mm en voor het herkeuringsonderzoek de grens van 15 mm te hanteren,

- de beslisgrens van 20 mm toepassen voor zowel het keurings- als het herkeuringsresultaat, en door middel van een instructie aangeven dat het keuringsresultaat als positief beschouwd dient te worden bij 23 mm.

In het eerste geval hanteert men als het ware twee normen. In het laatste geval impliceert dit een hogere tolerantie. Echter deze hogere norm ligt met uitzondering wellicht voor erythromycine beneden die van de EGT.
Vals-positieve resultaten werden in dit, evenals in het vorige (10) onderzoek, niet vastgesteld. Dit geldt tevens voor die gevallen waarbij tranquillizers werden gebruikt.

5.3 Identificatie

De identificatie met behulp van Hoogspanningselektroforese is nagenoeg altijd mogelijk. Alleen in de gevallen waarin residuen van sulfapreparaten voorkomen schiet de HVE te kort. Een groeps-identificatie met behulp van para-amino-benzoëzuur kan dan worden toegepast. Indien een nadere identificatie van het sulfapreparaat noodzakelijk is, zijn hiertoe analytisch-chemische methoden beschikbaar. Uit dit onderzoek is duidelijk gebleken dat een beslissingsgrens van 20 mm, als remzone bij de NNNT, een reële grens is. Bij alle positieve gevallen blijken bij bevestigingsonderzoek, residuen van diergeneesmiddelen aangetoond te kunnen worden.
HVE als bevestigingsmethode in het keuringsonderzoek op te nemen is niet wenselijk. Van te veel residuen van diergeneesmiddelen is het remzonepatroon, onder andere door aanwezigheid van residuen van combinatiepreparaten, niet geheel bekend. Duidelijk is wel dat bij de beslissingsgrens van 20 mm geen vals-positieve uitslagen voorkomen.
De in het eerste rapport gemaakte suggestie om de HVE te optimaliseren zodat hiermee ook residuen van sulfapreparaten geïdentificeerd kunnen worden heeft niet tot een goed resultaat geleid. Echter een groepsidentificatie met para-amino-benzoëzuur is eenvoudiger en wellicht voldoende.

5.4 Inventariserend onderzoek

Bij de categorie "aanhouders" zal met de NNNT een hoger aantal positieven (5,3%) gescoord worden dan met de NNT (2,2%).
De gegevens komen overeen met de uit eerder onderzoek verkregen resultaten (10).
Eenzelfde tendens valt waar te nemen bij de categorie "1/2% onderzoek".
Van deze categorie zijn tijdens dit onderzoek in vergelijking met eerder onderzoek een beperkt aantal slachtdieren onderzocht.
In dat onderzoek (10) werd 1,3% van de dieren positief bevonden.
De gegevens als zodanig geïnterpreteerd doen vermoeden dat het aantal afkeuringen op grond van een positieve NNNT zal toenemen. Dit hoeft echter niet het geval te zijn.
De bedrijfsfase "weet" dat het spectrum van de NNT beperkt is en zal waarschijnlijk met de therapeutische behandeling hiermee rekening houden.
Indien de NNNT wordt ingevoerd mag verwacht worden dat men meer terughoudend en zorgvuldiger zal zijn in het gebruik van dierbehandelingsmiddelen (b.v. gemedicineerde voeders) en de voorgeschreven wachttermijn beter in acht zal nemen.

5.5 Referentiemonsters

Het toepassen van referentiemonsters heeft twee aantrekkelijke aspecten. Enerzijds kunnen hiermee de onderzoekresultaten van de verschillende laboratoria op hun betrouwbaarheid worden getoetst. Anderzijds kan aangesloten worden bij de wens de toekomstige praktijkresultaten voldoende betrouwbaar te doen zijn.
Afspraken moeten worden gemaakt over de haalbaar geachte spreiding in remzone rond de controleschijfjes. Hierbij moet er naar gestreefd worden om op termijn deze spreiding zo mogelijk te verkleinen.
Een spreiding van $\pm$ 2mm en $\pm$ 3 mm wordt voor respectievelijk tylosine, oxytetracycline en sulfadimidine haalbaar geacht.
Gezien het betrekkelijk arbeidsintensieve aspect, voortvloeiend uit het in te voeren kwaliteitsborgingssysteem, dient overwogen te worden dit onderzoek routinematig op grote platen (30-30 cm) uit te voeren.

6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

- De NNNT (bijlage 1) is een eenvoudig (vergelijkbaar met de NNT) testsysteem met een aanmerkelijk breder gevoeligheidsspectrum dan de NNT (sulfonamiden, tetracyclinen en chlooramfenicol). De NNNT kan de huidige NNT vervangen in het onderzoekingsregulatief.
- Het detectieniveau van de NNNT is geëxtrapoleerd voor de residuniveaus in vlees gevoeliger dan de EGT. De NNNT kan als screeningsmethode worden toegepast. Tevens kan de NNNT voorgesteld worden als een referentiemethode in het kader van een uit te voeren nationaal plan.
- Bij het hanteren van een 10 ppb niveau voor chlooramfenicol in vlees, wordt deze verbinding met de NNNT onvoldoende gevoelig gescreend. De NNNT is echter gevoeliger dan de NNT en EGT.
  Voor chlooramfenicol, moet in geval van een 10 ppb tolerantie, een andere analysemethode worden toegepast.
- Vals-positieve resultaten worden tot nu toe met de NNNT niet gesignaleerd. Ook het gebruik van tranquillizers heeft hierop geen invloed.
- Het aantal positieve bevindingen met de NNNT is hoger dan de bevinding met de NNT. Voor de categorie "aanbouders" zijn percentages gemeten van respectievelijk 5,3 en 2,2%. Voor de categorie "1/2% onderzoek" werden eerder reeds waarden voor respectievelijk 1,3 en 0% vastgesteld.
- Een discussie zal moeten leiden tot een besluit over de te hanteren normen en beslisgrenzen, bij het toepassen van de NNNT, opdat een haalbare reproduceerbaarheid onder praktijkomstandigheden mogelijk is.
- Het antibioticumonderzoek dient binnen 72 uur na het slachten te worden ingezet. Voorwaarde is dat de nier tot het moment waarop de feitelijke keuringshandelingen worden verricht in het nierkapsel gekoeld (4°C) wordt bewaard.
- Een goede reproduceerbaarheid bij herkeuring wordt verkregen door middel van gelijktijdig impregneren van duplo papierschijfjes, bij aanvang van het eerste onderzoek en deze in afgesloten cupjes tot de eventuele herkeuring bij -20°C te bewaren.
- Als referentiemonsters kunnen standaardcontroleschijfjes worden toegepast. Hiermee is een interne controle en een landelijke niveaubewaking mogelijk.
  Afspraken moeten gemaakt worden over de spreiding van diameters van de remzones voor elke type standaardcontroleschijfje.

7 REFERENTIES

1. Bogaerts, R., and F. Wolf. A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. Fleischwirtschaft 1980, 60, 667-675.

2. Engel, H.W.B., F.M. van Leusden and J.F.M. Nouws. Evaluation of the European Communities (EC) four-plate method for the detection of residues of antimicrobial drugs in slaughtered animals. In: Antimicrobials and agriculture.Butterworths, London, p. 491-499.

3. Engel, H.W.B., F.M. van Leusden, M.P.M. Hoffstee, L.M. Wijnands, M.J.G. Schoenmakers en L.H. de Blaauw. Evaluatie van de voorspellende waarde, specificiteit en hanteerbaarheid van een aantal eenvoudige testsystemen ten opzichte van het "EG-vierplatensysteem" met betrekking tot de detectie van residuen van antibacteriële stoffen in slachtdieren. RIVM-rapport 842026001, 1985.

4. Nouws, J.F.M. Tissue distribution and residues of some antimicrobial drugs in normal and emergency-slaughtered ruminants. Thesis Utrecht 1978.

5. Nouws, J.F.M. Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. Arch. Lebensmittelhyg. 1981, 32, 103-110.

6. Nouws, J.F.M. and G. Ziv. Tissue distribution and residues of beta-lactam antibiotics in normal dairy cows. Tijdschr. Diergeneeskunde 102, 1173-1186 (1979).

7. Nouws, J.F.M. and G. Ziv. Preslaughter withdrawal times for drugs in dairy cows. J. Vet. Pharmacol. Therap., 1, 47-56, 1978.

8. Nouws, J.F.M. Niet gepubliceerde gegevens.

9. Nouws, J.F.M. and G.Ziv. Tissue distribution and residues of aminoglycoside antibiotics in normal dairy cows. Tijdschr. Diergeneesk. 102, 1187-1196 (1977).

10. Hartog, J.M.P. den, J.F.M. Nouws en N.J.G. Broex
Vergelijkend onderzoek naar de toepasbaarheid van de Nieuwe Nederlandse Niertest voor het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in nieren van slachtdieren. RIKILT-rapport 86.92.

11. Bruikbaarheid van de Quick-Card voor het opsporen van chloramfenicolresiduen in slachtdieren. Rapport ..... (in bewerking).

DANKWOORD

Op deze plaats past een woord van dank aan de hoofden en medewerkers die, op de diverse laboratoria, aan dit onderzoek hebben meegewerkt. In het bijzonder de kringlaboratoria van RVV kring 2, -kring 5, -kring 6, -kring 13, het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie van het RIVM en de afdeling microbiologie van het RIKILT.
Bij de evaluatie van de gegevens zijn intensieve contacten geweest met drs H.W.B. Engel en de heer F.M. van Leusden van het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie van het RIVM, waarvoor eveneens veel waardering mag worden uitgesproken.

Tabel 1: In vitro gevoeligheid van de testplaten van de NNT, de NNNT en de EGT.

Antibioticum	Detectie-niveau in µg of IE/ml aqua dest.		
	NNT	NNNT	EGT
Penicilline	0,05	0,06	0,04 (4)
Ampicilline	0,02	0,16	0,02 (4)
Amoxycilline	0,02	0,16	0,02 (4)
Chlooramfenicol	8	8	8 (4)
Oxytetracycline	2	0,6	0,3 (1)
Doxycycline	2	0,3	0,10 (1)
Neomycine	50	20	0,2 (2)
Kanamycine	100	25	0,8 (2)
Dihydrostreptomycine	50	50	0,5 (2)
Gentamycine	50	10	0,2 (2)
Spiramycine	100	5	0,3 (4)
Tylosine	5	2	0,3 (4)
Erythromycine	3	2	0,08 (4)
Sulfadimidine	nt	0,3	5 (3)
Sulfadimethoxine	nt	0,08	3 (3)
Sulfamethoxazole	nt	0,08	3 (3)
Sulfadiazine	nt	0,08	3 (3)
Sulfadoxine	nt	0,08	3 (3)
Dapsone	nt	0,05	0,5 (3)

nt = niet traceerbaar

Tussen haakjes staat vermeld welke testplaat uit de EGT het meest gevoelig is.

(1) B. subtilis BGA pH 6,0
(2) B. subtilis BGA pH 8,0
(3) Trimethoprimplaat pH 7,2
(4) M. luteus pH 8,0

Tabel 2a: Relatie tussen de uitslag van de NNT, de NNNT, de EGT en de residu-concentratie in het vlees.

Diersoort: varkens

Antibioticum	Dosering mg/kg	Uren na inject.	NNT	NNNT	EGT	Residu-conc. in vlees µg of IE/g
Ampicilline	5	70	+	+	-	<0,01 *
		48	+/-	+	-	<0,01 *
Amoxycilline	15	72	-	-/+	-	<0,005 *
		48	+/-	±/-	-	<0,005 *
		22	+	±	-	0,007 *
Proc.Pen.G. + Neomycine	1000 IE 5	70	-	-	-	<0,003 P * <0,2 N *
		48	-	-	-	<0,003 P * <0,2 N *
		22	-	-	-	<0,003 P * <0,2 N *
Proc.Pen.G. + Kanamycine	1000 IE 3	70	-	-	-	<0,003 P * <0,3 K *
		48	-	-	-	<0,003 P * <0,3 K *
		22	-	-	-	<0,003 P * <0,3 K *
Oxytetracycline	20	72	-	±/-	-	0,066 *
	10	48	-	-	-	0,060 *
	10	24	-	+	+	0,51 *
Spiramycine	20	48	-	-	-	<0,2 *
		24	-	-	-	0,26 *
		17	-	+/-	-	0,86 *
		5	-	-	-	<0,2 *
Erythromycine	20	48	-	-	-	<0,05 *
		24	-	-	-	<0,05 *
		17	-	-	-	<0,05 *
		7	-	±/-	+	0,23 *
Tylosine	40	48	-	+/-	-	<0,3 *
		24	+/-	+	-	0,60 *
		17	-	+	+/-	0,92 *
		7	+	+	+	1,74 *

* Microbiologisch bepaald met behulp van agar-diffusie.

NNT remzone < 15 mm = -; > 15 mm = +
NNNT remzone < 15 mm = -; tussen 15 en 20 mm = ±
remzone > 20 mm = +
EGT remzone (gemeten vanaf weefselrand) < 1 mm = -;
tussen 1 en 2 mm = ±; > 2 mm = +
Bij niet gelijkluidende uitslagen tussen RVV 6 en RIKILT zijn de resultaten van beide laboratoria aangegeven.
P = Penicilline, N = Neomycine, K = Kanamycine

Tabel 2b: Relatie tussen de uitslag van de NNT, de NNNT, de EGT en de residu-concentratie in het vlees.

Diersoort: varkens

Antibioticum	Dosering mg/kg	Uren na inject.	NNT	NNNT	EGT	Residu-concentratie in vlees µg of IE/g			
Chlooramfenicol	50	72	-	-	-	0,136			*
		48	-	-	-	0,002			*
		20	-	-/+	-	0,204			*
		5	-	+	-	1,54			*
						Sulfa	N4	TMP	
Sulfadimidine	20	72	-	+	-	0,26	0,10		*
		48	-	+/±	-	0,32	0,10		*
		17	-	+	-	6,3	0,39		*
		7	-	+	-	5,9	0,33		*
Sulfadimethoxine	20	96	-	-	-	0,05	0,03	<0,1	*
+ Trimethoprim	4	48	-	+/±	-	0,105	0,06	<0,1	*
		17	-	+	-	2,09	0,30	0,29	*
		7	-	+	-/±	1,56	0,29		*
Sulfadoxine	20	48	-	±/-	-	0,05	0,02	<0,1	*
+ Trimethoprim	4	24	-	±	-	0,99	0,12	<0,1	*
		17	-	+	+	3,30	0,69	0,62	*
		7	-	+	+	2,51	0,23	0,32	*
Sulfadiazine	40	24	-	+/±	-	0,13	<0,03	0,23	*
+ Trimethoprim	8	17	-	+	-	0,60	<0,03	0,32	*
		7	-	+	+/±	2,31	0,45	0,36	*

* analytisch-chemisch bepaald

NNT remzone < 15 mm = -; > 15 mm = +

NNNT remzone < 15 mm = -; tussen 15 en 20 mm = ±
remzone > 20 mm = +

EGT remzone (gemeten vanaf weefselrand) 1 mm = -;
tussen 1 en 2 mm = ±; > 2 mm = +

Bij niet overeenkomende resultaten tussen RVV 6 en RIKILT zijn deze van beide laboratoria aangegeven.

N4 = N4-acetyl metaboliet van de betreffende sulfa; hydroxymetabolieten werden niet aangetoond; TMP = trimethoprim

Tabel 3: In vivo gevoeligheid van de NNT en de NNNT.

Diersoort: varkens

Antibioticum	NNT	NNNT
	Detectie-niveau	
	µg of IE/g schors	µg of IE/g nierbekken
Penicilline	>0,1 *	>0,1
Ampicilline	>0,05	>0,3
Amoxycilline	>0,05	>0,3
Chlooramfenicol	nt	>10
Oxytetracycline	>8	>1
Doxycycline	>8	>0,3
Neomycine	>50 *	>50
Kanamycine	>100 **	>50
Dihydrostreptomycine	>100 **	>100
Spiramycine	>100 **	>8
Tylosine	>8	>4
Erythromycine	>5	>2
Sulfadimidine	nt	>1
Sulfadimethoxine	nt	>0,3
Sulfadiazine	nt	>0,3
Sulfadoxine	nt	>0,3

nt = niet traceerbaar.

* Literatuurgegevens (5,6,7,9).
** Geschatte waarden op basis van in vitro gegevens verkregen met weefselhomogenaten.

Tabel 4: Maximale residu-niveaus in vlees bij een negatieve NNNT en een negatieve EGT.

Diersoort: varkens

Antibioticum	µg of IE/g spierweefsel	
	NNNT	EGT
Penicilline	<0,01	<0,1 *
Ampicilline	<0,01	<0,05 *
Amoxycilline	<0,01	<0,05 *
Chlooramfenicol	<1	<10 **
Oxytetracycline	<0,3	<0,3
Doxycycline	<0,04	<0,04 *
Neomycine	<0,2	<0,5 **
Kanamycine	<0,3	<1 **
Dihydrostreptomycine	<0,3	<0,5 **
Spiramycine	<1	<1
Tylosine	<0,3	<0,6
Erythromycine	<0,3	<0,2
Sulfadimidine	<0,2	<10 **
Sulfadimethoxine	<0,1	<3 **
Sulfadiazine	<0,1	<3
Sulfadoxine	<0,1	<2

* Literatuurgegevens (5,6,7,9).
** Geschatte waarden op basis van in vitro gegevens verkregen met weefselhomogenaten.

Tabel 5: Gemiddelden en de standaardafwijkingen van gemeten remzones van standaardcontroleschijfjes (n = 300) als onderdeel van een kwaliteitsborgingssysteem.

Laboratorium	Controle 1 NNNT in mm's	Controle 2 NNNT in mm's	Controle 3 NNNT in mm's
Kring 2	28 ± 1,6	23 ± 3,0	32 ± 2,8
Kring 5	29 ± 1,0	28 ± 2,3	33 ± 1,3
Kring 6	27 ± 0,8	28 ± 0,8	28 ± 1,3
Kring 13	28 ± 1,5	27 ± 2,7	31 ± 2,0

Controle 1 = 2 µg tylosine
Controle 2 = 0,5 µg sulfadimidine
Controle 3 = 5 µg oxytetracycline

Tabel 6: Overzicht vergelijkend onderzoek tussen de NNT en de NNNT.

Categorie "aanhouders"

Diersoort	Aantal	Positief NNT*	Positief NNNT*
Varkens	1939	42 (2,2%)	96 (5,0%)
Runderen	511	12 (2,3%)	29 (5,7%)
Kalveren	202	4 (2,0%)	15 (7,4%)
Schapen	103	4 (3,9%)	6 (6,2%)
Paarden	4	0	0
TOTAAL	2759	62 (2,2%)	146 (5,3%)

* NNT positief bij remzone van > 15 mm
** NNNT positief bij remzone van > 20 mm.

Tabel 7: Overzicht vergelijkend onderzoek tussen de NNT en de NNNT, uitgesplitst naar kringlaboratoria.

Categorie "aanhouders"

Kring	Diersoort	Aantal	Positief NNT*	Positief NNNT**
2	varkens	686	15 (2,2%)	23 (3,4%)
5	varkens	573	10 (1,7%)	24 (4,2%)
6	varkens	235	7 (5,2%)	23 (9,8%)
13	varkens	445	10 (2,2%)	26 (5,8%)
2	runderen	61	2 (3,5%)	6 (9,8%)
5	runderen	375	7 (1,9%)	19 (5,1%)
6	runderen	39	3 (7,7%)	4(10,3%)
13	runderen	36	-	1 (2,8%)
2	kalveren	13	-	1 (8%)
5	kalveren	172	4 (2,3%)	13 (7,6%)
6	kalveren	7	-	-
13	kalveren	10	-	1 (1%)
2	schapen	35	1 (3%)	1 (3%)
5	schapen	46	1 (2%)	4 (9%)
6	schapen	11	-	-
13	schapen	11	1 (9%)	1 (9%)
2	paarden	-	-	-
5	paarden	-	-	-
6	paarden	-	-	-
13	paarden	4	-	-

* NNT positief bij remzone van > 15 mm
** NNNT positief bij remzone van > 20 mm

Tabel 8: Overzicht vergelijkend onderzoek tussen de NNT, de NNNT en de EGT.

Categorie "1/2% onderzoek"

Diersoort	Aantal	Positief NNT remming > 15 mm	Positief NNNT remming > 20 mm	Positief EGT*
RIVM				
Varkens	38	0	2	0
Runderen	30	0	0	0
Kalveren	19	0	0	0
RVV 5				
Varkens	283	0	2	
Runderen	36	0	0	
Kalveren	342	0	0	

* De EGT is alleen toegepast door het laboratorium voor Parasitologie en Mycologie, van het RIVM.

Tabel 9: Overzicht van de bacteriegroeiremmende stoffen bij positieve bevindingen met de NNNT. n = 103

Preparaat	Aantal	Procenten
Penicilline evt. in combinatie met een ander preparaat	19	18,5%
Aminoglycosiden evt. in combinatie met een ander preparaat	36	35,0%
Tetracycline evt. in combinatie met een ander preparaat	19	18,5%
Macroliden	3	3%
Sulfapreparaat	2	2%
Cocktail, drie of meerdere antibiotica	10	9,7%
Overige antibiotica en/of chemotherapeutica	14	13,6%

Het identificatie-onderzoek is uitgevoerd met behulp van Hoogspannings-elektroforese (HVE) of de PABA-test.

Tabel 10: Effect van het uitgesteld onderzoek (nier inzetten 3-6 dagen na slachten) op de reproduceerbaarheid van de NNNT.
n = 36 (bewaarcondities niet gestandaardiseerd).

RVV 2

Diersoort	Eerste onderzoek diameter remmingszone in mm	Uitgesteld onderzoek (2de karkasnier) diameter remmingszone in mm	Aantal dagen tussen eerste en uitgesteld onderzoek
Varken	28	24	3
Varken	29	24	3
Varken	36	24	3
Varken	32	30	3
Varken	20	21	3
Varken	20	19	3
Varken	28	24	3
Varken	29	26	3
Varken	24	24	3
Varken	32	26	3
Varken	30	25	3
Varken	31	24	3
Varken	28	24	4
Varken	27	25	4
Varken	35	30	4
Varken	16	15	5
Varken	22	20	5
Varken	30	29	5
Varken	21	20	5
Varken	20	19	5
Varken	37	33	5
Varken	35	31	5
Varken	30	29	6
Varken	24	23	6
Varken	25	25	6
Varken	26	22	6
Varken	26	25	6
Rund	22	21	3
Rund	40	32	3
Rund	39	35	5
Rund	41	40	6
Rund	20	20	6
Schaap	29	26	4
Schaap	18	15	5

Tabel 11: Effect van het uitgesteld onderzoek (nier inzetten 3-6 dagen na slachten) op de reproduceerbaarheid van de NNNT. n = 18 (bewaarcondities gestandaardiseerd*).

RVV 6

Diersoort	Eerste onderzoek diameter remmingszone in mm	Uitgesteld onderzoek (2de karkasnier) diameter remmingszone in mm	Aantal dagen tussen eerste en uitgesteld onderzoek
Varken	38	37	3
Varken	41	39	3
Varken	22	25	3
Varken	23	26	3
Varken	36	37	3
Varken	24	26	3
Varken	17	17	3
Varken	26	25	3
Varken	17	<15	3
Varken	32	31	3
Varken	33	26	3
Varken	41	35	3
Varken	38	32	3
Varken	21	20	3
Varken	17	17	4
Varken	32	32	4
Varken	32	28	4
Kalf	25	26	3

* - nier in het kapsel tot het beslissingsmoment voor het al of niet in onderzoek nemen
- gekoeld bewaren

Tabel 12: Effect van invriezen (14 dagen bij -20°C) van met nierbekkenvocht geïmpregneerde papierschijfjes op de reproduceerbaarheid van de NNNT.

Categorie "aanhouders"

RVV 13

Nummer	Diersoort	NNNT diameter van de remzones in mm	Herhaling NNNT ca. 14 dg na invriezen diameter van de remzones in mm
1	varken	24	22
2	varken	28	27
3	varken	26	28
4	varken	22	23
5	varken	20	24
6	varken	29	27
7	varken	22	20
8	kalf	17	<15
9	varken	16	<15
10	varken	19	16
11	varken	22	15
12	paard	21	17
13	varken	21	20
14	varken	29	33
GEMIDDELD		23	22

Tabel 13: Effect van invriezen (ca. 14 dagen bij -20°C) van met nierbekkenvocht geïmpregneerde papierschijfjes op de reproduceerbaarheid van de NNNT.

Categorie "experimenteel"
RIKILT

Nummer	Diersoort	NNNT diameter van de remzones in mm	Herhaling NNNT ca. 14 dg na invriezen diameter van de remzones in mm
3	varken	41	33
9	varken	16	19
33	varken	37	30
34	varken	33	29
35	varken	29	25
37	varken	24	21
38	varken	19	17
44	varken	20	16
69	varken	19	17
70	varken	17	17
72	varken	21	16
73	varken	17	18
78	varken	16	19
82	varken	27	29
84	varken	25	24
85	varken	30	28
87	varken	31	32
88	varken	26	29
89	varken	30	24
91	varken	27	31
92	varken	27	26
94	varken	31	29
GEMIDDELD		26	24

Voorschrift voor uitvoering van de Nieuwe Nederlandse Niertest

1. Doel

De Nieuwe Nederlandse Niertest (NNNT) is een testsysteem voor het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in nierbekkenvocht van slachtdieren met behulp van Bacillus subtilis BGA als test organisme.
Dit testsysteem kan worden toegepast als screeningsmethode in het kader van de EEG-referentiemethode (EGT). Tevens kan de NNNT toegepast worden in het kader van onderzoek dat krachtens de Vleeskeuringswet is voorgeschreven.

2. Principe

Twee papierschijfjes geïmpregneerd met nierbekkenvocht worden op een voedingsbodem gelegd waarin voor bacteriegroeiremmende stoffen een gevoelige bacterie aanwezig is. Na incuberen wijst aanwezigheid van bacteriegroeiremmende werking rondom beide papierschijfjes op aanwezigheid van antimicrobiële stoffen.

3. Micro-organismen

Bacillus subtilis BGA sporensuspensie, ca. 10^7/ml.
(Per batch door RIKILT gecontroleerd, via het RIKILT verkrijgbaar).

4. Voedingsbodem en reagentia

4.1 Standard II Nähragar (Merck art. nr. 7883).

4.2 Dextrose.

4.3 Natriumchloride p.a.

4.4 Natriumchloride-oplossing 0,8%.

4.5 Natriumchloride-oplossing 10,0%.

4.6 Zoutzuur 1 Mol.
(Goed afsluiten van de buitenlucht.)

4.7 Natriumhydroxydeoplossing 1 Mol.

Verse 1 Mol NaOH oplossing afvullen in goed afsluitbare 100 ml flesjes; na in gebruik name van een flesje deze maximaal twee weken gebruiken. In verband met carbonaatvorming in de NaOH, o.i.v. de CO_2 uit de lucht, het flesje onmiddellijk na gebruik goed afsluiten. De carbonaten geven problemen bij de instelling van de juiste pH van de voedingsbodem.

4.8 Fosfaatbuffer

Monokaliumfosfaat (KH_2PO_4)	20,0 g
Dinatriumfosfaat ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	28,0 g
Gedestilleerd water	1000 ml

4.9 Trimethoprimoplossing (TMP).

4.9.1 Trimethoprim base (SIGMA T-7833)	100 mg
Methanol	100 ml

(Oplossing op RIKILT verkrijgbaar; maximale houdbaarheid 6 maanden bij -20°C).

4.9.2 TMP-oplossing A (concentratie 10 µg/ml)	
Oplossing 4.9.1	1 ml
Natriumchlorideoplossing 0,8% (4.4)	100 ml

Bewaring in de koelkast gedurende maximaal 1 maand.

4.9.3 TMP-oplossing B	
Oplossing 4.9.1	1 ml
Natriumchlorideoplossing 10% (4.5)	500 ml

Bewaring in de koelkast gedurende maximaal 1 maand.

4.10 Standaardcontroleschijfjes
(via het RIKILT verkrijgbaar)
Controleschijfje 1: 2 µg tylosine/schijfje
Controleschijfje 2: 0,5 µg sulfadimidine/schijfje
Controleschijfje 3: 2 µg oxytetracycline/schijfje
Bewaren gedurende maximaal 3 maanden in de koelkast.

5. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

Gebruikelijke instrumenten en glaswerk voor microbiologische laboratoria en in het bijzonder:

5.1 Glasplaten van 30 bij 30 cm met opstaande rand van 2,5 cm, met afdekplaat.

5.2 Infusieflessen van 250 en 500 ml.

5.3 Maatcylinder van 250 ml met 1 ml verdeling.

5.4 Waterbad, ingesteld op 55°C ± 1°C.

5.5 Broedstoof ingesteld op 37°C ± 1°C.

5.6 Groot scherp slagersmes.

5.7 Papierschijfjes met een diameter van 12,7 mm (Schleicher en Schüll art. 601/2).

5.8 Plastic opbergdoosjes bevattende 24 cupjes van 15 mm doorsnede (Greiner art. 662160).

5.9 Micropipet van 25 µl of druppelaar (Nutacon MR35R) van 25 µl.

5.10 Filtreerpapier (47 x 57 cm Boom BV Meppel) voor afdekken van plaat met voedingsbodem.

5.11 Horizontale tafel, voor het gieten van de voedingsbodem.

6. Bereiding van voedingsmedium en testplaten

6.1 Bereiding van het medium

Standard II Nähragar (4.1)	12,5 g
Dextrose (4.2)	5,0 g
Natriumchloride p.a. (4.3)	5,0 g
Fosfaatbuffer (4.8)	50 ml
Gedestilleerd water	450 ml

Weeg de droge componenten af, voeg de fosfaatbuffer en het gedestilleerd water toe en los het geheel op door verwarming. Stel de pH van deze oplossing, met zoutzuur (4.6) of natriumhydroxide-oplossing (4.7) zodanig in dat deze na sterilisatie 7,00 ± 0,05 bedraagt bij 20°C.
Steriliseer het aldus bereide medium gedurende 15 min. bij 121 ± 1°C.
Koel af tot ca. 55°C in een waterbad van 55°C (5.4).
Controleer de pH van het medium en corrigeer deze eventueel.

6.2 Beënting en gieten van de voedingsbodem
Voeg per 100 ml steriele vers bereide voedingsbodem van ca. 55°C 1,2 ml TMP-oplossing A (4.9.2) en 0,1 ml B.subtilis sporensuspensie (3) toe.
Meng goed en giet dit medium in horizontaal geplaatste platen (5.1) zodanig dat de agarlaagdikte, over de gehele plaat 2,2 mm is.
Voor deze glasplaten 200 ml per plaat.
Laat stollen.
Indien de tijdsduur tussen gieten en het gebruik van de testplaten meer dan 4 uur bedraagt, dienen deze tussentijds gekoeld bewaard te worden. Indien de testplaten binnen 4 uur gebruikt worden, is opslag bij kamertemperatuur mogelijk. De bereide platen zijn maximaal 1 dag bij ca. 4°C te bewaren.

7. Werkwijze

7.1 Monstername en termijn na het slachten waarbinnen met het onderzoek aangevangen dient te worden
De nier dient zo lang mogelijk in het kapsel te blijven. Het losmaken uit het kapsel dient kort voor het beslissingsmoment (de feitelijke keuring), tot uitgebreid onderzoek, plaats te vinden. Dit moment kan bij noodslachtingen oplopen tot 72 uur na slachten.
Bij volwassen runderen en mestkalveren dient kort na slachten de nier van zoveel mogelijk vet ontdaan te worden zonder dat hierbij de nier wordt aangesneden.
Binnen 6 uur na het geheel losmaken van de nier uit het kapsel, dient met het onderzoek begonnen te worden. De maximale tijd tussen slachten en de aanvang van het onderzoek bedraagt 72 uur. De nier dient in die tussentijd gekoeld (4°C) bewaard te worden.

7.2 Uitvoering van de test.

Snij met een, onder stromend water gereinigd, slagersmes (5.6) vanuit de nierschors tot diep in het nierbekken.

Leg met een schone pincet vier papierschijfjes (5.7) in het nierbekken of, bij kleine nieren, op de grens van nierbekken en niermerg.

Nier dichtklappen en even aandrukken.

Na minimaal 30 minuten, met een schone pincet, twee papierschijfjes uit de nier diagonaalsgewijs op de voedingsbodem (6.2) leggen. (Ter vermijding van contaminatie bij elke nier een schone pincet nemen of deze tussentijds onder stromend water goed afspoelen).

De twee andere papierschijfjes, voor eventueel herkeuringsonderzoek, worden overgebracht naar één cupje van een daartoe speciaal bestemd opbergdoosje (5.8), geïdentificeerd en onmiddellijk ingevroren bij -20°C.

Breng in het midden van de testplaat standaardcontroleschijfjes (4.10) aan.

Bij iedere testplaat controleschijfje 2 en bij één op de drie testplaten ook controleschijfjes 1 en 3.

Druppel op de voedingsbodem gelegde papierschijfjes 25 µl TMP-oplossing B (4.9.3). Dek de voedingsbodem af met een glasplaat. Ter voorkoming van condens, kan gebruik gemaakt worden van filtreerpapier (5.10) en een glasplaat. Zorg er voor dat het filtreerpapier niet de voedingsbodem raakt!

7.3 Incubatie

Preincubeer de platen min. 1/2 uur tot max. 2 uur bij kamertemperatuur.

Incubeer vervolgens de platen gedurende 13-18 uur bij 37°C.

De platen, tijdens de incubatie, niet stapelen.

8. Meten van de remzones

Meet de diameter van de heldere remzones van de standaardcontroleschijfjes en de met nierbekkenvocht geïmpregneerde papierschijfjes. Noteer deze diameter in mm's op de daarvoor bestemde resultatenformulieren.

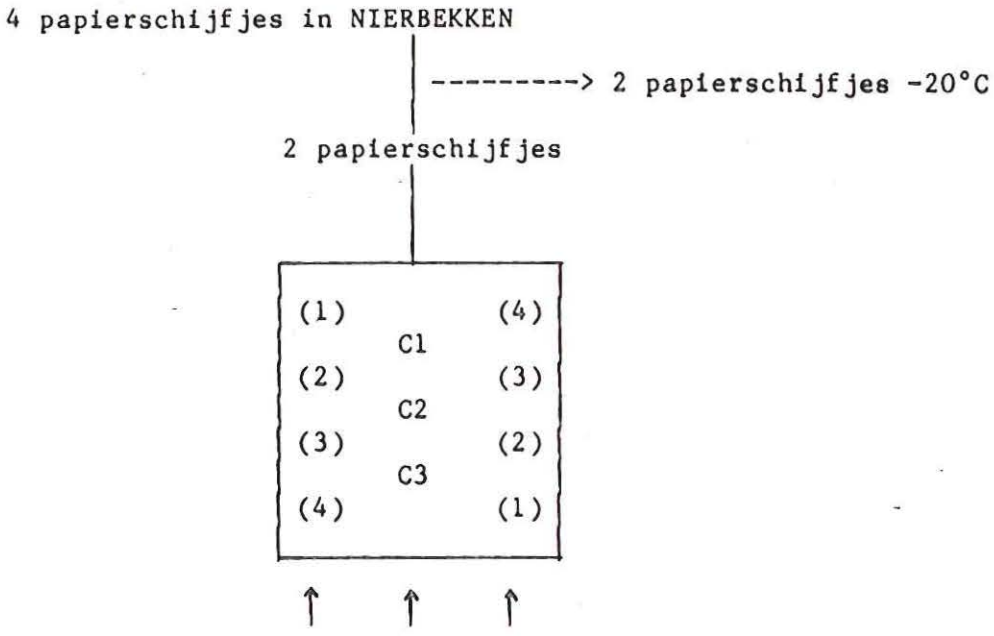
9. Interpretatie van de resultaten

Bereken het gemiddelde van beide heldere remzones. Indien de remzones van de standaardcontroleschijfjes voldoen aan de door het RIKILT, per batch, vastgestelde waarden is de NNNT juist uitgevoerd. De monsterschijfjes kunnen vervolgens geïnterpreteerd worden.

De heldere remzones die groter of gelijk zijn aan 20 mm moet als positief beschouwd worden.
Indien er slechts bij één schijfje een remming te constateren valt, dient de uitslag als negatief te worden beschouwd.

10. De diepgevroren papierschijfjes dienen tot 24 uur na de officiële keuringsuitspraak bij -20°C bewaard te blijven in verband met mogelijke herkeuring.
Eventuele herkeuring dient te gebeuren met de diepgevroren schijfjes.
Voor de interpretatie van het keuringsresultaat zie 5.2.2 van rapport 87.44.

11. Inzetschema



C1 t/m C3 = standaardcontroleschijfjes

Samenstellers: dr J.F.M. Nouws, N.J.G. Broex

8744.35

Gebruikte antimicrobiële formuleringen en tranquillizers

Formulering	Inhoud	Fabrikant
ANTIBIOTICA		
Albipen^{R} La	Ampicilline anhydraat 100 mg/ml excip.	Gist-Brocades NV
Amoxyvet^{R}-15%	Amoxycilline trihydraat 150 mg/ml excip.	Eurovet BV
Aescombin^{R}	Procaine penicilline G 200.000 IE + Neomycine sulfaat 100 mg/ml excip.	Aesculaap BV
Kanapen^{R}	Procaine penicilline G 200.000 IE + Kanamycine sulfaat 60 mg/ml excip.	Aesculaap BV
Engemycine^{R}-5%	Oxytetracycline 50 mg/ml excip.	Gist Brocades NV
Amicol Forte^{R}	Chloramphenicol 500 mg/ml excip.	Aesculaap BV
Suanovil^{R}	Spiramycine 200 mg/ml excip.	Rhone Merieux
Erythromycine-10%	Erythromycine 100 mg/ml excip.	Aesculaap BV
Tylan^{R}-200	Tylosine 200 mg/ml excip.	Elanco
Sulfadimidine-33%	Sulfadimidine 330 mg/ml excip.	AUV
Aescotrim^{R}	Sulfadimethoxine 200 mg + trimethoprim 40 mg/ml excip.	Aesculaap BV
Duoprim^{R}	Sulfadoxine 200 mg + trimethoprim 40 mg/ml excip.	Wellcome BV
Tribissen^{R}-48%	Sulfadiazine 400 mg + trimetoprim 80 mg/ml excip.	Wellcome BV
TRANQUILLIZERS		
Sucron^{R}	Carazololum 0,5 mg/ml excip.	Upjohn BV
Stresnil^{R}	Azaperon 40 mg/ml excip.	Janssen Pharmaceutica BV
Combelene^{R}	Propionylpromazine 10 mg/ml excip.	Bayer
Sedamun^{R}	Xylazine 20 mg/ml excip.	AUV
Acetazine^{R}	Acepromazine 5 mg/ml excip.	AUV