

Projectnummer: 101.7020

Ir. H. Stegeman

Rapport 92.39

juli 1992

ONDERZOEK NAAR DE AANWEZIGHEID VAN ANTIMICROBIËLE RESIDUËN EN PATHOGENE BACTERIËN IN UIERS VAN SLACHTRUNDEREN

Dr. J.F.M. Nouws (RIKILT-DLO), S. Katoen (RVV), Ir. A.E.M. Vermunt (RIKILT-DLO),
E. Buis (RVV), I. Ladenius (RVV) en E. Streutjens (RIKILT-DLO)

Dit rapport is tot stand gekomen in samenwerking met RVV Kring Leeuwarden,
Postbus 2007, 8901 JA Leeuwarden

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwproducten (RIKILT-DLO)

Afdeling Microbiologie en biotechniek

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1992, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van inhoud toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

hoofden onderzoekafdelingen

projectleiders

public relations en secretariaat

circulatie

bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Techniek

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees Centraal

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (Kringlaboratoria)

Regionale Inspectie VG (Gld)

ABSTRACT

Onderzoek naar aanwezigheid van antimicrobiële residuen en pathogene bacteriën in uiers van slachtdieren

The incidence of antimicrobial residues and pathogenic bacteria in udders from slaughtered cows (in Dutch)

Report 92.39

July 1992

J.F.M. Nouws, S. Katoen, A.E.M. Vermunt, E. Buis, I. Ladenius, E. Streutjens

DLO-State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

RVV-District Leeuwarden, P.O. Box 2007, 8901 JA Leeuwarden, The Netherlands

4 tables, 5 references

In 1989 175 lactating udders of slaughtered cows were investigated on the presence of pathogenic bacteria and antimicrobial residues at the RVV laboratory Leeuwarden (in cooperation with RIKILT-DLO, Wageningen). In one udder antimicrobial residues (penicillin) could be detected. *Staphylococcus aureus* could be isolated in 14.9 % of the udders; no *Streptococci* spp. and *Clostridia* spp. could be detected in udder tissues.

Keywords: Antimicrobial residues - pathogenic bacteria - udders - cows

SAMENVATTING

In 1989 werden op het RVV-kringlaboratorium te Leeuwarden in samenwerking met RIKILT-DLO 175 goedgekeurde uierweefsels van lacterende runderen onderzocht op de aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen en pathogene micro-organismen.

Bacteriegroeiremmende stoffen (penicilline) werden slechts eenmaal aangetoond. Uit 14.9 % van de onderzochte uierweefsels kon *Staphylococcus aureus* geïsoleerd worden; er werden geen *Streptococci* spp. en *Clostridia* spp. aangetoond.

INHOUD	blz
ABSTRACT	3
SAMENVATTING	5
1. INLEIDING	9
2. MATERIAAL EN METHODEN	10
2.1 Monstername	10
2.2 Microbiologisch onderzoek	10
2.3 Residu-onderzoek	10
3. RESULTATEN EN DISCUSSIE	13
4. DISCUSSIE	14
5. CONCLUSIE	15
6. REFERENTIES	15

1. INLEIDING

Na goedkeuring bij het slachten kunnen uiers van runderen bestemd worden voor verwerking in produkten voor humane consumptie. De geslachte keuring uitgevoerd door keurmeesters van de RVV (Rijksdienst voor de keuring van vee en vlees) bestaat, na verrichting van de voorgeschreven insnijdingen, uit visuele en organoleptische beoordeling van de sneevlakken; bij macroscopische afwijkingen worden uiers afgekeurd. Onderzoek van uiers op aanwezigheid van residuen en/of pathogene micro-organismen gebeurt niet en deze parameters worden dientengevolge in de keuringsbeslissing niet meegewogen.

Pathogene micro-organismen, zoals *Streptococci* spp., *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces* (*Corynebacterium*) *pyogenes*, kunnen uierontsteking veroorzaken, die bij de geslachte keuring alleen dan opgespoord kunnen worden indien deze klinisch manifest zijn. Het is echter bekend dat *S.aureus* en *Streptococci* spp. subklinische mastitiden kunnen veroorzaken, die alleen met laboratoriumonderzoek traceerbaar zijn. Het percentage subklinische mastitiden kan van koppel tot koppel verschillen en kan oplopen tot 25 % van de koeien (2,4).

Klinische mastitiden worden in het algemeen behandeld met antibiotica via intramammaire of intramusculaire toediening (= mastitis-therapie) (3,4). Hoewel de wachttermijn in verband met melkleverantie en slachten bij de definitief geregistreerde produkten bekend is, kunnen bij niet-naleving ervan antimicrobiële residuen in uiers van geslachte koeien voorkomen.

Bij droogzetten van koeien (einde laktatie) worden lang-werkende antibioticumprodukten intramammair toegediend met een tweeledig doel, namelijk subklinische mastitiden te bestrijden (therapie) en om te voorkomen dat er uierinfecties optreden tijdens de droogstand (preventie). Antibiotica die van nature slecht geresorbeerd worden of die verwerkt kunnen worden in slow-release produkten, komen in eerste instantie in aanmerking voor de droogzettherapie. In het algemeen wordt ervan uitgegaan dat na droogzetten de antibiotica minimaal 3 weken in het uier aanwezig moeten blijven om te voldoen aan deze twee doelstellingen (4). De persistentie kan per produkt en per dier sterk variëren. De residuen van dit type produkten zouden vooral bij zgn. "worstkoeien" aangetroffen kunnen worden.

Uit het voorgaande mag duidelijk zijn dat een mogelijke aanwezigheid van pathogene micro-organismen en antimicrobiële residuen in uiers van slachtkoeien niet uit te sluiten is.

Het doel van dit onderzoek was drieledig, nl het vaststellen van:

1. bacteriële besmetting van het inwendige uierweefsel
2. incidentie van pathogene micro-organismen
3. incidentie van antimicrobiële residuen

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Monstername

Op een lokatie werd 200 gram per goedgekeurde uier (n= 175) binnen 2 uur na het slachten aseptisch bemonsterd en daarna zo spoedig mogelijk op het RVV kringlaboratorium te Leeuwarden als volgt verwerkt.

2.2 Microbiologisch onderzoek

Op het laboratorium werd van ieder monster 20 gram uierweefsel aseptisch afgewogen. Met pepton fysiologische zoutoplossing werd een steriele verdunning van 1 op 10 gemaakt en daarna werd het geheel gemalen. Het microbiologische onderzoek van de bovenstaande vloeistof betrof de volgende parameters:

Totaal aeroob kiemgetal

Enterobacteriaceae

Staphylococcus aureus

Streptococci spp.

Clostridium perfringens

De methoden van onderzoek zijn samengevat in tabel 1.

2.3 Residu-onderzoek

Voor het screeningsonderzoek op bacteriegroeiremmende stoffen werden 5 verschillende testplaten gebruikt, nl:

B.calidolactis plaat (Plaat A)

M.luteus pH 8 plaat (Plaat B)

B.subtilis BGA pH 8 plaat (Plaat C)

B. cereus plaat (Plaat D)

NNNT-plaat (Plaat E)

Hiertoe werden van ieder monster 10 stukjes uierweefsel van 8 mm doorsnee uitgeponst en in duplo op voornoemde platen gelegd. Bij plaat E werd op alle stukjes TMP-2 (trimethoprim oplossing van 2 µg/ml) gedruppeld.

Na incubatie volgens voorschrift werd de groeiremming rondom het weefselstukje gemeten. Bij remmingen > 20 mm werd een bevestigingsonderzoek uitgevoerd.

In het bevestigingsonderzoek werden de volgende platen gebruikt:

B.cereus TR plaat (voor tetracyclines) (Plaat F)

Penase plaat (voor penicillinederivaten) (Plaat G)

M.luteus DHSR plaat (voor streptomycine) (Plaat H)

Tevens werd van het weefsel, dat een remming > 20 mm vertoonde, stukjes van 20 g ingevroren (-30 °C) en naar het RIKILT gestuurd voor onderzoek met hoogspanningselectroforese.

Beschrijving van de testplaten zijn te vinden in de RIKILT voorschriften no A0509 en A0632 en zijn verkort weergegeven in tabel 2.

Tabel 1

Overzicht microbiologische methoden van onderzoek

Bepaling	Medium	Methode	Incubatie	Bevestiging
Kiemgetal	PCA-agar	mengplaat	2 dg 30°C	-
Staph. aureus	Mannitol Salt agar BP medium	spreidplaat spreidplaat	2 dg 37°C 2 dg 37°C	Agglutinatie/ coagulatie test- (Well-come)
Streptococcen	H.E.T. medium	mengplaat	2 dg 37°C	API strep
Enterobacteria- ceae	VRBG-agar	mengplaat + deklaag	1 dg 37°C	-
C.perfringens	T.S.C.-agar	mengplaat + deklaag	anaeroob 1 dg 37°C	zie ISO 7937

Tabel 2

Overzicht onderzoeksmethoden voor bacteriegroeiremmende stoffen

Plaat	Medium	pH	Teststam	Incubatie
A	Milkagar	7,0	B.calidolactis	4 - 5h bij 60 °C
B	St II Nahragar	8,0	M.luteus	18-20h bij 30 °C
C	Milkagar	8,0	B.subtilis BGA	18-20h bij 30 °C
D	St II Nahragar	6,0	B.cereus	18-20h bij 30 °C
E	NNNT	7,0	B.subtilis BGA	13-18h bij 37 °C
F	zie D		B.cereus TR	16-20h bij 30 °C
G	zie A		B.calidolactis + penase	4 - 5h bij 60 °C
H	zie B		M.luteus DMSR	18-20h bij 30 °C

3. RESULTATEN

In de tabellen 3 en 4 wordt weergegeven in welke frequentie en in welke mate de onderzochte uierweefsels (pathogene) bacteriën bevatten. De aantallen zijn logaritmisch uitgedrukt in kolonievormende eenheden per gram (k.v.e.) weefsel. Onderscheid is gemaakt in uiers afkomstig van normale slachtrunderen (categorie A) en uiers afkomstig van worstkoeien (categorie B).

Tabel 3

Aantal uiers waarin (pathogene) bacteriën zijn aangetoond.

Aantal uiers	Clostridium perfringens	Strepto- coccen	Entero- bacteriaceae	S. aureus
100 (A)	0	0	8 (8%)	14 (14%)
75 (B)	0	0	5 (6.7%)	12 (16%)

A = slachtrunderen B = worstkoeien

Tabel 4

Besmetting van uiers waarin (pathogene) bacteriën zijn aangetoond (per besmettingsniveau is het aantal monsters weergegeven).

Log kve/g (a)	Entero- bacteriaceae		S. aureus		Aeroob kiemgetal	
Cat.	A	B	A	B	A	B
<1,3	8	4	1	0	2	3
1,3- 2		1	6	6	18	13
2 - 3			3	3	58	45
3 - 4			4	3	20	11
4 - 5					2	3

(a) kve = kolonievormende eenheden

In 75 % van de uierweefsels (A+B) was het totaal kiemgetal groter dan 100 kve/g. Er bleek geen verschil te bestaan tussen de bacteriologische gesteldheid van categorie A en B rund.

Bij onderzoek op bacteriegroeiremmende stoffen is eenmaal penicilline aangetoond. Het RIKILT heeft via hoogspanningselectroforese de aanwezigheid van penicilline bevestigd.

4. DISCUSSIE

Het hoge percentage uiers (14,9%) waaruit *S. aureus* bacteriën geïsoleerd konden worden, ligt binnen de normale spreiding van de opgegeven literatuurdata voor melk (2,3,4).

Clusters staphylococcon kunnen in een "rustfase" in het interstitium van het uier voorkomen met de mogelijkheid om plotseling klinisch manifest te worden. Therapeutisch vormen zij een probleem. Bij persisterende infecties en bij falen van de therapie is slachten van de koe een standaardadvies. De kiemcijfers ad random verkregen geven aan, dat de mate van besmetting met *S. aureus* (gebaseerd op kve) aanzienlijk kan zijn. Microbiologische normen voor uiers van geslachte runderen ontbreken. In dit verband is het vermeldenswaard, dat voor gehakt de EEG-norm voor *S. aureus* op maximaal 500 k.v.e./g is gesteld (5). Hantering van deze norm voor uierweefsel zou betekenen, dat ongeveer 50 % van *S. aureus* positieve monsters (= 7 % van alle onderzochte uiers) boven deze EEG norm lag.

Voorkomen en genezen van subklinische *S. aureus* infecties is vooralsnog een onhaalbare zaak. Technologische (Good Manufacturing Practice) oplossingen gevolgd door een onmiddellijke koeling van de uiers en een adequate verhitting van het eindproduct kunnen eventuele volksgezondheidsproblemen voorkomen.

De frequentie van antibioticaresiduen in uiers was laag. Slechts eenmaal werd een antibioticum (penicilline) aangetoond. Het is bekend dat in het algemeen mastitisformuleringen kort (<5 dagen) in het uier persisteren (lakterende koeien). Het lage percentage positieve bevindingen bij de categorie worstkoeien (veelal in of tegen de droogstand verkerende) wijst op het feit dat melkveehouders niet onnodig hun koeien droogzetten, met andere woorden de droogzettherapie selectief toepassen. In hoeverre sterk weefselgebonden residuen (bv polymyxines, aminoglycosides) met de gebezigde methoden opgespoord kunnen worden, is een open vraag.

5. CONCLUSIE

Uit dit onderzoek blijkt dat er weining verschil is in bacteriologische gesteldheid en residustatus tussen uiers afkomstig van "worstkoeien" en koeien met een gemiddelde vleeskwiteit. Slechts eenmaal werd in een uier een antibioticum (penicilline) gedetecteerd. De frequentie van staphylococceninfecties lag op 14,9%. Gezien de bacteriologische gesteldheid van het uierweefsel dient de verwerking ervan tot produkten voor menselijke consumptie aan strenge GMP-eisen (o.a. koeling en verhitting) te voldoen.

6. REFERENTIES

1. Francis, P.G.
Mastitis therapy. Brit. Vet. J. 145,302-311(1989).
2. McDonald, J.S.
Streptococcal and staphylococcal mastitis. The Veterinary Clinics of North America (Symposium on bovine mastitis), 6,269-285(1984).
3. Owens, W.E., Watts, J.L., Boddie, R.L., Nickerson, S.C.
Antibiotic treatment of mastitis: comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies. J.Dairy Sci., 71, 3143-3147 (1989).
4. Prescott J.F., and Baggot J.D.
Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Blackwell Scientific Publ., Boston, 1988.
5. EEG-richtlijn Veterinaire Aangelegenheden.
88/657/EEG-14 Dec. 1988