

Survey pathogenen en bacteriële resistentie in kipproducten uit biologische teelt, Jaar 2004

**H. van der Zee
B. Wit
A. R. Vollema**

**Voedsel en Waren Autoriteit / Keuringsdienst van Waren Oost
Afdeling Signalering VP**

**Postbus 202
7200 AE Zutphen
tel: 0575 - 588100
fax: 0575 - 588200
E-mail: OT@VWA.nl**

**Project nr: OT 04H005
Augustus 2005**

INHOUD

SAMENVATTING	3
SUMMARY	3
TREFWOORDEN	3
1 INLEIDING	4
2 MATERIAAL EN METHODEN	4
2.1 Materiaal	4
2.2 Methoden	4
3 RESULTATEN	5
4 VERGELIJKING BIOLOGISCH - REGULIER	7
5 DISCUSSIE	9
6 CONCLUSIE	10
7 LITERATUUR	10

SAMENVATTING

In deze survey werd van kip(producten) afkomstig van "biologische" teelt het besmettingspercentage bepaald met *Salmonella* spp. en thermofiele *Campylobacter* spp. Daartoe werden in 2004 in de detailhandel 188 monsters genomen van kipproducten afkomstig van biologische teelt. De monsters werden door het hele jaar genomen in alle regio's en onderzocht op aanwezigheid van *Salmonella* en *Campylobacter*. Tevens werden *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis* en *Enterobacter faecium* geïsoleerd ten behoeve van bepaling van antibacteriële resistentie.

Uit de resultaten blijkt dat er van de monsters van biologische teelt 2,1% besmet is met *Salmonella*, en 43,9% met *Campylobacter*. Als men deze getallen vergelijkt met die als in 2004 verkregen bij monsters van reguliere teelt (*Salmonella* 7,4%, *Campylobacter* 29,3%) blijkt dat van de monsters van biologische teelt een significant ($P < 0.01$) lager percentage besmet is met *Salmonella*, maar een significant ($P < 0.01$) hoger percentage met *Campylobacter*.

Bij vergelijking van de resultaten van de resistentiebepalingen valt bij *E. coli* op dat bij monsters uit de intensieve pluimveehouderij tegen meer middelen (11) resistentie wordt gevonden en indien bij een middel monsters van beide teeltwijzen resistent zijn, bij de reguliere teelt een hoger percentage resistent is. Dit bleek significant hoger te zijn bij amoxicilline, trimethoprim en trimethoprim-sulfamethoxazole. Bij *E. faecalis* bestaat er bij reguliere monsters eveneens resistentie tegen meer middelen (9) dan bij biologische monsters (4), maar bij middelen waarbij monsters van beide teeltwijzen resistent zijn is er bij biologische teelt vaker een hoger percentage resistent. Dit verschil was significant bij doxycycline ($P < 0.05$).

E. faecium vertoont bij reguliere monsters resistentie tegen meer middelen (8) dan bij monsters van biologische teelt (7), en bij resistentie van een middel bij monsters van beide teeltwijzen is bij de reguliere teelt een hoger percentage resistent. Dit was significant bij bacitracine ($P < 0.05$), doxycycline ($P < 0,01$) en erythromycine ($P < 0,001$).

SUMMARY

In this survey poultry products from organic production were investigated for *Salmonella* and *Campylobacter*. For this purpose 188 samples were taken throughout the year 2004 in retail shops. Also *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis* and *Enterobacter faecium* were isolated for determination of antimicrobial susceptibility.

The results show that 2.1% of the samples contained *Salmonella* and 43.9% *Campylobacter*. Compared to the percentages determined in poultry from conventional production in 2004 (*Salmonella* 7.4%, *Campylobacter* 29.3%) it appears that samples from organic origin are significantly lower contaminated with *Salmonella* ($P < 0.01$) but contain significantly higher levels of *Campylobacter*.

Comparing the results of the antimicrobial susceptibility it is noticed that in samples from conventional production for *E. coli* resistance to more substances (11) is found and in case of resistance occurring in both sample types a higher percentage resistance is found in conventional produced samples. This was significant for amoxicilline, trimethoprim and trimethoprim-sulphamethoxazole. In *E. faecalis* conventional samples show resistance to more substances (9) than organic produced (4), but in case of resistance in both sample types, in organically produced samples in more cases a higher percentage is found, being significant for doxycyclin ($P < 0.05$). In *E. faecium* resistance to more substances was found in conventional samples (8) than in biological (7), and in case of resistance occurring in both sample types in conventional produced samples a higher percentage was resistant, being significant for bacitracin ($P < 0.05$), doxycyclin ($P < 0,01$) and erythromycin ($P < 0,001$).

TREFWOORDEN

Kipproducten; biologische teelt; *Salmonella*; *Campylobacter*; bacteriële resistentie

1 INLEIDING

Salmonella en *Campylobacter* zijn de voornaamste veroorzakers van voedselinfecties bij de mens. Aangezien rauwe kip(product) van nature met deze organismen is besmet, is dit een erkende bron van humane besmetting.

Als één van de hoofdoorzaken van de besmetting van kipvlees wordt nogal eens de intensieve vorm van veehouderij bij de reguliere productie genoemd. Als reactie op een aantal calamiteiten in de intensieve veehouderij is er de laatste jaren een versterkte belangstelling voor biologische voeding ontstaan, waarbij een duurzamere en diervriendelijker productiewijze toegepast wordt. In de beleving van de consument zou biologische voeding gezonder en veiliger zijn, iets waar echter door diverse deskundigen vraagtekens bij gezet worden, gezien de mogelijk verhoogde risico's op insleep van ziektekiemen door uitloop in de buitenlucht [7.1; 7.2].

Er zijn slechts weinig gegevens beschikbaar over de mate van voorkomen van *Salmonella* en *Campylobacter* bij producten van biologische teelt. In dit survey wordt het besmettingspercentage van kip(producten) met *Salmonella* spp. en thermofiele *Campylobacter* spp. afkomstig van "biologische" teelt bepaald. Hiermee kan nagegaan worden in hoeverre de mate van besmetting overeenkomt, of afwijkt van producten van niet-biologische (reguliere) oorsprong. Een ander aspect van biologische teelt betreft het gebruik van diergeneesmiddelen. Deze worden in de vleeskuikenhouderij op grote schaal toegepast. Hierbij zijn bij de biologische teelt strengere regels van kracht. Zo zijn coccidiostica niet toegestaan, antimicrobiële groeibevorderaars (AMBG's) en preventieve middelen, uitgezonderd vaccins mogen niet gebruikt worden. Curatieve middelen slechts in het uiterste geval, waarbij dan een tweemaal langere wachttijd in acht genomen moet worden dan bij reguliere teelt.

In dit survey wordt bij kipvlees van biologische teelt tevens van een drietal indicatororganismen de antibacteriële resistentie bepaald. Deze gegevens worden vergeleken met die als verkregen bij kip van reguliere teelt.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Materiaal

In 2004 werden 188 monsters genomen van kipproducten afkomstig van biologische teelt bij de detailhandel. De monsters werden door het hele jaar genomen in alle regio's.

De herkomst van 147 monsters kon aan de hand van EEG nummers met zekerheid worden bepaald. Van deze monsters bleken er 99 (67,3%) afkomstig uit België, 40 (27,3%) uit Nederland en 8 (5,4%) uit Frankrijk

2.2 Methoden

2.2.1. Een hoeveelheid monstermateriaal van 300 gram werd met een gelijke gewichtshoeveelheid BPW "gerinst". Van het monstermateriaal diende men dan representatief van alle delen tot 300 gram te nemen. Dit "rinsen" werd uitgevoerd door monster + vloeistof in een zak met minimum inhoud van 1000ml gedurende 5 minuten op een schudapparaat (rotaryshaker) bij 200 rpm te plaatsen.

2.2.2. De vloeistof werd vervolgens uitgegoten in de potten waarmee de salmonella-voorophoping uitgevoerd wordt. Van deze ± 300 ml BPW werd 250 ml geïncubeerd voor de bepaling van *Salmonella* en 25 ml in 225ml Boltonbroth gebracht voor de campylobacter-bepaling. De verdere selectieve bepalingen van *Campylobacter* en *Salmonella* spp. zijn verkort weergegeven in tabel 1, waarin: BPW = Buffered Peptone Water (Oxoid); MSR/V = Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (Oxoid); BGA = Brilliant Green Agar (Oxoid); MLCB = Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green agar; CCDA = Charcoal-Cephaperazone-Deoxycholate Agar.

Tabel 1. Isolatiemethoden pathogenen uit kipproducten

Organisme	Media	Incubatie
<i>Salmonella</i> spp.	BPW/MSRV/ BGA + MLCB	18±2h 37°C/1+2d 41,5±0,5°C/ 24h 37°C
<i>Campylobacter</i> spp.	Boltonbroth/ CCDA + Karmali	24h 41,5°C/ 48h 41,5°C microaëroob

Tevens werd in de helft van de monsters de bepaling op *E. coli* 44°C en *Enterococcus faecalis/faecium* verricht zijnde indicator-organismen voor bacteriële resistentieontwikkeling .

- *E. coli* SIG01-OT308
- *Enterococcus* SIG01-OT307.

De antibiotica-resistentie van de verschillende micro-organismen werd bepaald volgens de richtlijn van de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) met behulp de microbouillonverduunningsmethode op het ARIS Sensititre systeem (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK). Dit systeem is een commercieel verkrijgbare MIC (Engelse afkorting voor minimale remmende concentratie) techniek, die gebruik maakt van microtiterplaten waarop verschillende concentraties van gedroogde antimicrobiële stoffen zijn gecoat. De wells van de plaat werden volgens het voorgeschreven protocol beënt met de te onderzoeken bacteriestammen, waarbij Mueller Hinton II Bouillon als medium werd gebruikt. Vervolgens werden de titerplaten 18-22 uur aëroob bebroed (37°C) en daarna automatisch afgelezen door het ARIS-systeem. Voor de onderzochte micro-organismen werden verschillende sets van antibiotica getest (zie Tabel 2 en 3 voor respectievelijk *E. coli* en *E. faecalis/ E. faecium*). De minimale inhiberende concentraties (MIC's) werden gedefinieerd als de laagste antibioticumconcentratie zonder waarneembare bacteriegroei. Stammen met MIC's hoger dan het MIC-breekpunt werden geclassificeerd als resistent. Vervolgens werden resistentiepercentages berekend.

2.3 Statistische analyse van de data

Alle regressies zijn uitgevoerd met een binominaal model met logit link functie, waarbij de P-waarde de mate van significantie van een effect aangeeft. Meestal wordt een effect met een P-waarde < 0.05 significant verklaard.

3 RESULTATEN

De resultaten van het onderzoek naar aanwezigheid van pathogene micro-organismen in biologisch kipvlees staan vermeld in Tabel 2.

Tabel 2. Resultaten onderzoek naar aanwezigheid pathogene micro-organismen in kipvlees van biologische teelt (N=188).

	Aantal onderzocht	Aantal positief	Percentage (%)
<i>Salmonella</i>	187	4	2,1
<i>Campylobacter</i>	173	76	43,9

De 4 gevonden *Salmonella*-isolaten konden in drie serogroepen worden opgedeeld, namelijk Virchow (1), Agona (1), en Paratyphi B var. Java (2).

De resultaten van de resistentiebepalingen staan vermeld in Tabel 3, 4 en 5.

Tabel 3. Resultaten onderzoek resistentiebepalingen van *E. coli* in kipvlees van biologische teelt, 2003 vs.2004, middel, aantal onderzocht (N), percentage resistent (R%).

Middel	2003		2004	
	N	R%	N	R%
AMOXICILINE	45	26.7	41	22,0
CEFOTAXINE	45	2.2	41	0,0
CEFUROXIM	45	2.2	27	0,0
CHLORAMFENICOL	45	6.7	41	2,4
CIPROFLOXACIN	45	0.0	41	0,0
DOXYCYCLINE	21	38.1	nd	
FLORFENICOL	45	0.0	41	0,0
FLUMEQUINE	45	8.9	27	7,4
GENTAMICINE	45	2.2	41	0,0
IMIPENEM	45	0.0	41	0,0
NEOMYCINE	45	0.0	41	0,0
TRIMETHOPRIM	45	15.6	41	12,2
TRIM/SULFAMETHAZOLE	45	15.6	27	7,4
TETRACYCLINE	24	45.8	41	31,7
NALIDIXIC ACID	nd		14	14,3
SULFAMETHAZOLE	nd		14	64,3

Tabel 4. Resultaten onderzoek resistentiebepalingen *E. faecium* in kipvlees van biologische teelt, 2003 vs.2004, middel, aantal onderzocht (N), percentage resistent (R%).

	2003		2004	
	N	R%	N	R%
AMOXICILINE	16	0	20	0,0
BACITRACINE	16	13	20	15,0
CIPROFLOXACIN	16	0	20	10,0
DOXYCYCLINE	16	50	20	20,0
ERYTHROMYCINE	16	18.8	20	5,0
FLAVOMYCINE	16	56.3	20	60,0
GENTAMYCINE	16	0	20	0,0
PIRLIMYCINE	16	50	9	44,4
SALINOMYCINE	16	6.3	20	0,0
STREP >1000	16	0	9	0,0
STREP >2000	16	0	19	15,0
SYNERCYD	16	0	9	0,0
VANCOMYCINE	16	0	20	0,0
CHLORAMFENICOL	nd		11	0,0
LINEZOLID	nd		11	0,0

Tabel 5. Resultaten onderzoek resistentiebepalingen *E. faecalis* in kipvlees van biologische teelt, 2003 vs.2004, middel, aantal onderzocht (N), percentage resistent (R%).

	2003		2004	
	N	R%	N	R%
AMOXICILINE	19	0.0	17	0,0
BACITRACINE	19	31.6	17	35,5
CIPROFLOXACIN	19	0.0	17	0,0
DOXYCYCLINE	19	63.2	17	29,4
ERYTHROMYCINE	19	36.8	7	14,3
FLAVOMYCINE	19	15.8	17	0,0
GENTAMYCINE	19	0.0	17	0,0
PIRLIMYCINE	19	47.4	3	0,0
SALINOMYCINE	19	5.3	3	0,0
STREP >1000	19	15.8	3	0,0
STREP >2000	19	5.3	17	0,0
SYNERCYD	19	0	17	5,9
VANCOMYCINE	19	0	17	0,0
CHLORAMFENICOL	nd		14	0,0
LINEZOLID	nd		14	0,0

4 VERGELIJKING BIOLOGISCH - REGULIER

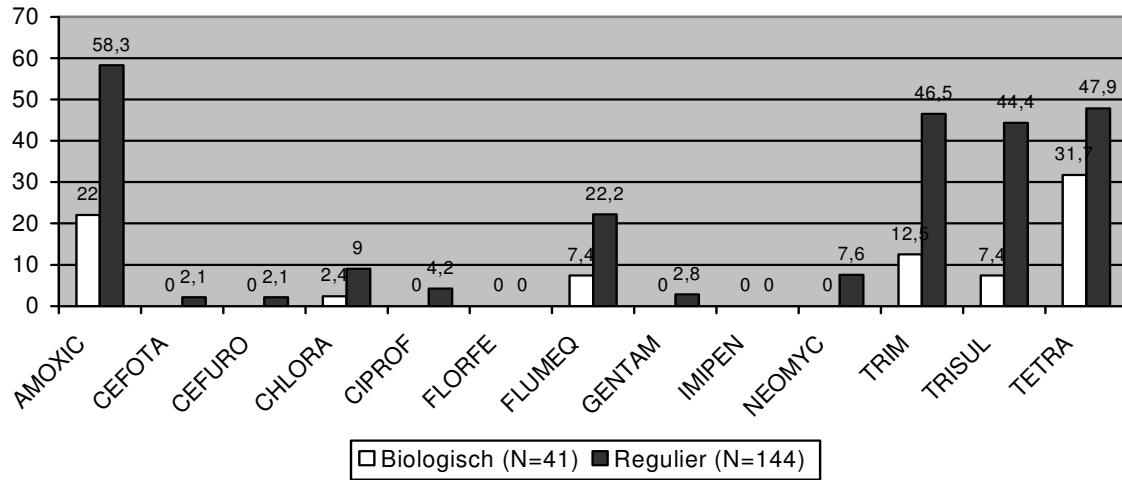
De vergelijking van de resultaten van besmetting met *Salmonella* en *Campylobacter*, en van de resistentie bepalingen van kipvlees van biologische teelt en "reguliere" teelt staan vermeld in tabel 6 en de figuren 1, 2 en 3.

Tabel 6. Besmetting (%) met *Salmonella* en *Campylobacter* van kipvlees van biologische teelt en "reguliere" teelt in 2003 en 2004

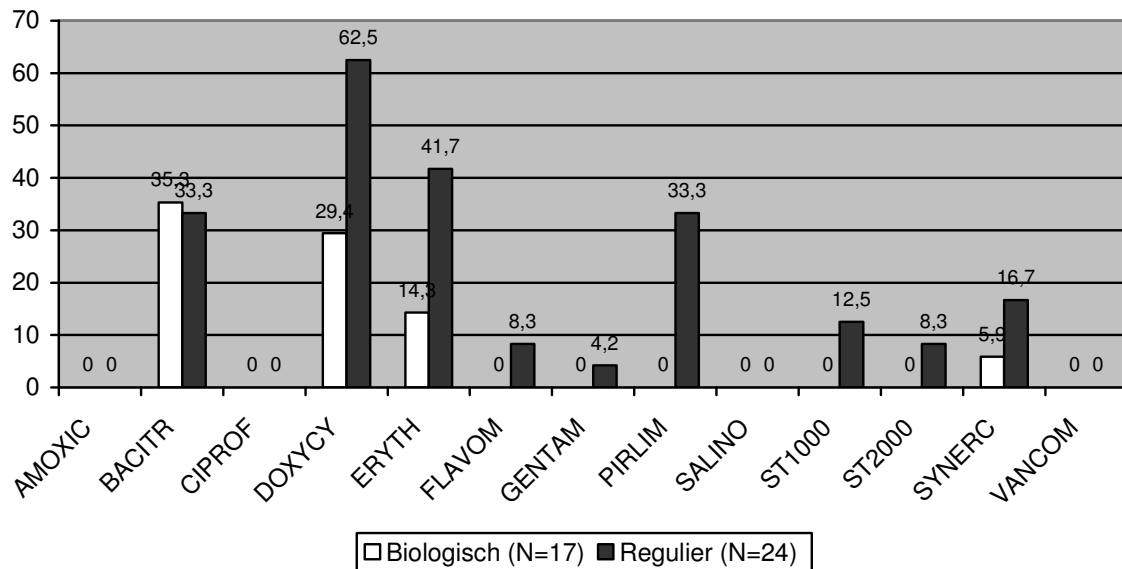
	<i>Salmonella</i>		<i>Campylobacter</i>	
	2003	2004	2003	2004
Regulier	11,2	7,4	25,9*	29,3
Biologisch	3,4	2,1	36,3*	43,9

*) De percentages besmetting met *Campylobacter* in 2003 zijn tot stand gekomen met een andere bepalingsmethode dan in 2004

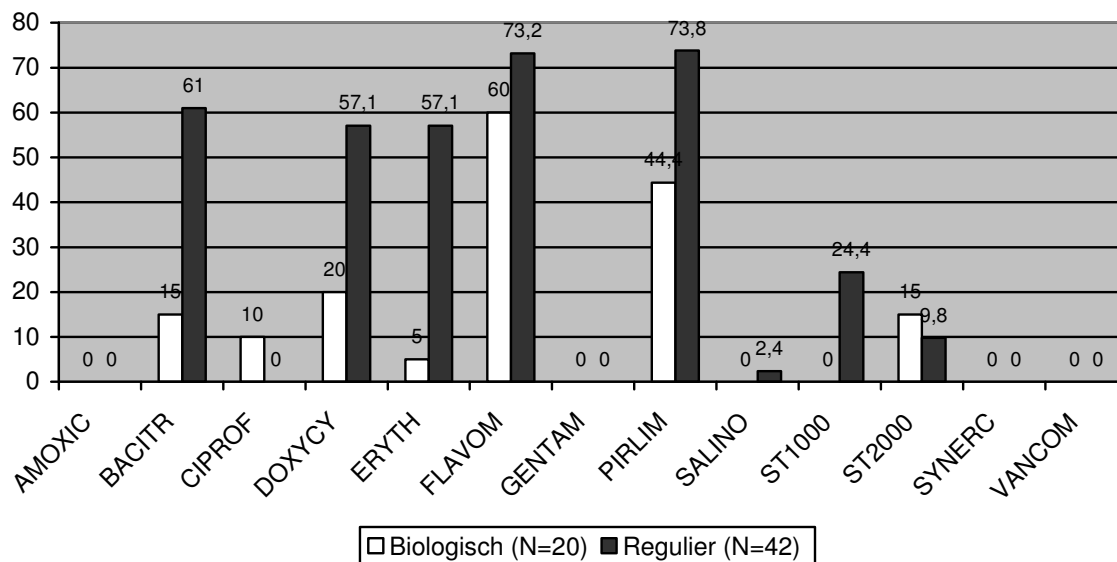
Figuur 1. Resistentiepatronen van *E. coli* van kipvlees van biologische teelt (N=41) en "reguliere" teelt (N=144) in 2004.



Figuur 2. Resistentiepatronen van *E. faecalis* van kipvlees van biologische teelt (n=17) en "reguliere" teelt (N=24) in 2004.



Figuur 3 . Resistentiepatronen van *E. faecium* van kipvlees van biologische teelt (N=20) en "reguliere" teelt (N=42) in 2004.



5 DISCUSSIE

Uit de resultaten als vermeld in Tabel 1 blijkt dat zowel *Salmonella* als *Campylobacter* aanwezig kunnen zijn in kipvlees van biologische teelt. Als men deze getallen vergelijkt met die als verkregen bij monsters van reguliere teelt [7.3] blijkt dat er van de monsters van biologische teelt een significant ($P < 0.01$) lager percentage besmet is met *Salmonella*, maar een significant ($P < 0.01$) hoger percentage met *Campylobacter*. Een zelfde patroon werd ook aangetroffen in een onderzoek van de Consumentenbond bij vergelijking van regulier en biologisch kippenvlees, bemonsterd in 2002 [7.4]. Betreffende *Salmonella* kan opgemerkt worden dat in 2004 het bij de reguliere monsters veelvuldig voorkomend serotype Paratyphi B var. Java werd aangetroffen bij de isolaten van de biologische teelt, wat in 2003 niet het geval was.

Uit de resultaten vermeld in de Tabellen 2 en 3 blijkt dat ook bij biologisch geteelde kip stammen van *E. coli*, *E. faecalis* en *E. faecium* geïsoleerd worden met resistentie tegen diverse middelen. Uit Tabel 2 blijkt dat bij *E. coli* substantiële resistentie vooral optreedt tegen middelen die reeds lang in gebruik zijn als amoxiciline, trimethoprim, chlooramfenicol en tetracycline. Tegen recentere middelen als ciprofloxacin, florfenicol, imipenem en cefotaxine werd geen resistentie aangetoond en op laag niveau tegen flumequine.

Bij vergelijking van de resultaten van *E. coli* behaald bij biologische kip en reguliere monsters (figuur 1) valt op dat bij monsters van reguliere teelt tegen meer middelen (11) resistentie wordt gevonden en indien bij een middel monsters van beide teeltwijzen resistent zijn, bij de reguliere teelt een hoger percentage resistent is. Dit bleek significant hoger te zijn bij drie van de middelen, te weten: amoxiciline, trimethoprim en trimethoprim-sulfamethoxazole. Hoewel de percentages resistentie in *E. coli* uit biologische kippen lager liggen, is het opvallend dat ondanks het lagere antibioticumgebruik wel enkele stammen worden geïsoleerd die resistent zijn tegen de quinolonen. Mogelijk is dit nog een overblijfsel uit een niet-biologisch verleden van de betrokken bedrijven, afkomstig uit de keten of uit de omgeving van de dieren. Dit toont aan dat de terugselectie naar een gevoelige darmflora slechts langzaam verloopt.

Bij *E. faecalis* ziet men resistentie tegen bacitracine, doxycycline, erythromycine en streptomycine, m.u.v. bacitracine, en in mindere mate erythromycine, allen curatieve middelen. De hoge resistentie bij stammen van biologisch geteelde dieren van bacitracine, een tot 1999 gebruikt AMBG, is niet direct te verklaren.

Bij vergelijking met reguliere teelt (figuur 2) is er een iets ander patroon waar te nemen dan bij *E. coli*. Weliswaar bestaat er bij reguliere monsters resistentie tegen meer middelen (9) dan bij biologische monsters (4), maar bij bacitracine, waarbij monsters van beide teeltwijzen resistent zijn is er bij biologische teelt een hoger percentage resistent. Dit is een opvallende bevinding waar een mogelijke verklaring niet eenvoudig voor te geven is. Door Butaye et al. [7.5] is in het verleden bediscussieerd of de op dierlijke producten voorkomende enterococci wel van dierlijke oorsprong zijn of een aan vlees en verwerkingsomstandigheden aangepaste sub-populatie. Dit laatste zou kunnen verklaren waarom er hierbij geen positief effect van biologische houderij te meten is. In vergelijking met reguliere teelt is alleen het verschil in percentage resistentie voor doxycycline statistisch significant ($P < 0,05$).

E. faecium (Tabel 2) blijkt resistentie te vertonen tegen bacitracine, doxycycline, erythromycine, pirlimycine, en streptomycine.

Vergelijking van biologische en reguliere teelt (figuur 3) vertoont een zelfde beeld als bij *E. faecalis*, namelijk bij reguliere monsters resistentie tegen meer middelen (8) dan bij monsters van biologische teelt (7), en indien bij een middel monsters van beide teeltwijzen resistent zijn, is bij de reguliere teelt meestal een hoger percentage resistent. Dit was significant bij bacitracine ($P < 0,01$), doxycycline ($P < 0,01$) en erythromycine ($P < 0,001$).

6 CONCLUSIE

Het blijkt dat bij kipvlees van biologische teelt een significant lager percentage van de monsters besmet is met *Salmonella*, maar daar en tegen een hoger percentage *Campylobacter* bevat.

Met in acht name van het lagere aantal onderzochte stammen uit monsters van biologische teelt vergeleken met die uit reguliere teelt kan geconcludeerd worden dat bij de eerste groep tegen minder middelen resistentie voorkwam en over het geheel bezien in *E. coli* en *E. faecium* de resistentiepercentages vaker lager waren.

7 LITERATUUR

- 7.1 Heuer, O.E., Pedersen, K., Andersen, J.S. and Madsen. 2001. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Lett. Appl. Microbiol. 33, 269-274.
- 7.2 Newell, D.G and Fearnley, C 2003. Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4343-4351.
- 7.3 Zee, H. van der, Wit, B. en Vollema, A.R. 2004. Monitoring pathogenen in kip en Kipproducten, jaar 2003. Rapport VWA/KvW Oost.
- 7.4 Kramer, G. 2003. Integrale vergelijking van regulier en biologisch kippenvlees. Rapport Consumentenbond.
- 7.5 Butaye, P., Van Damme, K., Devriese, A.L., Van Damme, L., Bael, M., Lauwers, S. and Haesebrouck, F. 2000. In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. Int. J. Food Microbiol. 54, 181-187.