

Project 415.0002

De invloed van antibiotica op de microflora van het maagdarmkanaal in een simulatiemodel

Projectleider: dr. J.F.M. Nouws

Rapport 93.09

juni 1993

DE INVLOED VAN HET ANTIMICROBIËLE MIDDEL CEPHALOTINE OP EEN AANTAL
INDICATORORGANISMEN IN EEN IN-VITRO SIMULATIEMODEL VAN HET
MAAGDARMKANAAL

ir. P.G. Kruyswijk

afdeling: Microbiologie en Biotechniek

Medewerkers: dr. J.F.M. Nouws, ir. P.G. Kruyswijk

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1993, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Vertrouwelijk rapport

Uit deze uitgave mag niets worden gereproduceerd en/of openbaar gemaakt zonder schriftelijke toestemming van de directeur.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

hoofden onderzoekafdelingen (2x)

hoofd pr en secretariaat (2x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Wetenschap en Technologie

Sanofi Sante B.V.

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 METHODE EN MATERIAAL	5
2.1 Cephalotine	5
2.2 Bacterië stammen	6
2.2.1 Anaërobe teststammen	6
2.2.2 Facultatief anaërobe teststammen	6
2.3 Media en groeiomstandigheden voor de bepaling van de standaard MIC waarde	6
2.3.1 Bepaling standaard MIC waarden	6
2.4 Bepaling MIC waarden met behulp van simulatiemodel	7
2.4.1 Simulatiemodel: bereiding media en werkwijze	7
2.4.2 Medium A	7
2.4.3 Medium B	7
2.4.4 Medium C + D	8
2.5 Werkwijze	8
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	8
LITERATUUR	10
BIJLAGEN	
A Teststammen	
B MIC waarden	

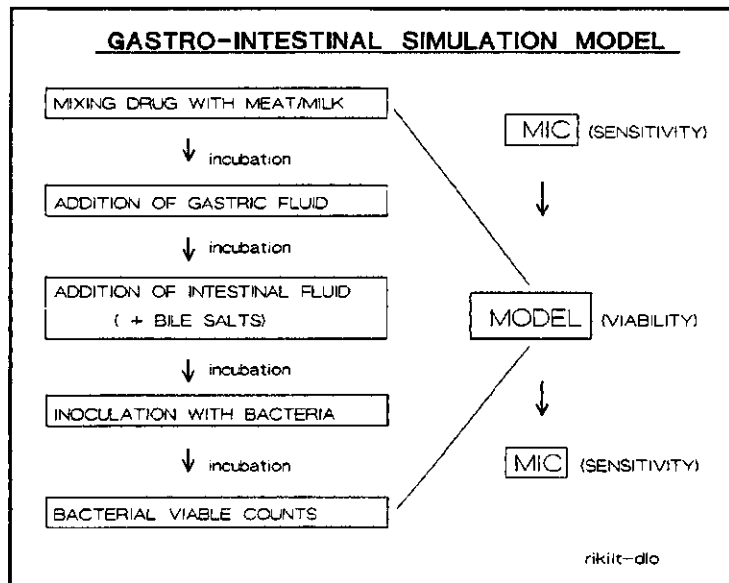
SAMENVATTING

In dit onderzoek is de invloed van het antibioticum cephalotine op de maagdashflora van de mens in een simulatiemodel getoetst. In het in-vitro model worden een aantal veelvoorkomende bacteriën uit het maagdashkanaal getest op hun gevoeligheid voor cephalotine. De bacteriën, *Escherichia coli* sp., *Bacteroides fragilis* sp., *Bifidobacterium* sp. en *Eubacterium* sp. zijn gebruikt om de 'minimum inhibitory concentration' (MIC) in het simulatiemodel volgens de standaardmethode te bepalen.

Met behulp van de MIC₅₀ waarde van de bacteriestammen die het gevoeligst zijn voor het antibioticum is de MRL (maximum residue level) te berekenen. In het geval dat het antibioticum homogeen verdeeld is in het vlees of melk en de hoeveelheden geconsumeerd vlees respectievelijk melk op 500 g respectievelijk 1500 ml gesteld worden dan is de berekende MRL voor cephalotine bij vlees 0.36 µg/g en die voor melk 0.39 µg/ml.

1 INLEIDING

Cephalotine is een 'biocide' dat gebruikt wordt in de veehouderij. Om de invloed van het middel op de mens en met name op de maagdashora, vast te stellen wordt dit middel getoetst in een simulatiemodel van het maagdashkanaal. Dit model dat eerder beschreven is door Mc Conville e.a. (1993) en door Nouws e.a. (1993) werd gewijzigd, staat schematisch weergegeven in fig. 1.



Figuur 1. Schematische weergave van het simulatiemodel van het maagdashkanaal.

Het model is een benadering van de omstandigheden die het antimicrobiële middel cephalotine in het maagdashkanaal ondergaat. Door condities in een gesimuleerd maagdashsysteem aan te leggen, zoals een lage pH in de maag en het instellen van een anaëroob milieu in het dashkanaal, alsmede de aanwezigheid van galzouten en enzymen, is het in dit onderzoek toegepaste simulatiemodel, een betere benadering dan het model beschreven in JECFA (1991) (Mc Conville e.a., 1993; Nouws e.a., 1993). De gegevens die verkregen worden uit het simulatiemodel kunnen worden gebruikt om de ADM_m (microbiological Acceptable Daily Intake) en de MRL (Maximum Residue Level) vast te stellen voor cephalotine.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Cephalotine

Het te toetsen middel cephalotine (ongeveer 5 g) is verstrekt door Sanofi Sante B.V. in Maassluis. Het is geproduceerd door Alfasan Ltd. te Woerden met een activiteit van 931,3 $\mu\text{g/g}$ (= 93.13 %). Batch nummer: 91070740c1.

2.2 Bacteriestammen

2.2.1 Anaërobe teststammen

De gebruikte anaërobe teststammen zijn: *Bacteroides fragilis* sp.(n=5), *Bifidobacterium* sp. (n=6) en *Eubacterium* sp. (n=4) (zie voor herkomst bijlage A).

2.2.2 Facultatief anaërobe teststammen

Voor de facultatief anaërobe bacteriën zijn 6 stammen van *Escherichia coli* (n=6) gebruikt (voor herkomst zie bijlage A).

2.3 Media en groeiomstandigheden voor de bepaling van de standaard MIC waarde

De MIC waarden van cephalotine worden voor de betreffende indicator stammen bepaald volgens de agar- en bouillionverduunningsmethode.

Voor de *E. coli* stammen is gebruik gemaakt van Isosensitest agar/broth (Oxoid) en Mc Conkey agar (Oxoid) voor bevestiging van de groei van de stammen.

De stammen van *B. fragilis* en *Eubacterium* zijn aangekweekt op Wilkens-Chalgren Anaerobic broth (Oxoid). Dit medium is tevens gebruikt voor de 'broth-dilution' methode. Voor de 'agar-dilution' methode is gebruik gemaakt is van Bile Esculin agar (Difco) voor de *B. fragilis* stammen en Schaedler Anaerobe agar (Oxoid) voor de *Eubacterium* stammen.

Voor de *Bifidobacterium* stammen is voor zowel de aankweek als de bepaling van de MIC waarden gebruik gemaakt van Lactobacili MRS broth/agar (Oxoid).

Alle media zijn gemaakt volgens de geëigende voorschriften (fabrikant) met uitzondering van de bouillion voor de aankweek van de *Eubacterium* sp. waarbij 0.4 % dextrose is toegevoegd.

Alle incubaties zijn uitgevoerd bij een temperatuur van 37 ± 1 °C.

2.3.1 Bepaling standaard MIC waarden

Voor de bepaling van de MIC waarden (Minimal Inhibitory Concentration), welke in duplo is uitgevoerd, zijn afhankelijk van de te testen stammen verschillende concentratiereeksen van cephalotine gemaakt (zie tabel 1), waarbij de volgende concentraties cephalothine (in $\mu\text{g/ml}$) gebruikt werden:

0.16 - 0.32 - 0.64 - 1.25 - 2.5 - 5.0 - 10.0 - 20.0 - 40.0 - 80.0 $\mu\text{g/ml}$

Tabel 1. Concentratiereeks cephalotine in $\mu\text{g/ml}$ per bacterie en methode.

	agar/broth dil.	simulatiemodel
<i>E. coli</i>	1.25 - 40.0	5.0 - 40.0
<i>B.fragilis</i>	0.16 - 40.0	20.0 - 80.0
Bifidobact.	0.16 - 20.0	2.5 - 40.0
Eubacterium	0.32 - 20.0	1.25 - 20.0

Er is gebruik gemaakt van een standaard inoculum van 10^5 c.f.u./ml. Ter controle werd een cephalotine vrij medium meegenomen.

Na een incubatie van 18 uur voor *E. coli* of 42 uur voor de anaërobe bacteriën, werd vervolgens de 'broth dilution' methode uitgeplaat om te controleren of er wel of geen groei plaats gevonden had.

De laagste concentratie waarbij geen groei van het betreffende organisme waargenomen wordt, wordt beschouwd als zijnde de 'minimum inhibitory concentration' (MIC).

2.4 Bepaling MIC waarden met behulp van het simulatiemodel

2.4.1 Simulatiemodel: bereiding media en werkwijze

Het maagdarmpmodel dat ontwikkeld is ter controle van een eventuele degradatie en enzymbinding van een residu van een antimicrobiëel middel in voedsel van dierlijke oorsprong, wordt volgens de onderstaande procedure gemaakt.

2.4.2 Medium A

Vlees in de vorm van Cooked meat medium (Oxoid) wordt afgewogen en vernalen. Per buis van 20 ml wordt 1.25 g afgewogen en bestraald (5 kGy). Onder steriele omstandigheden wordt aan dit substraat 1.0 ml sterielwater en 0.25 ml van een steriele oplossing van een bekende concentratie van cephalotine toegevoegd (zie voor concentratie tabel 1).

Aan steriele volle melk (U.H.T.) wordt 1.0 ml sterielwater en 0.25 ml van een steriele oplossing van een bekende concentratie (zie tabel 1) van cephalotine toegevoegd.

2.4.3 Medium B

Medium B is het maagsap en bestaat uit: 2.0 g NaCl + 3.2 g pepsine opgelost in 7ml HCl (1 M) en aangevuld tot een totaal volume van 1 l (pH ongeveer 1.2).

2.4.4 Medium C + D

Medium C bevat galzouten (Oxoid) Medium D en bestaat uit de volgende componenten: 6.8 g KH_2PO_4 , 650 ml water (demi), 190 ml NaOH (0.2 M) en 1.0 g cysteïne HCl. De pH wordt op 7.5 gesteld en het volume wordt aangevuld tot 1 l. Het geheel wordt geautoclaveerd zonder het enzym pancreatine. Pancreatine (10.0 g/l) wordt bestraald (5 kGy) en, na afkoelen van het medium, toegevoegd.

De hoeveelheid galzouten is afhankelijk van de gebruikte teststammen. In het geval van de facultatief anaërobe *E. coli* wordt er 0.4 % (w/v) toegevoegd en bij de anaërobe teststammen 0.025 % (w/v).

2.5 Werkwijze

Medium A wordt verdund met medium B (1:1) tot een totaalvolume van 5.0 ml. en vervolgens minimaal 1 uur geïncubeerd bij een temperatuur van 37 °C in een waterbad om de situatie in de maag te simuleren. Hierna worden media C en D toegevoegd (1:1 verdunning) zodat een totaal volume ontstaat van 9.75 ml. Van dit mengsel wordt ter controle van de stabiliteit 0.5 ml ingevroren. Vervolgens wordt na 3 uur incubatie van dit mengsel in een waterbad bij een temperatuur van 37 °C, 0.25 ml van de te testen stammen toegevoegd (dichtheid: 10^5 c.f.u./ml maag-darmmedium).

Na beënting worden de testbuizen gedurende 18 uur (*E. coli*) of 42 uur (anaërobe bacteriën) onder anaërobe condities geïncubeerd bij een temperatuur van 37 °C.

De bepaling van de MIC wordt gedaan door het uitplaten van de beënte buizen op de hierboven genoemde media (zie 2.3). Eventueel worden enkele stammen opnieuw getest volgens de 'agar dilution' methode om veranderingen in de MIC vast te stellen.

De concentratie van het cephalotine is met een bioassay met behulp van een indicatororganisme bepaald.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De gevonden MIC waarden voor alle gebruikte indicatororganismen staan vermeld in de bijlage B. Hieruit is de MIC_{50} bepaald en de gemiddelde waarden hiervan staan vermeld in tabel 2. Bij de berekening van de MRL (maximum residu level) wordt uitgegaan van de situatie dat er een maximale consumptie van vlees of melk gebruikt wordt. Tevens gaat men ervan uit dat het antimicrobiële middel homogeen verdeeld is door het vlees en de melk. De MIC_{50} wordt eerst gebruikt om de ADI_m (microbiological acceptable daily intake) te berekenen (zie Nouws e.a., 1993). De ADI_m blijkt, aangezien de correctiefactor (CF) en de beschikbaarheid (Availability) op 1 gesteld zijn alleen af te hangen van een veiligheidsfactor, de MIC_{50} en de dagelijks geconsumeerde hoeveelheid van het voedsel van dierlijke oorsprong. Daar voor zowel vlees als melk, bij de berekening van de MRL's deze resp. op 500 g en 1500 ml gesteld worden hangt de MRL dus alleen af van de veiligheidsfactor (= 5) (zie Nouws e.a., 1993) en de MIC_{50} van de gevoeligste bacteriestam.

Voor cephalotine vinden we zodoende een MRL waarde van 0.36 $\mu\text{g/g}$ voor vlees. In dit geval bepaalt

de bacterie *Eubacterium* sp. de ondergrens omdat deze bacterie het gevoeligst blijkt te zijn voor cephalotine.

Voor melk werd een MRL waarde van 0.39 $\mu\text{g/ml}$ bepaald. In dit geval bleek de *Bifidobacterium* sp. de gevoeligste bacterie te zijn.

Tabel 2. MIC₅₀ waarden van cephalotine van de verschillende indicator stammen volgens de 'Agar dilution' en 'Broth dilution' methode in vergelijking met gevonden waarden uit het simulatiemodel. De waarden zijn het gemiddelde van (n) stammen.

Bacterie (n)	Agar dil.	Broth dil.	simulatiemodel	
			Cooked meat	Milk
<i>E. coli</i> (6)	7.5	12.5	12.5	15.0
<i>B. fragilis</i> (5)	18.8	> 30.0	48.0	< 18.0
<i>Bifidob. sp.</i> (6)	4.2	2.7	6.9	2.6
<i>Eubact. sp.</i> (4)	1.1	1.1	2.4	--

Na de incubatieperiode, bij een temperatuur van 37 °C van medium A en B, zijn medium C en D toegevoegd. Van dit mengsel en het uiteindelijk maagdarmedium na 18 of 42 uur zijn een aantal monsters genomen om met behulp van de bioassay de activiteit van cephalotine te toetsen. Gedurende de incubatieperiode in de 'maag' blijkt er een geringe daling op te treden in de activiteit van cephalotine. Vermoedelijk onder invloed van de lage pH en binding (Nouws e.a., 1993) blijkt er voor vlees een afname van 30 - 40 % en een afname voor melk van 15 - 20 % opgetreden te zijn ten opzichte van de beginconcentraties.

Aan het eind van het experiment treedt er afhankelijk van de incubatieduur een verdere afname op van de activiteit. Na 18 uur incubatie (bij de facultatief anaërobe bacteriën) wordt voor vlees een afname van 20 % en voor melk een afname van 30 % ten opzichte van de situatie in de 'maag' waargenomen. Na 42 uur blijkt er slechts 15 % van de begin activiteit van cephalotine in het simulatiemodel voor vlees en 20 % indien melk als substraat aan het model was toegevoegd, te resteren.

De gevonden MRL's zijn door de hoge veiligheidsfactor en de veiligheidsmarge die in de bepaling van de MIC₅₀ is ingebouwd (inoculatie-dichtheid 10⁵ c.f.u./ml maagdarmedium) (Nouws e.a., 1993) en mede door de uiteindelijk lagere concentratie van cephalotine in het 'darmkanaal', de activiteit is immers afgenomen in de 'maag', kunnen de MRL's eerder hoger dan lager gesteld worden.

Verschillende bacteriestammen zijn na de incubatie in het simulatiemodel getoetst op veranderingen in de standaard MIC waarde. Hierbij zijn geen verschillen gevonden met de eerder gedane waarnemingen.

LITERATUUR

JECFA

Evaluation on certain veterinary drug residues in food. Thirty-eight report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Annex 5 WHO report 815, 1991.

Mc Conville M.L., Dijkstra J.W., Stamm J.M., Saene J.J.M. van and Nouws J.F.M. (1993)
Effects of sarafloxacin hydrochloride on human enteric bacteria under simulated human gut conditions.
(in prep.).

Nouws J.F.M., Kuiper H., Klingereren B. van, and Kruyswijk P.G. (1993)
Establishment of a microbiological acceptable daily intake for antimicrobial drugresidues. J. Vet.
Pharmacol. (in prep.).

BIJLAGEN

Bijlage A

Lijst met gebruikte bacteriestammen:

<i>Escherichia coli</i>	NCTC 8603
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 8761
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 8783
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 9434
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 11601
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 8560
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 9343
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 9344
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 10581
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 11625
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	NCFB 2204
<i>Bifidobacterium infantis</i>	NCFB 2205
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	NCFB 2236
<i>Bifidobacterium breve</i>	NCFB 2257
<i>Bifidobacterium longum</i>	NCFB 2259
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NCFB 2715
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	ATCC 25986
<i>Eubacterium cylindroides</i>	ATCC 27803
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	ATCC 29738
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	ATCC 35085

ATCC = American Type Culture Collection

NCTC = National Collection of Type Cultures

NCFB = National Collection of Food Bacteria

Bijlage B

Minimale concentratie van Cephalotine in $\mu\text{g}/\text{mg}$ waarbij geen groei meer optreed van de verschillende indicatororganismen volgens de 'agar dilution', 'broth dilution' methode en het het simulatiemodel (resp. vlees en melk).

		agar	broth	vlees	melk
E. coli	8603	20	20	20	40
	8761	10	20	20	20
	8783	5	10	10	10
	9434	5	10	10	10
	11601	10	20	20	20
	25922	10	20	20	20
B. fragilis	8560	5	40	40	< 20
	9343	40	> 40	80	< 20
	9344	40	> 40	80	40
	10581	20	> 40	80	< 20
	11625	20	> 40	40	< 20
Bifidobac.	2204	2.5	2.5	2.5	1.25
	2205	2.5	1.25	5	1.25
	2236	1.25	1.25	5	1.25
	2257	5	5	20	10
	2259	20	10	20	-
	2715	2.5	1.25	2.5	-
Eubact.	25986	2.5	2.5	5	-
	27803	1.25	1.25	2.5	-
	29738	1.25	1.25	2.5	-
	35085	0.62	0.62	2.5	-

De *Eubacterium* sp. bleken ook bij de controle geen groei te vertonen in melk. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de lage pH conditie in de 'maag'.