

Project 71 511 24

“Opname kinetiek van dierbehandelingsmiddelen tijdens kweken van vis.”

Projectleider: Drs J.A. van Rhijn

Rapport 2000.009

September 2000

## Effect van pH en zoutgehalte op opname en eliminatie van sulfadiazine en trimethoprim bij paling.

J.A. van Rhijn, A. Kamstra<sup>1</sup>, H.J. Keukens, O.L.M. Haenen<sup>2</sup>

1) Nederlands Instituut voor de Visserij (RIVO-DLO), Postbus 68, 1970 AB IJmuiden.

2) Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-Lelystad), Postbus 65, 8200 AB Lelystad.

Rijkskwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwproducten (RIKILT)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 0317-475400  
Telefax 0317-417717

Copyright 2000, Rijkskwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwprodukten (RIKILT)  
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

## VERZENDLIJST

### INTERN

Directeur

Programmaleiders

Projectleider

Auteurs

In- en externe communicatie (2x)

### EXTERN

RIVO (Dr J. Luten, programmaleider "Kwaliteit en Technologie van Dierlijke Produkten",  
KTDP (10x))

RIVO (Dr J.W. van der Heul, Dr E. Schram)

RIVO (Bibliotheek (2x))

LNv, Directie Visserij (T. de Kok, F. van den Berg, C. Barel)

NeVeVi (W. van Eijk)

## ABSTRACT

Effect of pH and salinity on the absorption and elimination of sulfadiazine and trimethoprim in European Eel.

Report 2000.009

September 2000

J.A. van Rhijn, A. Kamstra<sup>1</sup>, H.J. Keukens, O.L.M. Haenen<sup>2</sup>.

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)  
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands.

1) Netherlands Institute for Fisheries Research (RIVO-DLO), P.O. Box 68, 1970 AB IJmuiden.

2) Institute for Animal Science and Health (ID-Lelystad), P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad.

Applicability of antibacterial agents in aquaculture is limited due to the limited knowledge on absorption and elimination of these substances. For a therapeutic effect, the absorption of the compounds is of interest while from the point of view of product safety and practicability of the therapy, elimination and withdrawal periods are important. The influence of water quality, *i.e.* pH and salinity, on the absorption and elimination of trimethoprim (TMP) and sulfadiazine (SDZ) was studied.

The results of this study indicate that eel readily absorbed SDZ. In plasma as well as in muscle tissue concentration levels exceeding the minimum inhibitory concentration reported by other authors, are readily achieved. TMP on the other hand is not absorbed at low pH and at higher pH absorption is still limited. The pursued optimal SDZ to TMP ratio is not obtained.

Excretion of SDZ is slow compared to for example cattle yielding a withdrawal period of about 50 days. Variability between individual animals influenced the calculation of the withdrawal period.

TMP is present at very low concentration in plasma as well as muscle tissue. For TMP the calculation of the withdrawal period is strongly influenced by differences between individual animals and also by the limited number of samples available that contain only low levels of TMP.

**Keywords:** sulfadiazin, trimethoprim, European eel, absorption, excretion.

# Inhoud

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <b>Abstract</b>                 | 1  |
| <b>Samenvatting</b>             | 5  |
| <b>1. Inleiding</b>             | 7  |
| <b>2. Materiaal en methoden</b> |    |
| 2.1 Huisvestingssystemen        | 8  |
| 2.2 Toediening SDZ/TMP mix      | 9  |
| 2.3 Monstername                 | 9  |
| 2.4 Analysemethoden             | 10 |
| <b>3. Resultaten</b>            |    |
| 3.1 SDZ in watermonsters        | 11 |
| 3.2 SDZ in plasma               | 12 |
| 3.3 TMP in plasma               | 13 |
| 3.4 SDZ in spiervlees           | 13 |
| 3.5 TMP in spiervlees           | 15 |
| <b>4. Discussie</b>             | 15 |
| <b>5. Conclusies</b>            | 17 |
| <b>Referenties</b>              |    |

## ***Samenvatting***

*De toepassing van antibacteriële middelen in de aquacultuur wordt beperkt door de geringe kennis omtrent de opname en uitscheiding van deze middelen. Voor het therapeutisch effect zijn een goede opname van het geneesmiddel en het bereiken van voldoende hoge bloedspiegels van belang. Daarnaast is, om residuen van dierbehandelingsmiddelen in het eindproduct te voorkomen, de inachtnaam van een wachttermijn noodzakelijk. De lengte van de wachttermijn is echter niet bekend. Er zijn tot op heden geen geregistreerde diergeneesmiddelen voor behandeling van zieke paling beschikbaar.*

*In dit rapport wordt het uitgevoerde onderzoek aan de opname en uitscheiding van sulfadiazine (SDZ) en trimethoprim (TMP) bij paling onder experimentele omstandigheden beschreven. Groepen paling gehouden bij vier verschillende condities met betrekking tot de pH en het zoutgehalte van het zwemwater zijn behandeld met een mengsel van SDZ en TMP. Vervolgens zijn op diverse tijdstippen na toediening, monsters genomen van bloed en spiervlees waarin de gehalten SDZ en TMP werden bepaald met behulp van een gevalideerde HPLC methode.*

*Uit de resultaten blijkt dat onder alle experimentele condities een goede opname van sulfadiazine bereikt wordt. De bloedspiegels bereikten ruimschoots het minimum inhibitory concentration (MIC) niveau. Trimethoprim werd slecht opgenomen, resulterend in lage bloedspiegels. De opname van TMP hing sterk af van met name de pH van het water. Bij lage pH vond vrijwel geen opname plaats. De uitscheidingskinetiek van sulfadiazine was vergelijkbaar bij alle combinaties van pH en zoutgehalte en wees erop dat gedurende geruime tijd na toediening, SDZ in het spiervlees kan worden aangetoond in hoeveelheden tussen 50 en 100 µg/kg. Een wachttermijn kan daardoor niet nauwkeurig worden bepaald maar ligt in de orde van vijftig tot zestig dagen na het staken van de behandeling uitgaande van de MRL die voor andere diersoorten is vastgesteld.*

*Voor TMP werden door beperkte opname, slechts lage gehalten in het spiervlees gevonden. De bepaling van een wachttermijn was echter niet goed mogelijk.*

## 1. Inleiding

De toepassing van antibacteriële middelen in de aquacultuur wordt beperkt door de geringe kennis omtrent de opname en uitscheiding van deze middelen. Voor het therapeutisch effect is een goede opname van het geneesmiddel en het bereiken van voldoende hoge bloedspiegels van belang. Er zijn tot op heden geen geregistreerde diergeneesmiddelen voor behandeling van zieke paling beschikbaar.

In een eerder experiment is de opname van SDZ in paling bestudeerd in relatie tot de dosering, via badbehandeling, van een trimethosulfmix. Daarbij is de bloedspiegel van SDZ bepaald [1]. Uit dat experiment bleek dat badbehandeling met trimethosulfmix bij een dosering van 50 mg/L, resulteerde in bloedspiegels voor SDZ die in de orde van de MIC lagen en dus een effectieve behandeling mogelijk maakten. De opname van antibiotica uit water kan echter sterk worden beïnvloed door de waterkwaliteit. Met name de pH zou een belangrijke invloed kunnen hebben [1]. Vanuit therapeutisch oogpunt is weliswaar de opname van belang, vanuit het oogpunt van productkwaliteit en –veiligheid is eveneens de uitscheidingskinetiek van belang. Na het staken van de behandeling dient een wachtermijn in acht te worden genomen die zodanig is dat overschrijding van de maximum residu limiet (MRL) in het produkt voorkomen wordt. De lengte van de wachtermijn is echter zowel voor SDZ als voor TMP niet bekend.

In het kader van programma 335 “Kwaliteit en Technologie van Dierlijke Producten” is de opname en uitscheiding van sulfadiazine (SDZ) en trimethoprim (TMP) bij paling onderzocht. Groepen paling gehouden bij vier verschillende condities met betrekking tot de pH en het zoutgehalte van het zwemwater, zijn middels badbehandeling behandeld met trimethosulfmix. In dit rapport worden de resultaten van dit onderzoek gepresenteerd. Zowel tijdens als na de behandeling werden monsters genomen van bloed en spiervlees waarin de gehalten SDZ en TMP werden bepaald. Daarmee werd inzicht verkregen in zowel de opname als de uitscheiding van SDZ en TMP bij verschillende waterkwaliteiten. Voor SDZ kon een schatting gemaakt worden van een wachtermijn waarmee het optreden van residuen in spiervlees zou kunnen worden vermeden. Voor de bepaling van de wachtermijn werd, bij het ontbreken van een MRL waarde voor paling, uitgegaan van een targetwaarde voor paling die gelijk is aan de MRL waarde voor SDZ en TMP die voor andere diersoorten gehanteerd wordt, te weten 100 µg/kg voor SDZ en 50 µg/kg voor TMP.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Huisvestingssystemen

De paling voor dit experiment was afkomstig van een commerciële palingkwekerij en had een gemiddeld gewicht van  $60.5 \pm 9.8$  gram ( $n=100$ ). De dieren werden verdeeld over vier afzonderlijke recirculatiesystemen waarin de waterkwaliteit door beluchting en verversing op peil werd gehouden. In ieder systeem werden ca. 150 dieren uitgezet verdeeld over 4 glazen aquaria van 40 l.

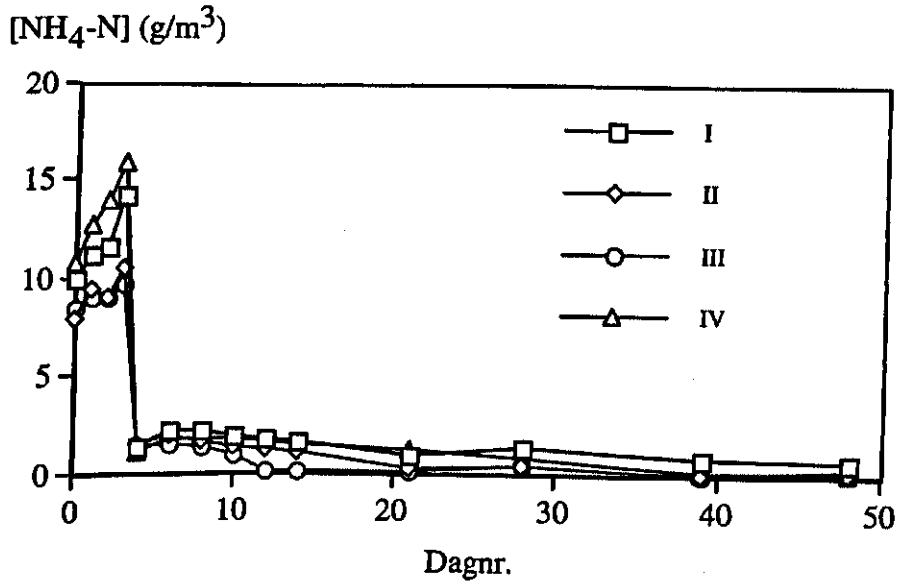
In de vier systemen werd een verschillende waterkwaliteit aangelegd te weten: een hoge en een lage pH (respectievelijk ca. 8 en ca. 6) in leidingwater en een hoge en lage pH bij een zoutgehalte van 1% NaCl. De lage pH werd automatisch geregeld door dosering van zoutzuur aan de systemen. Het zoutgehalte van 1% werd gehandhaafd door vanuit een voorraadvat, waarin regelmatig een portie zout werd opgelost en gemengd, continu water naar twee systemen te pompen. De andere systemen werden continu verversst met leidingwater. De verversingsdebieten werden dagelijks gecontroleerd en lagen in de orde van 50 tot 100 ml per minuut. In alle systemen werd dagelijks de watertemperatuur en de pH gemeten (tabel 1). Ter controle van de zoutdosering werd dagelijks het elektrisch geleidingsvermogen (EC) gemeten. Dagelijks werden in alle systemen watermonsters ingevroren waarin in een later stadium ammonium is bepaald.

De totale mortaliteit gedurende de looptijd van het experiment bedroeg 15 exemplaren. Na ca. twee weken werd een opkomende infectie met kieuwworm (*Pseudodactylogyrus spp.*) bestreden met 2 g/m<sup>3</sup> mebendazole (24 uur).

*Tabel 1. Overzicht van watertemperatuur, zoutgehalte en pH (gemiddelde±standaarddeviatie) in de 4 systemen.*

| Systeem               | I               | II              | III             | IV              |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Watertemperatuur (°C) | $24.8 \pm 0.37$ | $24.8 \pm 0.34$ | $25.0 \pm 0.36$ | $24.8 \pm 0.63$ |
| Zoutgehalte           | 1%              | 1%              |                 |                 |
| pH                    | $6.07 \pm 0.09$ | $8.27 \pm 0.16$ | $8.40 \pm 0.14$ | $5.99 \pm 0.12$ |

Op  $t=0$  is de behandeling ingezet en is de waterverversing gestopt. De behandeling met trimethosulfmix is toegepast gedurende 72 uur. In die periode nam het ammonium-gehalte langzaam toe. Na afloop van de behandeling is het hele systeem verversed en bleef de ammonium-concentratie laag door verversing (fig 1).



*Figuur 1. Het verloop van de ammonium concentratie gedurende het experiment*

## 2.2 Toediening SDZ/TMP mix

Nadat de vis gedurende enkele dagen in de verschillende systemen was geacclimatiseerd, werd een badbehandeling met Trimethosulfmix 50% (Eurovet) ingezet. Er werd een concentratie van 50 mg/L op basis van actieve stof (trimethoprim/sulfadiazine, 1:5) toegepast. Na 72 uur werd al het water uit de systemen verwijderd en werd schoon water toegevoegd.

## 2.3 Monstername

Voordat de behandeling werd ingezet en na ca. 3, 6, 12, 18, 24, 30, 38, 48 uur en 3, 4, 7, 14, 23 en 49 dagen werden vissen bemonsterd. Voordat de behandeling werd ingezet ging het in totaal om 16 vissen, daarna werden bij iedere bemonstering 10 vissen per systeem genomen. De monstername en conservering van de monsters was verder identiek aan die van Kamstra et al. 1999[1]. Van alle verzamelde dieren zijn individueel filet (spierweefsel), lever, huid en overig verzameld en ingevroren voor analyse.



## 2.4 Analysemethoden

### *SDZ in plasma*

De methode voor de bepaling van SDZ in plasma werd reeds eerder ontwikkeld en gevalideerd [1]. In het kort houdt deze methode in dat het plasma werd verdund met een fosfaatbuffer oplossing, waarna geëxtraheerd werd met dichloormethaan. De organische fractie werd geïsoleerd ingedampt ( $N_2$ ,  $40^\circ C$ ) tot droog en opgelost in het HPLC eluens. Een aliquot werd gebruikt voor vloeistofchromatografische gehaltebepaling.

### *SDZ en TMP in water*

De concentratie van SDZ in water werd bepaald door chromatografische analyse na verdunning van de monsters met water. De componenten werden gemeten met UV detectie bij 280 nm. Ook deze methode werd reeds eerder gerapporteerd [1].

### *SDZ en TMP in spiervlees*

Van het gemalen monster werd 1 gram afgewogen. Hieraan werd een fosfaatbuffer toegevoegd waarna het mengsel werd gehomogeniseerd. Het vet werd verwijderd door extractie van dit homogenaat met hexaan. Vervolgens werden SDZ en TMP uit het monster geëxtraheerd met dichloormethaan. Een aliquot van de dichloormethaan fractie werd geïsoleerd en drooggedampt. Het residu werd opgenomen in HPLC eluens en nogmaals uitgeschud met iso-octaan om vetresiduen te verwijderen. Een aliquot van de oplossing werd onderworpen aan vloeistofchromatografische analyse. De detectie werd uitgevoerd met UV bij 280 nm voor SDZ en 230 nm voor TMP [2-4].

De chromatografische condities waarmee zowel SDZ als TMP in één analysegang te bepalen zijn, leverden voor TMP een vrij late elutie op en daarmee ook een vrij brede piekvorm. Pogingen daarin verbetering te brengen gingen steeds ten koste van de performance voor SDZ. Omdat SDZ als de belangrijkste component gezien werd, is gekozen voor een compromis waarbij TMP, blijkens de validatie data, op verantwoorde wijze bepaald kon worden en tegelijkertijd zo optimaal mogelijke performance voor SDZ werd verkregen. De methode werd gevalideerd conform algemeen geldende principes waarbij de herhaalbaarheid, binnen-lab reproduceerbaarheid, lineariteit, recovery en limit of quantification (LOQ) werden bepaald. De herhaalbaarheid en binnen-lab reproduceerbaarheid werden bepaald op drie verschillende dagen op een niveau van 50, 100 en 200  $\mu g/kg$  voor SDZ en 25, 50 en 100  $\mu g/kg$  voor TMP. Op elk van de drie dagen werd een andere batch spiervlees gebruikt zodat ook matrix variabiliteit in beperkte mate in het experiment werd

betrokken. Voorts zijn een aantal monsters die tijdens het experiment werden verzameld, twee maal geanalyseerd met een tussentijd van enkele weken. Deze duplos kwamen goed overeen. Blijkens een F-toets is er geen significant verschil tussen de binnen-dag en tussen-dag herhaalbaarheid. Beiden zijn goed, voor zowel SDZ als TMP, met een gemiddelde recovery rond 70% en een variatiecoëfficiënt van minder dan 10 % bij toevoeging van 100 µg/kg (50 µg/kg voor TMP). Tabel 2 geeft de resultaten voor de verschillende toevoegingsniveaus.

*Tabel 2 Validatie gegevens voor de bepaling van SDZ en TMP in spiervlees van paling*

| Toevoeging<br>(µg/kg) | Sulfadiazine |        | Trimethoprim |        |
|-----------------------|--------------|--------|--------------|--------|
|                       | Recovery (%) | CV (%) | Recovery (%) | CV (%) |
| 25                    | -            | -      | 76.3         | 11.0   |
| 50                    | 72.6         | 13.9   | 72.3         | 8.9    |
| 100                   | 76.5         | 6.7    | 68.1         | 6.6    |
| 200                   | 69.2         | 5.7    | -            | -      |

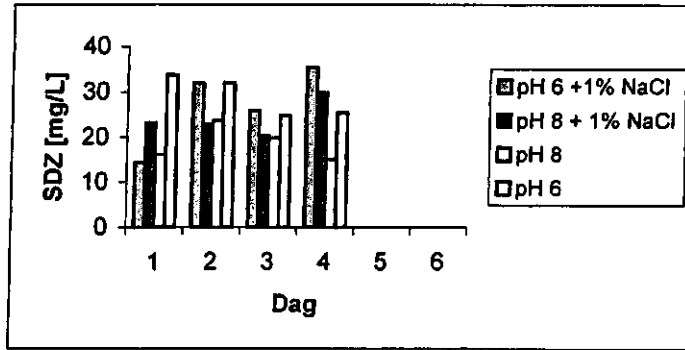
De Limit of Quantification (LOQ) bedroeg 50 µg/kg (25 µg/kg voor TMP). Hierbij moet worden opgemerkt dat de LOQ voor SDZ met name bepaald werd door een onbekende piek die vrijwel co-elueert met SDZ en die werd aangetroffen in diverse blanco monsters. Deze stoorpiek neemt in intensiteit toe wanneer de monsters enkele malen zijn ontdooid en weer ingevroren.

Uit alle ijkreeksen die gedurende het onderzoek zijn meegenomen, blijkt een goed linear verband in het concentratiegebied rond de targetwaarde van 100 µg/kg (50 µg/kg voor TMP).

### 3. Resultaten

#### 3.1 SDZ in watermonsters

Ter controle van de dosering en de stabiliteit van SDZ, is gedurende de toedieningsperiode een aantal watermonsters genomen waarin het SDZ gehalte werd bepaald. Van de dosering werd ca 70% teruggevonden, er werd geen afbraak gedurende de toedieningsperiode geconstateerd (figuur 2).



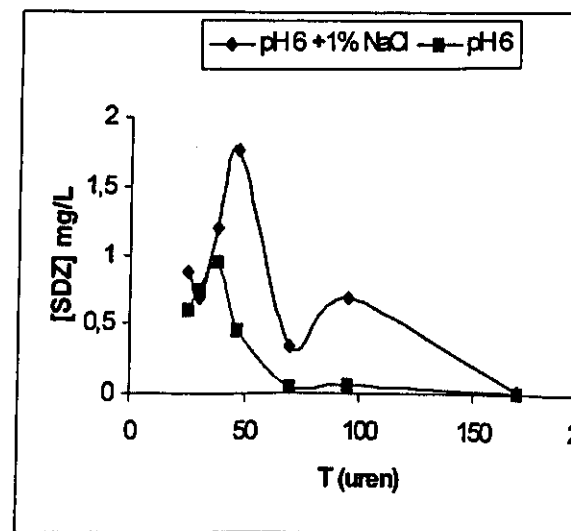
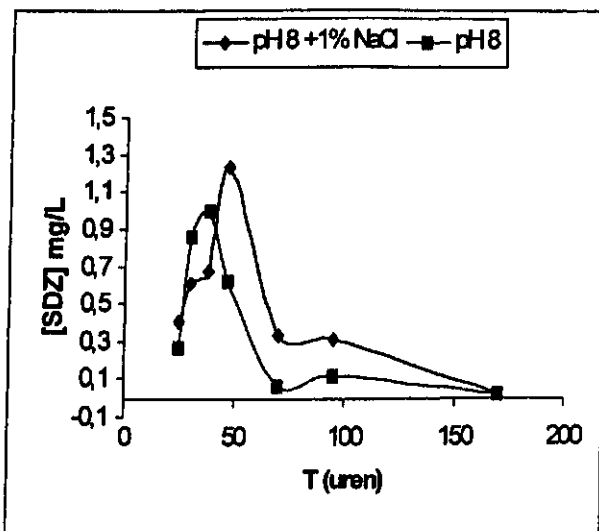
*Figuur 2 Gehalten SDZ in water gedurende dosering.*

### 3.2 SDZ in plasma

In figuur 3 is het verloop weergegeven van het SDZ gehalte in plasma van paling onder de verschillende experimentele condities.

SDZ kon in plasma worden aangetoond vanaf ca 7 uur na toediening. Het verloop van gehalte in de tijd was voor alle systemen vergelijkbaar. In eerste instantie nam het SDZ gehalte toe tot een maximum bereikt werd na ca 45 uur na toediening. Vervolgens nam het gehalte langzaam af tot gehalten onder de detectiegrens na ca 170 uur.

Vlak vóór beëindiging van de toediening worden onverwacht lage gehalten gevonden waarvoor geen verklaring gevonden kon worden. Dit verschijnsel doet zich echter bij palingen uit alle vier systemen voor.

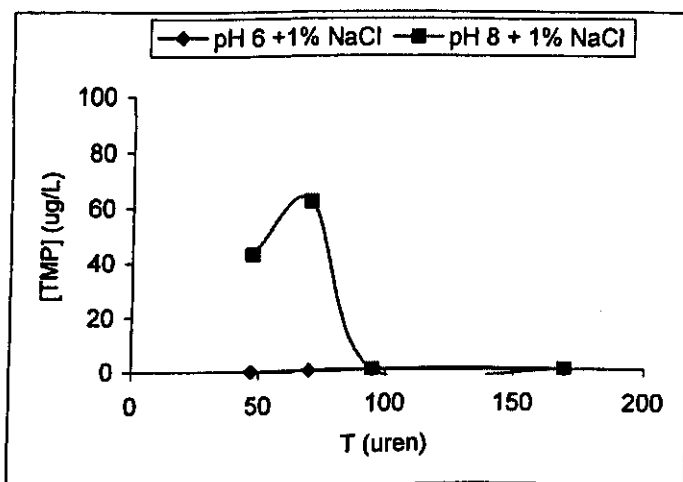


*Figuur 3 Plasma-gehalten SDZ in paling gehuisvest bij vier verschillende waterkwaliteiten*

### 3.3 TMP in plasma

Het TMP gehalte in plasma van paling is bepaald in de systemen I en II, respectievelijk pH 6 en pH 8,4, beiden met 1% zout.

TMP kon in plasma alleen worden aangetoond in het systeem met pH 8,4. Bovendien waren de gevonden gehalten heel laag. Al op het eerste bemonsteringstijdstip na het staken van de behandeling kon er geen TMP meer in plasma worden aangetoond (fig 4).



Figuur 4 Invloed van pH op plasma gehalten TMP in paling.

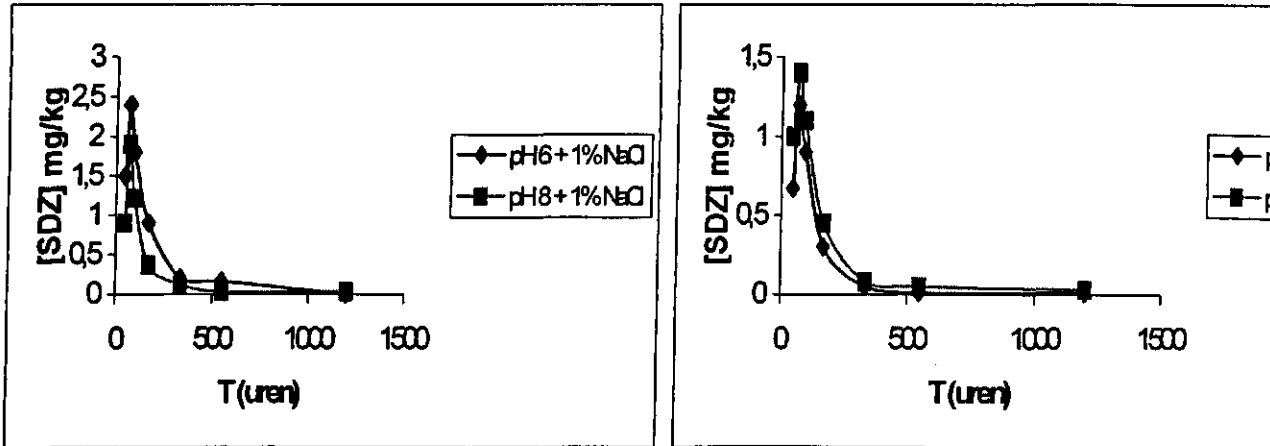
De verhouding tussen SDZ en TMP in plasma was veel lager dan 5:1. In de uitgevoerde experimenten werd een verhouding van niet meer dan ca 40:1 gehaald, bij pH 8,4 en 1% zout in het water. Het is onwaarschijnlijk dat bij deze verhouding nog een optimaal therapeutisch effect zou worden bereikt. De verhouding SDZ:TMP en de mogelijkheden deze verhouding via de toedieningsvorm en waterkwaliteit te beïnvloeden moeten in volgende experimenten onderzocht worden. Daarnaast is onderzoek van de therapeutische effectiviteit in een praktijk experiment noodzakelijk. Daarbij moet bij voorkeur het op basis van laboratorium experimenten geoptimaliseerde toedieningsregime worden toegepast.

### 3.4 SDZ in spiervlees

In figuur 5 is het verloop weergegeven van het SDZ gehalte in spiervlees van paling onder de verschillende experimentele condities.

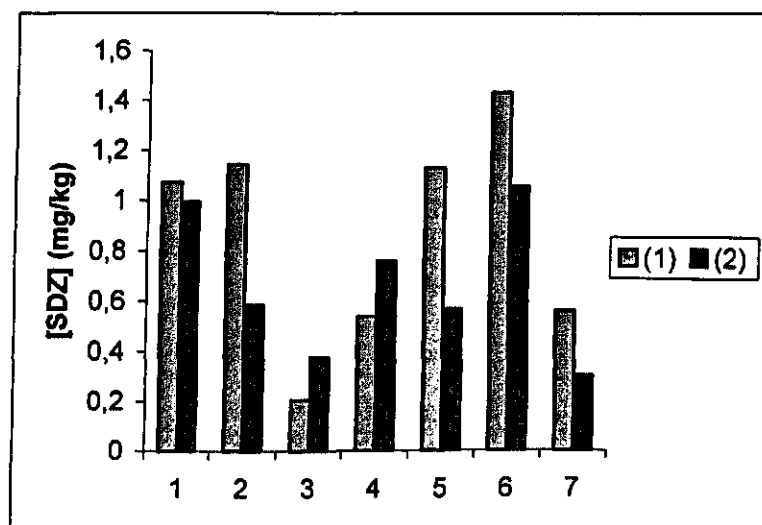
De verschillende condities vertoonden allen dezelfde tendens in de uitscheiding van SDZ.

Na een aanvankelijk hoog SDZ gehalte, nam het gehalte vrij snel af tot waarden rond de 100 µg/kg na verloop van ca 350 uur (14 dagen) na toediening. De bemonsteringstijdstippen lagen



*Figuur 5 Invloed van pH en zoutgehalte op de gehalten SDZ in spiervlees van paling.*

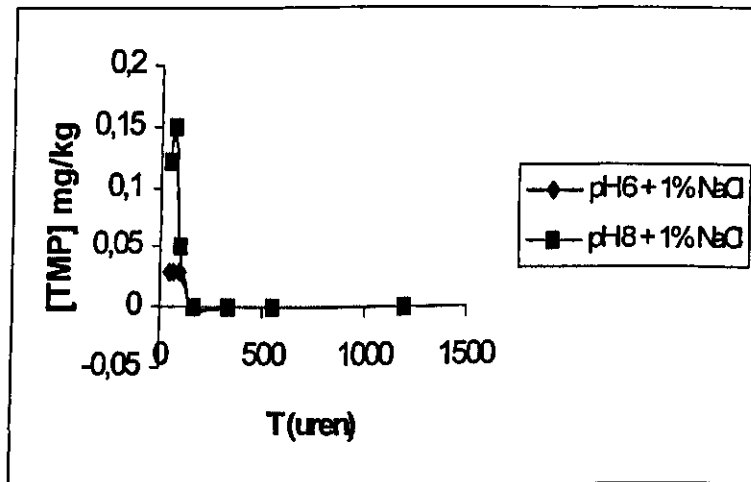
na dat tijdstip vrij ver uit elkaar waardoor het verdere verloop van de uitscheiding moeilijk in kwantitatieve zin te volgen was. Verdere afname van het gehalte tot onder de LOQ waarde van 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  leek echter traag te verlopen. Dat werd geïllustreerd door het feit dat ook na langere tijd (ca 550 uur na toediening), in de groepen I, II en IV, in individuele monsters nog SDZ gehalten werden gevonden die rond de beoogde targetwaarde van 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  liggen. De spreiding tussen individuele palingmonsters was groot (fig. 6). Alhoewel slechts incidenteel de beoogde targetwaarde werd overschreden, was de invloed van deze spreiding op de bepaling van de wachtermijn ( $p = 0.01$ ), vrij groot. Mede daardoor was de wachtermijn die uit de beschikbare gegevens bepaald kan worden, vrij lang; gemiddeld ca. 50 dagen.



*Figuur 6. Gehalten SDZ in (1) vlees (na 100 uur) en (2) plasma (na 45 uur), bepaald in zeven individuele dieren.*

### 3.5 TMP in spiervlees

In systeem I en IV waren de TMP gehalten allen onder of slechts marginaal boven de beoogde maximum residu limiet (MRL) van 50 µg/kg. Het monster met het hoogste TMP gehalte in systeem I bevatte 34 µg/kg en in systeem IV 52 µg/kg. In systemen II en III werden hogere gehalten TMP gevonden; tot 350 µg/kg in systeem II en 120 µg/kg in systeem III. Ook hier is de spreiding tussen individuele palingmonsters groot.



Figuur 7. Invloed van pH op de gehalten TMP in spiervlees van paling.

Voor TMP werd eveneens een lange wachtermijn van ca. 50 dagen berekend. Niettemin moet worden geconstateerd dat vanaf ca. 100 uur na toediening, in zowel systeem II als in systeem III, geen TMP gehalten boven de beoogde MRL waarde van 50 µg/kg werden gevonden. De oorzaak van de lange wachtermijn die uit de berekening volgt, moet dan ook gezocht worden in de statistische onzekerheid die veroorzaakt wordt door de spreiding tussen individuele monsters.

De verhouding tussen SDZ en TMP in spierweefsel is veel lager dan 5:1. In de uitgevoerde experimenten wordt een verhouding van niet meer dan ca 10:1 gehaald.

## 4. Discussie

Eén van de doelstellingen van dit onderzoek was informatie te verkrijgen over de therapeutische effectiviteit die van de badbehandeling mag worden verwacht en de invloed van de waterkwaliteit daarop. Uit figuur 3 blijkt dat er slechts een geringe invloed was van de pH en het zoutgehalte op de opname van SDZ en de bereikte plasma spiegels. Onder alle vier de onderzochte condities werd SDZ goed opgenomen en werden bloedspiegels bereikt die in de orde van 1 mg/L plasma lagen. Dat is ruimschoots boven de MIC waarde zoals die eerder

voor een aantal vispathogenen in een in-vitro experiment door Kimura *et al.* [5] werd bepaald voor een gepotentieerde sulfa. Wellicht is vanuit economisch oogpunt verdere optimalisatie van de dosering gewenst.

Het effect van de pH op de opname van TMP en daarmee op de resulterende bloedspiegels was echter in tegenstelling tot SDZ, zeer sterk (fig 4). In systeem I (pH 6, 1% zout) werd geen TMP in het plasma gevonden terwijl in systeem II (pH 8, 1% zout) een gehalte TMP van maximaal 0.06 mg/L werd gemeten. De invloed van de pH op de opname werd bevestigd door de gehalten TMP die in het spiervlees werden aangetroffen (fig 7); ook deze gehalten zijn laag bij lage pH en hoger bij hoge pH.

Uitgaande van het model opgesteld door Shore *et al.* [6] zou de pH volgens onderstaande formule van invloed zijn op de opname van antibiotica vanuit water:

$$C_{\text{vis}}/C_{\text{water}} = (1+10^{\text{pKa}-\text{pHvis}}) / (1+10^{\text{pKa}-\text{pHwater}})$$

De  $\text{pK}_a$  van SDZ is 6.4 en die van TMP is 7.2. Bij een pH van respectievelijk 6 en 8.4 van het water, resulteert dat in een verhouding vis-water van resp. 0.31 en 1.09 voor SDZ en respectievelijk 0.09 en 1.54 voor TMP. Met name voor TMP blijkt dat de opname door de vis bij lage pH, conform het bovenstaande model, vrijwel nihil is terwijl bij hogere pH TMP in het bloedplasma aangetoond kan worden. Niettemin verliep de opname van TMP duidelijk minder goed dan voor SDZ. Voor SDZ waren de verschillen veel kleiner en niet geheel in overeenstemming met de verwachtingen op basis van dit model.

De verhouding tussen SDZ en TMP in het gedoseerde preparaat is 5:1, echter in het plasma werd bij pH 8.4 (systeem II) een verhouding bereikt van niet meer dan ca 15:1. Weliswaar is het TMP-gehalte in plasma alleen in systeem I en II bepaald maar correlatie met de gehalten van TMP in spiervlees, doet vermoeden dat de zoutconcentratie eveneens van invloed is op de opname van TMP. Een hogere zoutconcentratie zou de opname van TMP kunnen bevorderen, evenals dat het geval was voor SDZ. De bloedspiegels voor TMP zouden dan ook lager zijn geworden in systeem III dan in systeem II en daarmee zou de verhouding SDZ:TMP nog verder verhoogd zijn. De vraag rijst of een dergelijke SDZ:TMP verhouding voldoende is om het gewenste therapeutische effect te bereiken. In een vervolg-onderzoek moet onderzocht worden of de behandeling verder geoptimaliseerd kan worden door dosering in een lagere verhouding SDZ:TMP

Het gehalte SDZ dat in spiervlees gevonden werd, was eveneens veel hoger dan het gehalte TMP. Terwijl voor SDZ maximale gehalten van rond 2000 µg/kg werden gevonden, kwam het TMP gehalte niet hoger dan ca. 300 µg/kg. Uitscheiding van SDZ en TMP verliep relatief traag.

Bovendien was de spreiding tussen individuele palingmonsters groot. Alhoewel reeds 350 uur (ca. 14 dagen) na toediening slechts incidenteel de beoogde targetwaarde werd overschreden, was de invloed van deze spreiding op de bepaling van de wachtermijn ( $p = 0.01$ ), vrij groot. Mede daardoor was de wachtermijn die uit de beschikbare gegevens bepaald kan worden, vrij lang: zo'n 50 a 60 dagen. Hoewel veel langer dan voor andere landbouwhuisdieren, lijkt dit gezien de lange teeltcyclus van paling, een bruikbare wachtermijn. De oorzaak van de lange wachtermijn die uit de berekening volgt, moet dan ook gezocht worden in de statistische onzekerheid die veroorzaakt wordt door de spreiding tussen individuele monsters. De verhouding tussen SDZ en TMP in spierweefsel is veel lager dan 5:1. In de uitgevoerde experimenten wordt een verhouding van niet meer dan ca 10:1 gehaald

In tegenstelling tot de opname, was er slechts een gering effect van de waterkwaliteit op de uitscheiding. Bij hogere pH was het maximale gehalte voor SDZ iets hoger dan bij lage pH. Voor TMP was dit verschil veel duidelijker. De pH leek niet of nauwelijks van invloed op de uitscheidingskinetiek. Het zoutgehalte leek een gering effect te hebben op SDZ waarbij in aanwezigheid van zout de uitscheiding iets sneller leek te verlopen. Het was echter gezien de verschillen tussen individuele dieren en de omvang van de proef niet mogelijk statistische significantie te verkrijgen en ook de berekening van de wachtermijn werd gedomineerd door spreiding tussen individuele dieren en nauwelijks door de waterkwaliteit.

## **5. Conclusies**

- De badbehandeling van paling met trimethosulfmix bleek te resulteren in bloedspiegels voor sulfadiazine die ruimschoots hoger waren dan de MIC. Trimethoprim werd echter veel minder goed opgenomen hetgeen resulteerde in veel lagere bloedspiegels. De verhouding SDZ:TMP en daarmee de effectiviteit van de therapie werd daardoor sterk beïnvloed. De waterkwaliteit bleek bovendien van grote invloed op de opname van met name TMP. In vervolgonderzoek moet de verhouding SDZ:TMP in het bloedplasma geoptimaliseerd worden via zowel beheersing van de waterkwaliteit als via de verhouding SDZ:TMP in de dosering.
- Uitscheiding van SDZ verliep relatief traag. Op basis van de beschikbare gegevens werd een wachtermijn berekend ( $p=0.01$ ) van ca. 50 dagen. Deze wachtermijn was voor SDZ vrijwel



onafhankelijk van de waterkwaliteit maar werd grotendeels bepaald door de grote verschillen tussen de gehalten in individuele dieren en de daarmee gepaard gaande statistische onzekerheid.

-Voor TMP werd een vergelijkbare wachtermijn berekend echter door het lage gehalte TMP, de grote verschillen tussen individuele dieren en het geheel afwezig zijn van TMP in de palingen die bij pH 6 gehouden werden, waren voor TMP te weinig data beschikbaar om meer dan een grove schatting van de wachtermijn te kunnen geven.

### Referenties

- [1] Kamstra, A., H.J. Keukens en O.L.M.Haenen, De kinetiek van opname en eliminatie van trimethoprim en sulfadiazine bij Europese aal in een recirculatiesysteem; verkennend onderzoek. RIVO rapport C071/98.
- [2] Dagorn, M. en J.M. Delmas, *Anal.Chim.Acta* (1994) **285**: 353-358
- [3] RIKILT standaard voorschrift A0645; Vlees-bepaling en bevestiging van sulfonamiden.
- [4] RIKILT standaard voorschrift A0594; Paling-bepaling van sulfadiazine en trimethoprim
- [5] Kimura, T., M. Yoshimizu en M. Wada, *J. Fish Diseases*, (1983)**6**: 525-532
- [6] Shore, P.A., B.B. Brodie en C.A.M. Hogben, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1957) **119**: 361-369.