

Residuen van diergeneesmiddelen
in kweekvis:
literatuuronderzoek en analyse
van praktijkbemonstering

A. Kamstra, J.W. van der Heul, O.L.M. Haenen,
H.J. Keukens en M.J.B. Mengelers

rivo-dlo



RIVO Rapport C034/95

Residuen van diergeneesmiddelen in kweekvis: literatuur-onderzoek en analyse van praktijk- bemonsteringen

A. Kamstra,¹ J.W. van der Heul¹, O.L.M. Haenen², H.J. Keukens³ en M.J.B. Mengelers³

november 1995

¹ DLO-Rijksinstituut voor Visserijonderzoek
Haringkade 1
Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Telefoon: 0255 564646
Telefax: 0255 564644
Internet: postkamer@rivo.agro.nl

² DLO-Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid
Postbus 65
8200 AB Lelystad

³ DLO-Rijks Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten
Postbus 230
6700 AE Wageningen

De Directie van het RIVO-DLO is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het RIVO-DLO; opdrachtgever vrijwaart het RIVO-DLO van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

2-1851556

Inhoudsopgave:

SAMENVATTING.....	3
1. INLEIDING.....	4
2. METHODIEK.....	5
2.1 Literatuur.....	5
2.2 Farmacokinetiek.....	5
2.3 Koppeling residumetingen en behandelingsgegevens.....	5
3. LITERATUUR BETREFFENDE RESIDUEN IN VAN EEN AANTAL GESELECTEERDE MIDDELEN.....	6
3.2 Formaline.....	7
3.3 Zout.....	9
3.4 Mebendazole.....	9
3.5 Malachietgroen.....	10
3.6 Methyleenblauw.....	13
3.7 Oxytetracycline.....	14
3.8 Sulfonamiden/trimethoprim.....	17
3.9 Flumequine.....	18
3.10 Oxolinezuur.....	20
4. ANALYSE VAN RESIDUEN-ONDERZOEK IN KWEEKVIS.....	22
5. SYNTHESE.....	27
5.1 Gebruik van middelen en voorlopige wachttijden.....	27
5.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek.....	28
6. CONCLUSIES.....	29
7. LITERATUUR.....	30
1 BIJLAGE	

SAMENVATTING

In dit onderzoek is de kennis omtrent opname en eliminatie van een negental diergeneesmiddelen voor toepassing bij paling, Afrikaanse meerval en forel geïnventariseerd. Het gaat hier om formaline, mebendazole, methyleenblauw, malachietgroen, keukenzout, oxytetracycline, sulfonamiden/trimethoprim, flumequine en oxolinezuur.

Momenteel zijn er geen diergeneesmiddelen voor gebruik bij vissen geregistreerd in Nederland, terwijl gebruik van dergelijke stoffen wel noodzakelijk wordt geacht. In een onderzoek van het ministerie van VWS zijn residuen van een aantal middelen in bovengenoemde soorten aangetroffen. Getracht is deze analyses van residuen te koppelen aan behandlingsgegevens. Eerste beleidsprioriteit is momenteel het voorkómen van residuen in consumptiegereed produkt.

Voor formaline, mebendazole, keukenzout en oxytetracycline kunnen op basis van literatuur goede richtlijnen voor gebruik worden gegeven. Gebruik van deze stoffen hoeft vanuit het oogpunt van residuen dan ook geen problemen op te leveren. Malachietgroen wordt dermate effectief opgenomen en langzaam geëlimineerd dat deze stof alleen bij kleine vis (< 5 gram) zou kunnen worden gebruikt. Gegevens omtrent methyleenblauw zijn schaars. Geadviseerd/aanbevolen wordt deze stof voorlopig alleen bij kleine vis te gebruiken.

Kennis van de opname en eliminatie van trimethosulfmix, flumequine en oxolinezuur bij paling en Afrikaanse meerval is beperkt. Voor genoemde stoffen kan alleen voor forel een redelijk onderbouwde wachttijd worden gegeven.

Een deel van de residuen die bij forel zijn gevonden waren reeds in de aangekochte vis aanwezig. Stoffen en gehalten die bij het residu-onderzoek werden aangetroffen zijn redelijk te verklaren vanuit gebruik en monsternamen.

Toekomstig onderzoek dient allereerst de effectiviteit en noodzaak van bepaalde therapieën te evalueren. Mede op basis van deze informatie kan gericht aanvullend onderzoek naar opname en eliminatie van een aantal stoffen worden opgezet.

1. INLEIDING

Gebruik van diergeneesmiddelen in de Nederlandse visteelt is problematisch: er zijn geen middelen geregistreerd voor gebruik bij vissen terwijl een aantal middelen nodig zijn voor een goede bedrijfsvoering. Daarnaast zijn bij onderzoek van de Veterinaire Hoofdinspectie (VHI) recentelijk residuen van een aantal middelen in kweekvis gevonden. De Werkgroep 'Residuen van diergeneesmiddelen en registratie van diergeneesmiddelen' heeft in opdracht van de Stuurgroep Vis van het Platform Milieukritische stoffen een advies voorbereid om knelpunten op dit terrein aan te pakken. Een van de meest urgente zaken betreft het voorkómen van residuen van diergeneesmiddelen in kweekvis. Om dit probleem het hoofd te bieden is door de Nederlandse Vereniging van Viskwekers (NeVeVi) een IKB-achtig garantiesysteem voorgesteld. NeVeVi heeft een lijst met te registreren diergeneesmiddelen opgesteld, die momenteel bij de verschillende teelten noodzakelijk zijn en heeft het huidige gebruik van diergeneesmiddelen onder haar leden geïnventariseerd.

RIVO-DLO en ID-DLO besteden in het kader van het project Bedrijfsbegeleidingssysteem (BBS) voor de Visteelt bijzondere aandacht aan visziektebestrijding en gebruik van diergeneesmiddelen. Het onderzoek waarover hier wordt gerapporteerd heeft nauw betrekking op bovengeschetste problematiek en is in de Werkgroep residuen besproken. Doel van dit onderzoek is:

- Het inventariseren van beschikbare kennis betreffende opname en eliminatie van middelen die noodzakelijk worden geacht voor de Nederlandse visteelt.
- Het analyseren van metingen van residuen in kweekvis middels koppeling aan visbehandelingsgegevens om daarmee inzicht te krijgen in het ontstaan van residuen in kweekvis.

Dit onderzoek kan een aanzet geven tot het op termijn ontwikkelen van een 'verantwoord gebruik van diergeneesmiddelen'. Tevens worden de lacunes in kennis op dit terrein in kaart gebracht, waarmee verder onderzoek gestuurd kan worden.

In een later stadium wordt in het kader van het BBS een handleiding ontwikkeld voor de herkenning en bestrijding van visziekten: een noodzakelijke basis om deze problematiek te beheersen.

2. METHODIEK

2.1 Literatuur

Aan de hand van de lijst met diergeneesmiddelen, die door NeVeVi noodzakelijk worden geacht, is literatuuronderzoek verricht. Hiertoe is gezocht op de veterinaire CD-ROM bestanden van het ID-DLO. Een nadere selectie is gemaakt door met name de voor Nederland relevante vissoorten te onderzoeken: paling (*Anguilla anguilla*), Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) en forel (*Oncorhynchus mykiss*). Beschikbare gegevens worden per middel besproken.

2.2 Farmacokinetiek

Voor het berekenen van de wachttijd is gebruik gemaakt van de eliminatiesnelheid van het dierbehandelingsmiddel in spierweefsel (indien bekend). Wanneer alleen gegevens beschikbaar zijn over de eliminatiesnelheid in plasma (bloed) wordt verondersteld dat de eliminatie in spierweefsel even snel verloopt als die in plasma (bloed).

Verder is omwille van de eenvoud uitgegaan van een mono-exponentieel verloop in plasma en/of spierweefsel. Aangezien dit verloop gerelateerd is aan de toepassing van het "open 1-compartiment" systeem, is in het geval van een multi-compartimenten systeem gebruik gemaakt van de snelheidsconstante berekend uit de terminale eliminatiefase. Uitgaande van de maximale concentratie in het spierweefsel (meestal berekend m.b.v. een concentratieratio tussen plasma en spierweefsel) en een gegeven MRL (Maximum Residue Level) of detectiegrens, kan dan de wachttijd berekend worden om deze MRL of detectiegrens te bereiken. In het geval van een multi-compartimenten systeem wordt met deze manier van rekenen een overschatting van de werkelijke wachttijd verkregen.

Samengevat zijn er dus meerdere aannames gedaan: de eliminatiesnelheid in plasma en spierweefsel is (ver)gelijk(baar), de uitscheiding verloopt mono-exponentieel en de concentratieratio tussen plasma en spierweefsel is bekend en verandert gedurende de wachttijd niet.

2.3 Koppeling residumetingen en behandelingsgegevens

De Veterinaire Hoofdinspectie van het Ministerie van WVC heeft in de periode 1991-1993 onderzoek laten verrichten naar residuen van diergeneesmiddelen (en beta-agonisten: 'groeihormonen') in kweekvis. In 1991 zijn van A. meerval, paling en forel respectievelijk 19, 33 en 38 monsters genomen, die zijn geanalyseerd op een aantal antibiotica, beta-agonisten en malachietgroen. Slechts de resultaten van de bepalingen van malachietgroen en leuco-malachietgroen, die door de VVDO van de Universiteit van Utrecht zijn uitgevoerd, zijn voor analyse beschikbaar.

In 1993 zijn van A. meerval, paling en forel respectievelijk 14, 25 en 36 monsters genomen. Deze zijn geanalyseerd op tetracyclinen, quinolonen, mebendazole, malachietgroen en leuco-malachietgroen. Het RIVM heeft 25 van deze monsters op beta-agonisten onderzocht. De uitslag van laatstgenoemd onderzoek was negatief en deze stoffen blijven in dit onderzoek dan verder ook buiten beschouwing.

Van alle leden van NeVeVi (38) is toestemming verkregen om de residu-analyses van het bedrijf in te mogen zien. Van een aantal niet-leden (n=6) is deze toestemming eveneens verkregen. Van bedrijven met positieve monsters zijn vervolgens gegevens verzameld over visziektebehandelingen voor een relevante periode en groep vissen.

3. LITERATUUR BETREFFENDE RESIDUEN IN VIS VAN EEN AANTAL GESELECTEERDE MIDDELEN

3.1 Toegepaste en benodigde middelen

NeVeVi heeft een aantal middelen voorgesteld die voor registratie in aanmerking zouden moeten komen en heeft daarnaast het huidige gebruik van diergeneesmiddelen onder haar leden geïnventariseerd. Tabel 1 geeft een overzicht van toegepaste middelen.

Tabel 1. Resultaten van een enquête naar het gebruik van diergeneesmiddelen onder leden van NeVeVi (n=38; respons 71%) in 1994.

Middel	Aantal bedrijven	Frequentie
Formaline	11	1 x week/maand
Mebendazole	11	"
Methyleenblauw	11	"
Malachietgroen	11	"
Zout	4	"
Oxytetracycline	6	2-3 x jaar
Flumequine	5	"
Furazolidone	2	< 2 x jaar
Neomycinesulfaat	1	"
Furaltedone-HCL	1	"
Amoxicilline trinitraat	1	"
Acriflavine	2	"

Het ledenbestand van NeVeVi beslaat praktisch de gehele produktiekapaciteit voor A. meerval en paling. Forellenkwekers zijn slecht georganiseerd en vertegenwoordigen slechts een klein deel van de totale produktie aan kweekvis. De produktie van A. meerval, paling en forel bedroeg in 1994 respectievelijk ca. 800, 1400 en <200 ton. Een inventarisatie uitgevoerd in 1988 (Schütte en Grondel, 1988) geeft globaal dezelfde resultaten als in tabel 1 vermeld. In afwijking van tabel 1 werd toendertijd het gebruik van Trimethosulfmix gemeld. Mebendazole, neomycine, amoxicilline en acriflavine zijn daarentegen middelen die relatief recent worden toegepast.

In tabel 2 worden een aantal middelen weergegeven die door NeVeVi noodzakelijk worden geacht voor de huidige visteeltpraktijk.

Tabel 2. Overzicht van diergeneesmiddelen die volgens NeVeVi voor registratie in aanmerking zouden moeten komen met daarbij de de meest toegepaste dosering (naar Liewes en Haenen, 1992).

Middel	Toepassing
Formaline	permanent bad, 60 - 200 mg/l
Mebendazole	permanent bad, 0.5 - 2 mg/l
Methyleenblauw	permanent bad, 0.05 - 0.1 mg/l
Malachietgroen	permanent bad, 0.05 - 0.3 mg/l
Zout	permanent bad, 0.2 - 1% als NaCl
Oxytetracycline	bad: 20 mg/l, 1 dag; voer: 50-80 mg/kg vis, 7 dagen
Trimethosulfmix	voer: 30 mg/kg, 7-10 dgn (AUV)
Flumequine	bad: 25 mg/l, 3 uur; voer: 6-10 mg/kg vis, 6-10 dagen
Oxolinezuur	bad: 25 mg/l, 3 uur; voer: 3-12 mg/kg vis, 7-10 dagen

Trimethosulfmix wordt in de enquête (tabel 1) niet genoemd en komt bij de benodigde middelen wel voor. Anderzijds worden de middelen furazolidone, neomycinesulfaat, furaltedone-HCl, amoxicilline en acriflavine niet opgevoerd als noodzakelijke middelen.

Het literatuuronderzoek heeft zich beperkt tot de middelen die genoemd worden in tabel 2.

Bij de bespreking van diverse middelen wordt naast enige algemene informatie iets gezegd over de status van het middel. Wil een middel voor registratie in aanmerking komen dan is allereerst vaststelling van een MRL op Europees niveau noodzakelijk.

Van aantal stoffen, zoals chlooramphenicol en nitrofurane kan geen MRL worden vastgesteld (EU richtlijn nr. 2377/90, Annex IV).

In deze rapportage wordt slechts zijdelings aandacht aan de effectiviteit van bepaalde middelen geschonken. Ook eventuele milieuaspecten vallen buiten het bereik van deze studie.

3.2 Formaline

Formaline is een 37% oplossing van formaldehyde in water. Het wordt met name in de palingteelt gebruikt als middel tegen ecto-parasieten. Het wordt ook gebruikt in een cocktail samen met malachietgroen en methyleenblauw (FMC). Formaline reageert met eiwitten, amines, aminozuren en vele andere organische stoffen.

Registratie: VS (Paracide-F, div. vissoorten), Duitsland (Standard-Zulassung)

MRL: geen

Castell en Smith (1973) ontwikkelden een methode waarmee residuen van formaline in spierweefsel kunnen worden aangetoond. Sills en Allen (1979) stelden een aantal vissoorten bloot aan 300 mg/l formaline gedurende een periode van 1 tot 3 uur. In spieren, lever en plasma konden na behandeling geen residuen van formaline worden aangetoond (detectiegrens 5 mg/kg). Xu en Rogers (1993) onderzochten residu-vorming bij striped bass, *Morone saxatilis*, na blootstelling aan 25 mg/l formaline (144 uur) en

250 mg/l (1 uur). Bij langdurige blootstelling waren de gehalten in de vis verhoogd ten opzichte van de controle groep; na 96 uur waren geen verschillen meetbaar. Subasinghe en Yusoff (1993) hebben onderzoek verricht naar residuen van formaline in *Puntius gonionotus* en *Clarias batrachus* na blootstelling aan 50 en 100 mg/l (24 uur). Direct na behandeling konden niveaus variërend van 6 tot 18 mg/kg in de vis worden aangetoond. Na 24 uur waren geen sporen van formaline aanwezig.

Formaline is overigens een normale metaboliet in dierlijke cellen. Zo vonden Xu en Rogers (1993) in bovengenoemd onderzoek in de controle groep een gehalte van gemiddeld 4 mg/kg formaline. Een bekend fenomeen is daarnaast de vorming van formaline tijdens opslag van kabeljauwachtigen, door de afbraak van trimethylamine-oxide in dimethylamine en formaline.

Samenvattend kan gesteld worden dat gebruik van formaline in viskwekerijen wat betreft vorming van residuen niet problematisch is. Na behandeling dient een wachttijd van 24 uur in acht genomen te worden.

3.3 Zout

Keukenzout (NaCl) wordt in de visteelt ingezet tegen bepaalde ecto-parasieten en daarnaast wordt het gebruikt om osmotische stress tegen te gaan tijdens transport of na sorteren.

Registratie: Duitsland (Standard-Zulassung)

MRL: geen

De minerale component van vis bestaat van nature al voor een deel uit NaCl. Het gehalte aan Na⁺ en Cl⁻ wordt middels hydro-osmotische regulatie op een konstant peil gehouden. Het is daardoor niet mogelijk om over residuen van NaCl te spreken.

3.4 Mebendazole

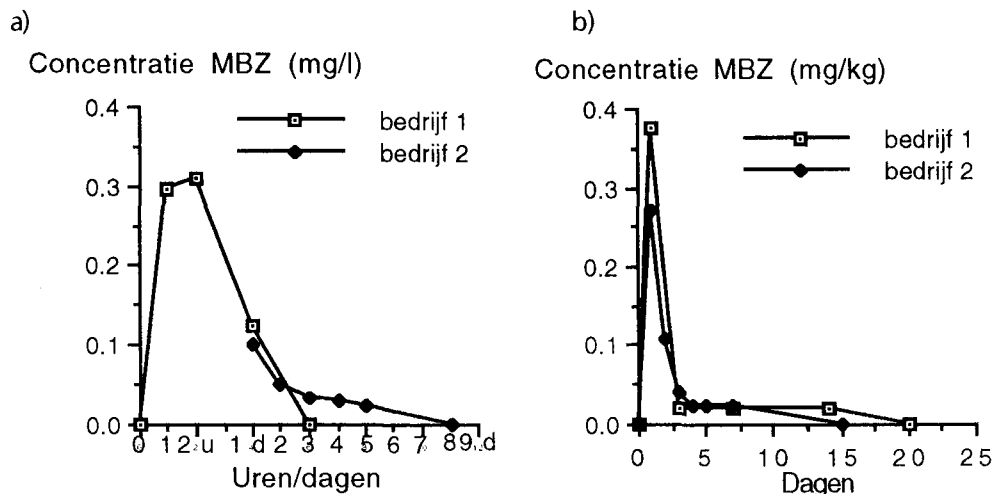
Mebendazole is een anti-parasiticum dat sinds enkele jaren in de palingteelt tegen de kieuwworm, *Pseudodactylogyrus spp.*, wordt ingezet. Het behoort tot de benzimidazolen, een uitgebreide groep van verwante stoffen.

Registratie: geen

MRL: geen; wel voorlopige (1/1/96) MRLs voor gerelateerde verbindingen zoals oxfendazole en flubendazole (10 µg/kg, alle vleesproducerende dieren)

Mellergaard et al. (1990) hebben in een praktijkexperiment bij twee palingkwekerijen de toepassing van mebendazole onderzocht. Met één tweetal verschillende formuleringen werd een bad van 1 mg/l (berekend) mebendazole gegeven. Op regelmatige tijdstippen werd de mebendazole concentratie in het water en de vis gemeten. In figuur 1 wordt een overzicht van de resultaten gegeven.

Figuur 1a,b. Het verloop van de concentratie mebendazole (MBZ) in het teeltwater a) en de vis (b) van een tweetal palingkwekerijen, waar een eenmalige dosering mebendazole aan het teeltwater was toegediend.



In de waterfase werd op bedrijf 1 een piek bereikt van 0.31 mg/l, 2 uur na toediening. Op dag 3 en dag 8 waren de concentraties MBZ in de waterfase van respectievelijk bedrijf 1 en 2 beneden de detectielimiet (0.01 mg/l) gedaald. Opvallend is de lage piekconcentratie die wordt bereikt (dosering 1 mg/l). Dit fenomeen wordt waarschijnlijk veroorzaakt door adsorptie van MBZ aan organische stof. Met name de biologische filters in het teeltsysteem kunnen hierbij een grote rol spelen. Na 1 dag werd een piek van ca. 0.3 mg/kg MBZ in de vis bereikt. Op dag 3 was de concentratie reeds gezakt tot 0.02 en 0.05 mg/kg op bedrijf 1 en 2. Het gehalte MBZ was na 21 en 15 dagen tot beneden de detectielimiet (10 ug/kg) gedaald op respectievelijk bedrijf 1 en 2. In de praktijk wordt veelal een herhalingsbehandeling gegeven na 8 dagen; eventuele cumulatieve effecten van een dergelijke behandeling zijn onbekend. Sporadisch worden doseringen tot 2 à 3 mg/l toegepast. Het is de vraag welke effectieve concentraties daarbij werkelijk worden bereikt, omdat bij alle behandelingen over het biologische filter wordt gerecirculeerd.

Concluderend kan gesteld worden dat bij de huidige praktijk van behandelen een wachttijd van een maand voorlopig voldoende lijkt om onder de detectielimiet voor mebendazole te blijven. Vooral vanuit therapeutisch oogpunt zou het wenselijk zijn om meer informatie te verkrijgen over het gedrag van MBZ in recirculatiesystemen.

Kortgeleden is door de Universiteit van Utrecht (VVDO) een metaboliet van MBZ in paling aangetoond (Haagsma, pers. inf.). Nadere details ontbreken nog.

3.5 Malachietgroen

Malachietgroen is een kleurstof die in de visteelt tegen schimmels en ecto-parasieten wordt ingezet, vaak in combinatie met formaline. De stof grijpt aan op de cellulaire ademhalingsenzymen. Gebruik van deze stof staat onder druk; alternatieven voor met name bestrijding van schimmel bij eieren zijn niet voorhanden (Alderman, 1982a). In de literatuur bestaat verwarring over de effecten van malachietgroen wat betreft de toxiciteit en de therapeutische effecten ervan. Veel van deze onduidelijkheid valt terug te voeren op de zuiverheid van het toegepaste malachietzout, die in een onderzoek van Alderman (1982b) varieerde van 99 tot 34%. Alderman (1985) geeft een uitstekend overzicht van de eigenschappen en werking van malachietgroen.

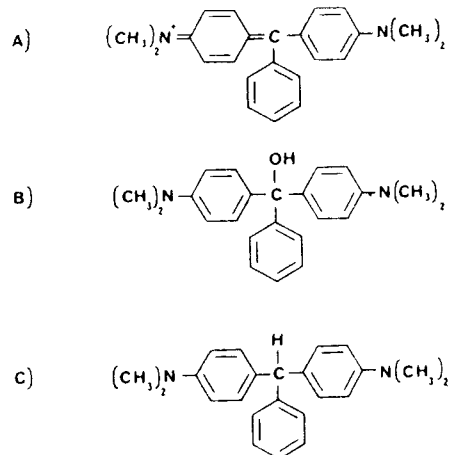
Registratie: Duitsland (Standard-Zulassung), alleen eieren

MRL: geen, Duitsland 10 ug/kg (spier)

Om het gedrag van malachietgroen te begrijpen is enige uitleg over de chemische eigenschappen van de stof noodzakelijk. Het malachietgroen dat als kation (meestal van een oxalaat) aan water wordt toegevoegd, wordt afhankelijk van de pH deels omgezet in een neutrale en kleurloze base (carbinol). Dit zuur/base-evenwicht heeft een pKa van 6.9 en komt relatief langzaam tot stand. De carbinol-vorm is sterk lipofiel en het is waarschijnlijk deze vorm die het lichaamswefsel binnendringt. De stof concentreert zich in sterke mate in lichaamswefsel, met name vetweefsel. Het gebruik van malachietgroen als kleurstof impliceert een sterke binding aan organische stof.

De carbinol-vorm wordt in de vis gereduceerd tot een eveneens kleurloze leuco-base. Het is vooral deze laatste metabooliet die in de vis wordt aangetroffen. In figuur 2 zijn de verschillende vormen van malachietgroen weergegeven.

Figuur 2. De structuurformules van malachietgroen (A), malachietgroen carbinol (B) en de leuco-base (C).



De opname en uitscheiding van malachietgroen en zijn metabooliet zijn uitgebreid bestudeerd door Bauer et al. (1988) bij forel. In hun onderzoek kon aan het eind van een 24-uurs behandeling met 0.2 mg/l malachietgroen nog slechts 0.005 mg/l in de waterfase worden aangetoond. Ca. 80% van de totale dosis was in de vis terug te vinden, waarbij 33% van de opgenomen hoeveelheid in het spierweefsel aanwezig was. Direct na behandeling was slechts 10% van de totale hoeveelheid malachietgroen in de geoxideerde vorm aanwezig; de rest als leuco-base. Na verloop van tijd zijn slechts sporen van de originele kleurstof terug te vinden en is de leuco-base zeer dominant. De afname van de concentratie van de leuco-base in het spierweefsel verloopt exponentieel en kan als volgt beschreven worden:

$$C_t = C_0 * e^{-b*t}$$

Waarin:

C_t en C_0 de concentratie op tijdstip t en $t=0$

b de uitscheidingsnelheidsconstante

De uitscheidingsnelheid van de leuco-base verschilt tussen individuele vissen, afhankelijk van het vetgehalte. De uitscheidingsnelheidsconstante varieert van 0.06 tot 0.015 (dag^{-1}) bij vetgehaltenes van respectievelijk 1 en 4% van het versgewicht van de filet. Bij een gemiddeld vetgehalte resulteert dit in een halfwaardetijd van 43 dagen en een wachttijd van 282 dagen om op 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ van de leuco-base uit te komen. Het onderzoek is uitgevoerd bij een temperatuur van 10 °C; het effect van temperatuur op de uitscheidingsnelheid is niet onderzocht.

De uiteindelijke residu-concentratie in het eindproduct wordt in sterke mate beïnvloed door de 'groeiverdunning'. Bauer et al. (1988) berekenen het maximale gewicht van een te behandelen vis en de in te bouwen opkweektijd die nodig is om in een forel van 300 gram een gehalte van 10 µg/kg te realiseren. Bij snelle groei kan een vis van 15 gram nog behandeld worden en is een groeitraject van 146 dagen noodzakelijk. Bij een relatief geringe groeisnelheid kan een vis van maximaal 38 gram behandeld worden, die vervolgens 202 dagen door moet groeien. De benadering van Bauer et al. (1988) is vrij ruw en houdt, zoals gezegd, geen rekening met temperatuurseffecten.

Alderman en Clifton-Hadley (1993) hebben de opname en uitscheiding van malachietgroen, eveneens bij regenboogforel, uitgebreid bestudeerd. In deze studie werden vissen van ca. 250 gram blootgesteld aan 1.6 mg/l malachietgroen gedurende 40 minuten bij een temperatuur van 8 en 16 °C. De opname bleek bij 16 °C hoger te zijn dan bij 8 °C. In spierweefsel werd een maximale concentratie bereikt van respectievelijk 7.8 en 10.8 mg/l bij 8 en 16 °C. In nierweefsel werd de hoogste concentratie malachietgroen gevonden. De uiteindelijke uitscheiding halfwaardetijd van malachietgroen in het spierweefsel bedroeg 3.9 en 2.9 dagen bij 8 en 16 °C en is daarmee aanzienlijk lager dan de waarde gevonden door Bauer et al. (1988).

Opgemerkt moet worden dat de aanvangsconcentraties van malachietgroen in het spierweefsel in beide studies een factor 10 verschillen. Alderman et al. (1993) werken verder met grote forel waarvan mag worden aangenomen dat deze relatief vet is, waardoor de verschillen des te opmerkelijker zijn.

Meinertz et al. (1995) hebben de opname en uitscheiding van malachietgroen bij eieren en broed van regenboogforel bestudeerd. Zij vonden een halfwaardetijd van malachietgroen in broed van 13.3 dagen bij een watertemperatuur van 12 °C. Naast leuco-malachietgroen vonden zij een onbekende polaire metaboliet van malachietgroen in het weefsel.

Kietzman et al. (1990) hebben heel globaal naar de uitscheiding van malachietgroen bij winde, forel en karper gekeken. Zij konkluderen dat de geadviseerde wachttijd van 330 dagen voor forel groter dan 40 gram reëel is.

Aan de Universiteit van Utrecht (VVDO) wordt gewerkt aan een fysiologisch model waarmee bij forel de uitscheiding van malachietgroen kan worden voorspeld (Hajee, pers. meded.).

Een algemeen probleem bij het ontwikkelen van wachttijden voor diergeneesmiddelen bij vissen is het feit dat in de praktijk reeds de uitgangssituatie (startconcentratie in de vis) moeilijk valt te voorspellen en afhankelijk is van vele factoren. Bij malachietgroen zijn dat bijvoorbeeld de zuiverheid van de toegepaste stof, de pH, de adsorptie aan organisch materiaal (biologische filters) en de gebruikte dosis t.o.v. de visbezetting. Gezien de manier van behandelen in recirculatiesystemen (langdurige baden) is het aannemelijk dat het meeste malachietgroen in vis en biofilter terecht komt. Voor de startconcentratie in de vis is dan ook met name de totale dosis ten opzichte van de biomassa van belang.

In bijlage 1 is een eenvoudig model weergegeven waarmee, gebruikmakend van een aantal aannames, een beschrijving van het verloop van de concentratie malachietgroen in paling wordt gegeven. Het model bevat te veel aannames om echt betrouwbare voorspellingen te kunnen doen, maar geeft goed inzicht in informatie die nodig is om deze voorspellingen te onderbouwen. Een aantal aanvullende metingen zijn noodzakelijk

om enkele factoren met meer nauwkeurigheid te kunnen schatten. Met name de zuiverheid van het gebruikte malachietgroen, de mate waarin het biologische filter malachietgroen adsorbeert en de uitscheidingsnelheid van malachietgroen bij paling zijn hierbij van belang.

NeVeVi heeft haar leden geadviseerd om malachietgroen alleen bij vissen kleiner dan 5 gram te gebruiken in concentraties lager dan 0.5 mg/l. Uit bijlage 1 blijkt dat, onder de gebruikte randvoorwaarden, in vis van ca. 120 gram de detectiegrens voor leucomalachietgroen (4 ug/kg) dan net wordt gehaald. Zoals gezegd is nader onderzoek noodzakelijk om betrouwbare voorspellingen over het verloop van de concentratie malachietgroen in paling te kunnen doen.

3.6 Methyleenblauw

Methyleenblauw is net als malachietgroen een kleurstof die tegen ecto-parasieten wordt ingezet vaak als cocktail met formaline en malachietgroen (FMC). Het middel kan ook gebruikt worden om de effecten van nitrietvergiftiging te neutraliseren.

Registratie: geen

MRL: geen

Nakagawa et al. (1984) hebben een methode ontwikkeld om methyleenblauw in forel en paling te meten. In dit onderzoek is ook heel globaal naar residuen gekeken. Bij een blootstelling van paling aan 3 mg/l methyleenblauw gedurende 3 uur bij 18 °C werd in de lever 2.6 mg/kg aangetroffen terwijl in het spierweefsel geen residuen aantoonbaar waren. Andere literatuur betreffende residuen van methyleenblauw is, voor zover wij kunnen overzien, niet beschikbaar.

3.7 Oxytetracycline

Oxytetracycline is een van de meest bekende breed-spectrum antibiotica en wordt al sinds de jaren vijftig in de visteelt ingezet. Naast oxytetracycline worden een aantal verwante tetracyclines zoals chloortetracycline en doxycycline toegepast, die hier verder niet ter sprake komen. Tetracyclines belemmeren de eiwitsynthese in de bacteriële cel. Deze stoffen vormen complexe verbindingen met Ca- en Mg-ionen (chelaten). Tetracyclines worden daardoor slecht geresorbeerd in het maag- darmkanaal en binden zich in sterke mate aan botweefsel. Oxytetracycline wordt daarom ook ingezet als middel om vissen te merken. Oxytetracycline wordt over het algemeen met het voer gemengd en dan enkele dagen gevoerd.

Registratie: Frankrijk, Ierland, Engeland, Italië, Spanje, Noorwegen, VS, Canada, Japan
MRL: voorlopige (1/1/96) MRL voor alle vleesproducerende dieren (100 ug/kg, spier)

De farmacokinetiek van oxytetracycline is, vergeleken met die van andere diergeneesmiddelen voor vis, relatief goed onderzocht. Tabel 3 geeft een overzicht van gepubliceerde resultaten. Veruit het meeste onderzoek is verricht aan forel. Uit tabel 3 blijkt dat de bereikte concentraties in het plasma na orale toediening vaak bijzonder laag zijn. De verhouding tussen de concentratie in het spierweefsel en het plasma varieert per onderzoek maar is over het algemeen in evenwichtstoestand kleiner dan 1.

Orale toediening van oxytetracycline resulteert in de meeste gevallen in lage gehalten in het plasma. Gezien de geringe biologische beschikbaarheid van oxytetracycline (enkele procenten !) is het twijfelachtig of altijd een therapeutische concentratie in de vis wordt bereikt. Badbehandeling lijkt voor de genezing van geïnfecteerd weefsel zinloos. Gegevens voor paling en Afrikaanse meerval zijn schaars.

Uit tabel 3 blijkt dat de uitscheidingsnelheid van oxytetracycline sterk van temperatuur en vissoort afhankelijk is. Zo is de uitscheidingsnelheid van oxytetracycline bij paling veel geringer dan die voor karper of forel bij vergelijkbare temperaturen. De concentraties in het spierweefsel zijn over het algemeen lager dan in het plasma in evenwichtstoestand. Het feit dat oxytetracycline wordt gebruikt om botweefsel van vissen te merken geeft aan dat residuen in dit lichaamsdeel zeer persistent zijn.

Tabel 3. Overzicht van onderzoek naar opname en uitscheiding van oxytetracycline door een aantal vissoorten. im: intramusculair; ip: intraperitoneaal; iv: intraveneus; o: oraal; ND: niet detecteerbaar. De dosis is uitgedrukt in mg per kg lichaamsgewicht; achter komma aantal dagen toediening, anders eenmalige dosis. t is de watertemperatuur. Cp, max is de maximale concentratie van het geneesmiddel in het bloedplasma van de vis. T1/2 P en S zijn de eliminatie halfwaarde-tijden in het plasma en het spierweefsel. [S]/[P] is de verhouding tussen de concentratie in het spierweefsel en het plasma in evenwichtstoestand.

Auteur	soort	meth.	dosis mg/kg	t °C	Cp,max ug/ml	T1/2 P uur	T1/2 S uur	[S]/[P]
Nouws et al. 1992	forel	im	60	10	35	150		
Grondel et al.,1987	forel	im	60	20	57	79		0.9
Grondel et al.,1989	forel	im	60	12	57	95		
Nouws et al. 1992	forel	iv	60	10		130		0.65
Nouws et al. 1992	forel	iv	60	19		76		0.37
Grondel et al.,1987	forel	iv	60	20		140		
Grondel et al.,1989	forel	iv	60	12		90		
Black et al.,1991	forel	iv	5	10		82		2
Nouws et al. 1992	forel	o	60	10	0.35	50		
Uno et al.,1992	forel	o	100	15	1.14	23.2	81.5	
Jacobsen, 1989	forel	o	50,8	6				
Jacobsen, 1989	forel	o	50,8	12	0.69			
Jacobsen, 1989	forel	o	50,8	18				
Rogstad et al.,1991	forel	o	150	7	1.8	312	240	3
Grondel et al.,1987	forel	o	34	20	0.28			
Bjørklund et al.,1990	forel	o	75	5	3.2	214	211	1.4
Bjørklund et al.,1990	forel	o	75	10	5.3	146	141	0.8
Bjørklund et al.,1990	forel	o	75	16	2.1	115	122	0.8
Nouws et al. 1992	paling	im	60	22	100	196		
Nouws et al., 1993	paling	im	60	22	113	215		0.36
Grondel et al.,1989	af. meerv	lm	60	25	43	74		
Grondel et al.,1989	af. meerv	lv	60	25		80		
Uno et al.,1992	y.tail	o	100	22	0.89	28.1	52.5	
Strasdine et al.,1979	zalm	im	5	?	0.83			
Strasdine et al.,1979	zalm	ip	5	?	1.04			
Strasdine et al.,1979	zalm	bad	5 mg/l	?	ND			
Uno et al.,1992	zalm	o	100	15	2.05	16	70.4	
Nouws et al. 1992	karper	im	60	8	48	157		
Nouws et al. 1992	karper	im	60	20	57	79		
Nouws et al. 1992	karper	iv	60	8		169		0.15
Nouws et al. 1992	karper	iv	60	20		52		0.81
Nouws et al. 1992	karper	o	60	20	0.46	56		

In tabel 4 worden volgens de methode beschreven in 2.2 en op basis van gegevens uit tabel 3 een aantal wachttijden voor oxytetracycline berekend voor de verschillende soorten om een eventuele MRL of detectiegrens te bereiken.

Tabel 4. De berekening van de wachttijd voor oxytetracycline, uitgaande van een denkbeeldige MRL en de detectiegrens voor oxytetracycline. C_p, \max en C_s, \max zijn de maximale concentraties die in plasma en spierweefsel worden bereikt na behandeling (oraal). $T_{p1/2}$: de eliminatie halfwaarde-tijd in het plasma; MRL: maximum residue level; Det.g.: de detectiegrens voor bepaling van oxytetracycline; T_{mrl} en $T_{det.}$: het benodigde aantal dagen om de gehalten voor MRL(100 ug/kg) en Det.g.(10 ug/kg) te bereiken.

Soort	Temp. °C	$C_{p, \max}$ ug/ml	[s]/[p]	C_s, \max ug/kg	$T_{p1/2}$ uur	MRL ug/kg	Det.g. ug/kg	T_{mrl} dag	$T_{det.}$ dag
Forel	10	0.5	1	0.5	140	100	10	13.5	32.9
Forel	20	0.5	1	0.5	70	100	10	6.8	16.5
Paling	22	0.5	0.5	0.25	200	100	10	11.0	38.7
Af.meerval	25	0.5	1	0.5	80	100	10	7.7	18.8

Gezien de variatie tussen individuele dieren dient men uiteraard bovenstaande getallen met een veiligheidsmarge te interpreteren. Salte et al. (1983) en Bjørklund et al. (1990) stellen voor forel bij temperaturen hoger dan 10 °C een wachttijd van 40 dagen voor om beneden de detectiegrens te komen. Voor paling zou men, ondanks de hoge temperatuur waarbij dit dier gehouden wordt, in eerste instantie met 50 dagen moeten werken. Voor Afrikaanse meerval zou men voorlopig met 30 dagen kunnen volstaan.

De grote onzekere factor bij paling en meerval is de opname van oxytetracycline via voer of bad. Ook vanuit therapeutisch oogpunt zou daarom onderzocht moeten worden welke maximale concentraties worden bereikt in de vis middels de in de praktijk toegepaste behandelingen.

3.8 Sulfonamiden/trimethoprim

Het in de praktijk gebruikte trimethosulfmix[®] (AUV) is een mengsel van sulfadiazine en trimethoprim (5 : 1). Sulfadiazine behoort tot de groep van sulfonamides, die bestaat uit meer dan 30 gerelateerde verbindingen. Sulfonamiden worden al sinds het eind van de jaren dertig in de visteelt toegepast. Begin jaren zeventig werd ontdekt dat gebruik van sulfa's in combinatie met trimethoprim tot betere resultaten leidt. Sindsdien worden sulfa's dan ook vrijwel uitsluitend in deze vorm gebruikt. Sulfa's worden over het algemeen snel en goed opgenomen, zowel oraal als middels badbehandeling.

Registratie: Frankrijk, Engeland, Ierland, Spanje, Noorwegen (Tribrissen[®]), VS (Romet[®]), Canada, Japan

MRL: alle sulfonamides voor vleesproducerende dieren 100 ug/kg (spier)
voorlopige (1/1/96) MRL voor trimethoprim voor alle vleesproducerende dieren van 50 ug/kg (spier)

Hoewel er in het algemeen redelijk wat onderzoek naar sulfonamiden verricht is, maakt het grote aantal verbindingen de informatie per verbinding beperkt. In tabel 5 wordt een overzicht gegeven van de informatie uit de literatuur.

Tabel 5. Overzicht van onderzoek naar opname en eliminatie van sulphadiazine (SDZ) en trimethoprim (TMP) bij een aantal vissoorten. Legenda zie tabel 3.

Auteur	stof	soort	meth.	dosis mg/kg	t °C	Cp,max ug/ml	T1/2 P uur	T1/2 S uur	[S]/[P]
Snieszko et al., 1951	SDZ	forel	o	200	12	37			
Nouws et al. 1992	SDZ	karper	iv	100	10	9.1	47.1		
Nouws et al. 1992	SDZ	karper	iv	100	24	3.1	33		
Salte et al., 1983	S+T*	forel	o	30	8			?, 26.7**	
Salte et al., 1983	S+T*	forel	o	30	10			23.9, 8.8	
Nouws et al. 1992	TMP	forel	im	10	12	0.7	8		
Jacobsen, 1989	TMP	forel	o	6,5	6				
Jacobsen, 1989	TMP	forel	o	6,5	12	0.5			
Jacobsen, 1989	TMP	forel	o	6,5	18				
Nouws et al. 1992	TMP	karper	iv	20	10		40.7		
Nouws et al. 1992	TMP	karper	iv	20	24		20		

* S+T: mengsel sulfadiazine en trimethoprim 5:1

** : SDZ, TMP

Fujihara et al. (1984) hebben bij paling de effectiviteit van het mengsel sulfisozole/trimethoprim (5:1) bestudeerd. Bij een dosering (oraal) van 20 tot 50 mg/kg lichaamsgewicht bleek het middel effectief tegen verschillende pathogenen. Trimethoprim bleek relatief lang in de nieren aantoonbaar (30 dagen, 50 mg/kg BW, 25°C).

Van de beide stoffen blijkt de sulfadiazine het langst aantoonbaar wanneer de verhouding SDZ:TMP 5:1 wordt gebruikt. Wachttijden dienen dan ook op deze groep afgestemd te worden. De beschikbare gegevens zijn te beperkt om een schatting van een wachttijd te maken. In vergelijking met bijvoorbeeld oxytetracycline wordt sulfadiazine bij karper en forel sneller uitgescheiden. Bij karper zijn ook in geringe mate metabolieten van sulfadiazine na behandeling aangetroffen (Nouws et al., 1992).

Het RIKILT-DLO zal dit jaar nog een studie uitvoeren naar de eliminatie van residuen in forel na badbehandeling met SDZ+TMP. Gelet op de goede effectiviteit en de goede biologische beschikbaarheid is de geringe informatie over de eliminatie van de residuen van deze stoffen een ongewenste situatie.

3.9 Flumequine

Flumequine behoort samen met oxolinezuur tot de groep der quinolonen, een voor de vsteelt relatief nieuwe groep van synthetische anti-microbiële middelen. Het zijn middelen die gekenmerkt worden door een lage toxiciteit voor vis, een goede opname zowel oraal als via badbehandeling en een hoge werkingsgraad bij lage dosering.

Registratie: Noorwegen, Italië, Spanje, Frankrijk, Japan

MRL: geen

Tabel 6 geeft een overzicht van onderzoek naar de farmacokinetiek van flumequine bij een aantal vissoorten.

Tabel 6. Overzicht van onderzoek naar opname en eliminatie van flumequine bij een aantal vissoorten. Legenda zie tabel 3.

Auteur	soort	meth.	dosis mg/kg	t °C	Cp,max ug/ml	T1/2 P uur	T1/2 S uur	[S]/[P]
van der Heijden et al.,1994	af.meerval	o	18	24	1.2	60		
Sohlberg et al.,1994	forel	iv	5	3		569		
Sohlberg et al.,1994	forel	iv	5	13		137		
Sohlberg et al.,1994	forel	o	5		1.1	736		
Sohlberg et al.,1994	forel	o	5		1.9	285		
van der Heijden et al.,1994	karper	o	18	24	6.1	104		
Nouws et al. 1992	paling	im	9	22	9	256		
van der Heijden et al.,1993	paling	im	9	23	10	221	260	1
Boon et al.,1991	paling	im	9	22	9	256		
van der Heijden et al.,1994	paling	o	18	24	4.1	451		
Rogstad et al.,1993	zalm	iv	5	5				
Rogstad et al.,1993	zalm	o	25	5	2.3			
Elema, 1995	zalm	o	25	8	1.6-2.6	30-40		
Rogstad et al.,1993	zalm	o	50	5	3.8			

De relatief goede opname van flumequine blijkt duidelijk uit de relatief hoge concentratie die in het plasma bereikt kan worden bij relatief lage doseringen. Elema (1995) heeft de biologische beschikbaarheid uitvoerig onderzocht bij Atlantische zalm en vindt waarden van ca. 40% voor de gangbare producten. Gezien de lage MIC's (minimum inhibitory concentrations) die met flumequine in vitro worden gemeten, zijn de in de praktijk toegepaste doseringen over het algemeen veel te hoog. Zo is bijvoorbeeld door Ledo et al. (1987) een MIC voor *Aeromonas hydrophila* vastgesteld van 0.075 ug/ml. Flumequine wordt overigens snel en efficiënt opgenomen middels badbehandeling (Cazabon et al., 1994; O'Grady et al., 1988).

De eliminatie van flumequine verloopt bij de meeste soorten langzamer dan die van bijvoorbeeld oxytetracycline of oxolinezuur. Bij paling is de eliminatiesnelheid geringer dan bij andere soorten.

In tabel 7 wordt een schatting gemaakt van benodigde wachttijden na behandeling.

Tabel 7. De berekening van de wachttijd voor flumequine uitgaande van een denkbeeldige MRL en de detectiegrens voor flumequine. Legenda zie tabel 4.

Soort	Temp. °C	Cp,max ug/ml	[s]/[p]	Cs, max ug/mg	Tp1/2 uur	MRL ug/kg	Det.g. ug/kg	Tmrl dag	Tdet. dag
Forel	3	1	1	1	736		10.0		204
Forel	13	1	1	1	285		10.0		79
Paling	22	1	1	1	250		10.0		69
Af. meerval	24	1	1	1	60		10.0		17

Om de Cp,max van 1 ug/ml niet te overschrijden dienen de toegepaste doseringen verlaagd te worden. Voor forel levert gebruik van flumequine bij lage temperaturen lange wachttijden op om onder de detectiegrens te komen. Bij paling zal men in eerste instantie rekening moeten houden met een wachttijd in de orde van 90 dagen. Bij Afrikaanse meerval kan gezien de relatief snelle eliminatie in eerste instantie volstaan worden met 30 dagen. Een interessant terrein van onderzoek is de opname van flumequine middels badbehandeling.

3.10 Oxolinezuur

Oxolinezuur is nauw verwant aan flumequine. Voor algemene informatie wordt dan ook naar de paragraaf over flumequine verwezen.

Registratie: Engeland, Ierland, Spanje, Noorwegen, Japan

MRL: geen

Oxolinezuur is een van de beter onderzochte stoffen met betrekking tot eliminatie van residuen, met name voor Salmoniden. Helaas ontbreken gegevens voor paling en Afrikaanse meerval. Tabel 8 geeft een overzicht van beschikbare literatuur omtrent deze stof.

Tabel 8. Overzicht van onderzoek naar opname en eliminatie van oxolinezuur bij een aantal vissoorten. Legenda zie tabel 3.

Auteur	soort	meth.	dosis mg/kg	t °C	Cp,max ug/ml	T1/2 P uur	T1/2 S uur	[S]/[P]
Kleinow et al.,1994	A.meerval	iv	5	24		41		
Kleinow et al.,1994	A.meerval	iv	5	14		69		
Kleinow et al.,1994	A.meerval	o	5	24	3.1		33	
Kleinow et al.,1994	A.meerval	o	5	14	3.7		54	
Jacobsen, 1989	forel	o	10,10	6				
Jacobsen, 1989	forel	o	10,10	12	1.44			
Jacobsen, 1989	forel	o	10,10	18				
Kleinow et al.,1994	forel	iv	5	14		81		
Kleinow et al.,1994	forel	o	5	14	2.1		14	
Bjørklund et al.,1992	forel	o	75	5	2	146	6.7	2.7
Bjørklund et al.,1992	forel	o	75	10	2	96	4.6	2.6
Bjørklund et al.,1992	forel	o	75	15	3.6	24	2	1.5
Bjørklund et al.,1992	forel	o	10,10	18	0.5	24	55	17
Rogstad et al.,1993	zalm	iv	5	5				
Rogstad et al.,1993	zalm	o	25	5	1			
Rogstad et al.,1993	zalm	o	50	5	1.2			
Elema, 1995	zalm	o	25	7	0.5	16		
Hustved et al.,1991	zalm	iv	20	9		60.3		
Hustved et al.,1991	zalm	ip	20	9	26	37.1		
Hustved et al.,1991	zalm	o	10	9	2.5	42.2		

Voor oxolinezuur geldt, evenals voor flumequine, dat met een relatief lage dosis een hoge plasma-spiegel bereikt kan worden. De biologische beschikbaarheid van oxolinezuur is dan over het algemeen ook redelijk (Cravedi et al., 1987). Voor forel en zalm blijkt de eliminatie van oxolinezuur sneller te verlopen dan die van flumequine. De concentratie oxolinezuur in het spierweefsel is in evenwichtstoestand hoger dan die in het plasma. Ishida (1990) en Hustved en Salte (1991) toonden aan dat de eliminatie van oxolinezuur in zeewater aanzienlijk sneller verloopt dan in zoet water. In tabel 9 wordt een overzicht gegeven van een aantal berekende wachttijden.

Tabel 9. De berekening van de wachttijd voor oxolinezuur uitgaande van een denkbeeldige MRL en de detectiegrens voor oxolinezuur. Legenda zie tabel 4.

Soort	Temp. °C	Cp,max ug/ml	[s]/[p]	Cs, max ug/mg	Tp1/2 uur	MRL ug/kg	Det.g. ug/kg	Tmrl dag	Tdet. dag
Forel	10	2	3	6	100		10.0		38.5
Forel	15	2	3	6	24		10.0		9.2
Paling									?
Af. meerval									?

Voor forel lijkt men bij hoge temperaturen met een wachttijd van ca. 20 dagen te kunnen volstaan om beneden de detectiegrens van 10 ug/kg uit te komen. Hustved et al. (1992) adviseren een wachttijd voor zalm van 30 dagen bij een detectiegrens van 1 ug/kg.

Nadere gegevens betreffende paling en Afrikaanse meerval ontbreken waardoor het niet mogelijk is voor deze soorten wachttijden te schatten.

4. ANALYSE VAN RESIDUEN-ONDERZOEK IN KWEEKVIS

In 1991 en 1993 zijn door de Veterinaire Hoofdinspectie van het Ministerie van VWS monsters vis van kwekerijen verzameld en geanalyseerd. In tabel 10 en 11 zijn de resultaten vermeld.

Tabel 10. Het totaal aantal genomen monsters en het aantal positieve monsters per vissoort en per jaar. - betekent geen analyse; OTC: Oxytetracycline; TC: Tetracycline; CTC: Chloortetracycline; DC: Doxycycline; MBZ: Mebendazole; CIPRO: Ciprofloxacin; ENRO: Enrofloxacin; OXO: Oxolinezuur; FLU: Flumequine. M: Afrikaanse meerval, P: paling; F: forel.

Soort	jaar	aantal	Tetracyclines					MBZ	Quinolonen				Malachiet-groen
			OTC	TC	CTC	DC	CIPRO		ENRO	OXO	FLU		
M	1991	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
M	1993	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	1991	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
P	1993	25	1	0	0	0	0	1	3	0	8	12	
F	1991	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
F	1993	36	0	0	0	0	0	0	0	7	8	8	

Over 1991 zijn alleen metingen van malachietgroen beschikbaar. Bij Afrikaanse meerval is er in 1991 in één monster malachietgroen aangetroffen. In 1993 zijn de monsters wat betreft andere onderzochte stoffen voor Afrikaanse meerval negatief. Bij paling blijkt in ca. de helft van de monsters malachietgroen (als leuco-base) aangetroffen te worden. Ook wordt bij paling in een achttal monsters flumequine aangetroffen. In een aantal monsters forel is malachietgroen en een tweetal antibiotica aangetroffen.

Tabel 11. Overzicht van gevonden concentraties ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in de positieve monsters (1991+1993). Afrikaanse meerval: (a), Paling: (b) en Forel: (c); MG: Malachietgroen; I-MG: leuco-Malachietgroen; nd: niet detecteerbaar; R: remming door sulfa's; nd MG < 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, nd I-MG < 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, nd overig 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

a)

Soort	nr.	Tetracyclines					MBZ	Quinolonen				Malachietgroen	
		OTC	TC	CTC	DC	CIPRO		ENRO	OXO	FLU	MG	I-MG	
M	1-14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
M	21											nd	8

b)

Soort	nr.	Tetracyclines					MBZ	Quinolonen				Malachietgroen	
		OTC	TC	CTC	DC	CIPRO		ENRO	OXO	FLU	MG	I-MG	
P	34	nd	nd	nd	nd	nd	36	69	nd	nd	nd	71	
P	36	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	50	953	
P	38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	154	
P	40	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	17.1	nd	nd	
P	42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12.3	nd	nd	
P	43	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	81	
P	46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	50	
P	47	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19	
P	48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	223	
P	49	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12	nd	14.5	nd	nd	
P	50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13	nd	nd	nd	nd	
P	51	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22.3	12	288	
P	52	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	230	
P	54	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	17	936	
P	55	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	50.5	nd	159	
P	56	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	nd	4	
P	58	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	nd	nd	

Soort	nr.	Malachietgroen		Soort	nr.	Malachietgroen	
		MG	I-MG			MG	I-MG
P	59	nd	nd	P	72	nd	12
P	60	8	893	P	75	nd	835
P	62	nd*	2153	P	76	nd	867
P	63	nd	7	P	81	13	399
P	64	nd	113	P	86	nd	4
P	65	nd	8	P	88	nd	12
P	67	nd	5	P	89	nd	10
P	68	nd	31	P	90	nd	32
P	70	nd	157	P	91	nd	59
P	71	nd	127				

c)

Soort nr.	Tetracyclines					MBZ	Quinolonen				Malachietgroen	
	OTC	TC	CTC	DC	CIPRO		ENRO	OXO	FLU	MG	I-MG	
F 94	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	<10	nd	nd
F 96	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	nd	nd
F 97	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	<10	nd	nd
F 98	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	<10	nd	nd
F 100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	<10	nd	nd
F 103	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14	237
F 104	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23	288
F 105	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	49
F 112	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	180	nd	nd	nd
F 113	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	<10	nd	nd
F 116	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31
F 117	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	68
F 118	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	38
F 119	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	nd	14
F 120	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	26
F 124	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	17.4	nd	nd	nd
F 125	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<10	nd	nd

		MG	I-MG			MG	I-MG
F 128	nd	15		F 153	nd	5	
F 132	7	197		F 154	10	273	
F 139	nd	4		F 155	nd	253	
F 140	nd	33		F 156	nd	13	
F 141	nd	80		F 157	nd	30	
F 144	nd	17		F 161	nd	73	
F 145	nd	66		F 162	nd	151	
F 146	nd	41		F 165	nd	5	

De verzamelde monsters beslaan niet specifiek consumptie-gereed produkt maar zijn random verzameld uit het aanwezige bestand. De analyses zijn verricht aan spierweefsel van een mengmonster vis.

Voor paling en forel kon van respectievelijk 10 en 5 monsters, voornamelijk van 1993, de behandelingsgeschiedenis (gedeeltelijk) achterhaald worden.

Het feit dat er in monsters Afrikaanse meerval geen residuen zijn aangetroffen ligt in de lijn der verwachting gezien het feit dat bij deze teelt, vissen na het pootvisstadium weinig ziekteproblemen kennen.

Bij paling is in monster 36 oxytetracycline aangetroffen in een concentratie net boven de detectiegrens (11 ug/kg). De vis is hier 34 dagen voor de monsternamen behandeld met een bad van 50 mg/l. Met de berekende wachttijd van 50 dagen (tabel 4) was men hier waarschijnlijk onder de detectiegrens uit gekomen. Hoewel oxytetracycline op een aantal bedrijven wordt gebruikt (tabel 1) is de opname waarschijnlijk dermate slecht dat concentraties in de vis laag zullen zijn. Andere tetracyclines worden, voor zover wij kunnen overzien, niet gebruikt en zijn daarom niet aangetroffen. Mebendazole wordt op de meest palingkwekerijen gebruikt en is in geen van de monsters aangetroffen. Dit valt

te verklaren uit de relatief snelle eliminatie van mebendazole (zie 3.4). In 4 monsters paling is cipro- en/of enrofloxacin aangetroffen. In drie traceerbare gevallen (34, 49 en 50) is gebruik van deze stoffen middels een logboek niet terug te vinden. Bij de betreffende kwekers zijn deze stoffen onbekend. In twee gevallen bestaat een kleine kans dat deze stoffen via pootvis afkomstig van een ander (buitenlands) bedrijf geïntroduceerd zijn.

In de palingmonsters is geen oxolinezuur aangetroffen en voorzover wij kunnen overzien wordt deze stof in deze teelt ook niet gebruikt. In 8 monsters paling is flumequine aangetroffen waarvan de concentratie in drie gevallen meer dan 10 ug/kg bedraagt. De vissen van monster 36 (<10 ug/kg) zijn ca. 50 dagen voor de monstername op een ander bedrijf behandeld. Een deel van de vis van monster 42 (12 ug/kg) is minimaal 200 dagen voor monstername behandeld middels bad (20 mg/l). Het feit dat na zoveel dagen nog residuen van flumequine worden gevonden is een illustratie van de goede opname en/of de slechte eliminatie van de stof. Het bedrijf waar monster 51 is genomen heeft volgens het logboek voor het eerst flumequine toegepast na de monstername. Bovengenoemde resultaten suggereren dat de wachttijd van 90 dagen, berekend in tabel 7, mogelijk aan de lage kant is.

Malachietgroen wordt op de meeste palingkwekerijen gebruikt (tabel 1) en is in de bemonstering veelvuldig aangetroffen. In tabel 12 wordt voor paling een overzicht gegeven van de gevonden concentraties en de bijbehorende behandelingen voor zover beschikbaar.

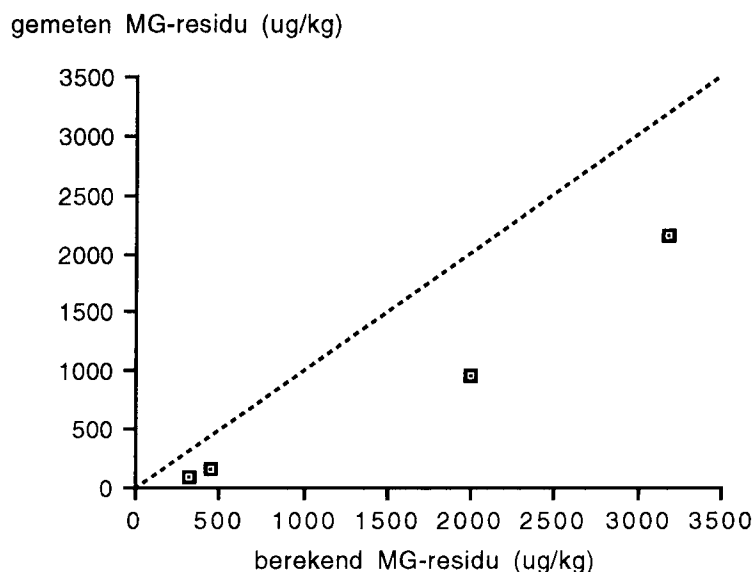
Tabel 12. Overzicht van monsters paling waarin malachietgroen (leuco-base) is aangetoond en waar behandelingsgegevens van bekend zijn. ΔT is het aantal dagen tussen behandeling en monstername.

nr.	behandeling herh. x conc. (mg/l)	residu (l-MG) ug/kg	ΔT dag
36	2 x 0.04	953	3
43	1 x 0.2	81	97
48	?	223	
62	5 x 0.2	2153	56
54	3 x 0.1	953	14
55	2 x 0.3	159	104

In twee gevallen is er korte tijd na behandeling bemonsterd waardoor de residu-concentraties excessief hoog zijn. Hoewel de vis van monster 36 met lage concentraties is behandeld, is de opname van malachietgroen dermate goed dat toch hoge residu concentraties worden bereikt. Monster 62 laat zien wat het effect van een herhaalde hoge dosis is: na 56 dagen is nog steeds een hoog gehalte aan malachietgroen aanwezig. In een aantal gevallen is malachietgroen bij kleine vis gebruikt, terwijl de stof in de monstername niet is aangetoond.

Met de informatie uit tabel 12 en aanvullende informatie omtrent het systeem en de totaal behandelde biomassa kan met het model (bijlage 1) de residu-concentratie berekend worden. Voor een viertal monsters zijn de berekende en gemeten concentraties weergegeven in figuur 3. Uit figuur 3 blijkt dat met het rekenmodel de concentratie met globaal een factor 2 wordt overschat.

Figuur 3. Het verband tussen gemeten concentraties malachietgroen (leucobase) en de berekende waarden op basis van het model uit bijlage 1.



In twee monsters paling is naast malachietgroen een onbekende piek in het chromatogram aanwezig. Mogelijk wordt deze veroorzaakt door methyleenblauw dat op sommige bedrijven in combinatie met malachietgroen wordt gebruikt.

In de monsters forel zijn geen tetracyclines of mebendazole aangetroffen hoewel oxytetracycline op een aantal bedrijven gebruikt zal zijn. Oxolinezuur is in 7 monsters aangetroffen waarvan tweemaal in concentraties hoger dan 10 ug/kg. In 5 gevallen worden sporen oxolinezuur in combinatie met die van flumequine aangetroffen. Flumequine is in een achttal monsters forel aangetroffen in concentraties kleiner dan 10 ug/kg. De herkomst van deze antibiotica is niet te achterhalen. Malachietgroen is in 1993 in 8 van de 36 geanalyseerde monsters forel aangetoond in concentraties variërend van 14 tot 68 ug/kg. In een drietal gevallen is de vis op het bemonsterde bedrijf niet behandeld en was het residu blijkbaar in de aangekochte vis aanwezig. Dit laatste kan ook in andere monsters forel het geval geweest zijn omdat in toenemende mate het echte afmesten van forellen in Nederland wordt verdrongen door import van grotere levende forel uit het buitenland.

In het algemeen is het noodzakelijk dat bij aankoop van levende pootvis garanties worden gevraagd wat betreft aanwezigheid van residuen. Bij aankoop van levende vis is het verstandig een aantal vissen in te vriezen voor eventuele analyse in een later stadium.

5. SYNTHESE

5.1 Gebruik van middelen en voorlopige wachttijden

Op basis van literatuur en de beschikbare metingen kan voorlopig het volgende ten aanzien van eventueel te gebruiken diergeneesmiddelen wat betreft gebruik en wachttijden worden gezegd (tabel 13). Hierbij is uitgegaan van toepassingen zoals vermeld in tabel 2.

Tabel 13. Overzicht van gebruik en wachttijden voor een aantal diergeneesmiddelen.

Middel	Gebruik	Wachttijd
Formaline	geen restricties	24 uur
Mebendazole	alleen paling	30 dagen
Methyleenblauw	alleen vis: < 5 gram	
Malachietgroen	alleen vis: < 5 gram	
Zout	geen restricties	geen
Oxytetracycline	geen restricties	paling: 50 dagen meerval: 30 dagen forel (>10°C): 40 dagen
Trimethosulfmix	alleen vis: < 5 gram	
Flumequine	paling: < 5 gram	meerval: 30 dagen forel (>10°C): 90 dagen
Oxolinezuur	paling: < 5 gram meerval: < 5 gram	forel (>10°C): 20 dagen

Van een aantal middelen is de opname en eliminatie dermate onzeker dat zekerheidshalve alleen een zeer restrictief gebruik kan worden geadviseerd. Het gaat hierbij in feite om alle antibiotica, afgezien van oxytetracycline en methyleenblauw. Indien vanuit therapeutisch oogpunt noodzaak bestaat om minder restrictief te werk te gaan, dan is aanvullend onderzoek noodzakelijk. Voor forel zou men uitsluitend gebruik moeten maken van buitenlandse kennis, ook gezien het feit dat het bij deze soort om een zeer kleine produktie gaat. Een voordeel bij onderzoek van paling en meerval is het feit dat deze soorten bij één temperatuur gehouden worden.

5.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek

Zoals gezegd, is voor een aantal middelen aanvullend onderzoek noodzakelijk om beter bruikbare adviezen met betrekking tot gebruik en wachttijden te geven. Vanuit de therapeutisch hoek dient aangegeven te worden welke middelen daarvoor in aanmerking zouden moeten komen. Daarbij dient bijvoorbeeld rekening gehouden te worden met de aard van het probleem en de ervaringen uit het verleden met bepaalde middelen m.b.t. effectiviteit en resistentie en de beschikbaarheid van een MRL op Europees niveau. In het kader van het project Bedrijfsbegeleiding wordt door ID- en RIVO-DLO een inventarisatie van visziekteproblemen uitgevoerd waarin bovengenoemde aspecten worden meegenomen.

Recirculatiesystemen bieden unieke mogelijkheden om vissen middels baden te behandelen. Met dit type behandeling kan ook slecht etende vis bereikt worden, wat een groot voordeel is boven behandeling middels voer. Daarnaast kan in een recirculatiesysteem de waterkwaliteit tot op zekere hoogte gemanipuleerd worden (pH, zoutgehalte), waardoor opname van middelen in een bad geoptimaliseerd kan worden. Omdat deze vorm van behandelen, vooral voor antibiotica, bij andere vormen van visteelt niet mogelijk is, is relatief weinig bekend over opname van stoffen via badbehandeling. Ook vanuit therapeutisch oogpunt is het noodzakelijk om de opname van stoffen te kennen.

Een complicerende factor bij het gebruik van badbehandelingen in recirculatiesystemen zijn de biologische filters. Deze (bacteriële) filters kunnen gevoelig zijn voor bepaalde typen antibiotica en zijn daarnaast in staat om middelen snel af te breken of in te vangen. Dit laatste is ongewenst wanneer men een bepaalde concentratie gedurende enige tijd wil handhaven. Een dergelijk fenomeen speelt mogelijk een rol bij de soms geconstateerde geringe effectiviteit van formaline tegen ecto-parasieten.

Een van de belangrijke bronnen van kennis omtrent bestrijding van visziekten wordt gevormd door praktijkervaring. In de toekomst zouden praktijkgevallen beter gevolgd en geëvalueerd moeten worden door aanvullend onderzoek. Door in de praktijk vissen na behandeling te bemonsteren kan snel inzicht in effectiviteit en eliminatiesnelheid van een middel ontwikkeld worden.

6. CONCLUSIES

Een negental voor de Nederlandse visteelt noodzakelijk geachte diergeneesmiddelen zijn gescreend wat betreft gegevens omtrent opname en eliminatie van deze stoffen door paling, Afrikaanse meerval en forel.

- Van de negen middelen is van 4 stoffen (formaline, mebendazole, keukenzout en oxytetracycline) voldoende informatie beschikbaar om een voorlopig advies te geven omtrent het gebruik van deze stoffen en een te hanteren wachttijd.
- Een tweetal antiparasitaire middelen worden zeer langzaam uitgescheiden (malachietgroen), of zijn dermate slecht beschreven (methyleenblauw) dat deze middelen in eerste instantie alleen bij pootvis (< 5 gram) kunnen worden aanbevolen/geadviseerd.
- Kennis omtrent opname en eliminatie van een aantal antibacteriële middelen (trimethosulfmix, flumequine en oxolinezuur) door paling en Afrikaanse meerval is dermate beperkt dat deze middelen voorlopig slechts bij pootvis kunnen worden aanbevolen/geadviseerd.
- Voor forel kunnen goede richtlijnen gegeven worden omtrent gebruik van bovengenoemde stoffen. Met name bij deze soort is er echter sprake van toenemende import van grote levende forel uit het buitenland. Aangetoond kon worden dat in een aantal gevallen residuen reeds in aangekochte vis aanwezig waren.
- Middels inventarisatie van bestaande ervaring met therapieën zou de noodzaak van bepaalde behandelingen verder onderzocht moeten worden. Op basis hiervan kan besloten worden welke middelen en toepassingen voor verder onderzoek in aanmerking komen.

7. LITERATUUR

- Alderman, D.J. 1985
Malachite green: a review
J. of Fish Diseases 8: 289-298.
- Alderman, D.J. 1982 b
Malachite green: A code of practice for its use in fish farming.
Fish. not. Dir. Fish. Res. (G.B.); no. 72, 5 pp.
- Alderman, D.J. 1982 a
In vitro testing of fisheries chemotherapeutants.
J. of Fish Diseases 5: 113-123.
- Alderman, D.J. en Clifton-Hadley, R.S. 1993
Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).
J. Fish Dis. 16: 197-311.
- Bauer, K. von, Dangschat, H., Knoppler, H.O. en Neudegger, J. 1988
Uptake and excretion of malachite green in rainbow trout.
Archiv für Lebensmittelhygiene 39(4): 97-102.
- Bjørklund, H. en Bylund, G. 1990
Temperature related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.).
Aquaculture 84: 363-372.
- Bjørklund, H.V., Eriksson, A. en Bylund, G. 1992
Temperature related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*O. mykiss*)
Aquaculture 102: 17-27.
- Black, W.D., Ferguson, H.W., Byrne, P. en Claxton, M.J. 1991
Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus intravenous administration.
J. Vet. Pharmacol. Therap. 14: 351-358.
- Boon J.H., Nouws J.M.F., Heijden van der M.H.T., Booms G.H.R. en Degen M. 1991
Disposition of flumequine in plasma of European eel (*Anquilla anquilla*) after a single intramuscular injection.
Aquaculture 99: 213-223.
- Castell, C.H. en Smith, B. 1973
Measurement of formaldehyde in fish muscle using TCA extraction and the Nash reagent
J. Fish. Res. Bd Can. 30: 91-98.
- Cazabon, D., O'Grady, P., Moloney, M. en Smith, P. 1994
Factors affecting the efficiency of bath administrations of flumequine.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14(6): 197.

- Cravedí, J.-P., Choubert, G. en Delous, G. 1987
 Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and the influence of these antibiotics on lipid digestibility.
 Aquaculture 60: 133-141.
- Elema, M.A. 1995
 Medicated feed pellets in aquaculture.
 p.H.D Thesis , Royal Danish School of Pharmacy, Copenhagen.
- Fujihara, Y., Kano, T. en Fukui, H. 1984
 Sulfisozole-trimethoprim as a chemotherapeutic agent for bacterial infections in yellowtail and eel.
 Gyobyu Kenkyu 19: 35-44.
- Grondel, J.L., Nouws, J.F.M., de Jong, M. Schütte, A.R. en Driessens, F. 1987
 Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration.
 J. of Fish Diseases 10: 153-163.
- Grondel, J.L., Nouws, J.F.M., Schütte, A.R. en Driessens, F. 1989
 Comparative pharmacokinetic investigations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and African Catfish (*Clarias gariepinus*) following oxytetracycline administration.
 J. of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 12: 157-162.
- Heijden, M.H.T. van der, Boon, J.H., Nouws, J.F.M. en Mengelers, M.J.B. 1993
 Residue depletion of flumequine in European eel.
 Residues of veterinary drugs in food: proc. of the Euroresidue II conference,
- Heijden, van der M.H.T., Keukens H.J., Nieuwboer van den W.H.F.X. , Mengelers M.J.B.
 Plasma disposition of flumequine in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) and European eel (*Anguilla anguilla* 1758)
 Aquaculture 123: 21-30. 1994
- Hustved, S.O. en Salte, R. 1991
 Distribution and elimination of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) after a single rapid intravascular injection.
 Aquaculture 92: 297-303.
- Hustved, S.O., Salte, R. en Vassvik, V. 1991
 Absorption, distribution and elimination of oxolinic acid in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after various routes of administration.
 Aquaculture 95: 193-199.
- Hustved, S.V., Salte, R. en Vassvik, V. 1992
 Combatting cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with oxolinic acid: a case report.
 Aquaculture 103: 213-219.
- Ishida, N. 1990
 Comparison of tissue level of oxolinic acid in fresh and sea water fishes after the oral administration.
 Nippon Suisan Gakkaishi 56: 281-286.
- Jacobsen, M.D. 1989
 Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimethoprim.
 J. of Fish Diseases 12: 29-36.

- Kietzmann, M., Hapke, H.J., Beeke, M. en Stehle, S. 1990
 Problems of the application of malachite green in fish.
 Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 97 (7): 290-293.
- Kleinow M., Jarboe H.H.en Shoemaker K.E. 1994
 Comparative Pharmacokinetics and Bioavailability of Oxolinic Acid in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).
 Can. J. Fish. Aquat. Sci., Vol. 51: 1205-1211.
- Ledo, A., Dopazo, C.P., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. en Barja, J.L. 1987
 Effectiveness of different chemotherapeutic agents for controlling bacterial fish diseases.
 Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 7(1): 20-22.
- Liewes, E.W. en Haenen, O.L.M. 1992
 Veterinary aspects of eel diseases.
 In: Aquaculture for Veterinarians. L.Brown editor. Pergamon Press, Oxford.
- Meinertz, J.R., Stehly, G.R., Gingerich, W.H. en Allen, J.L. 1995
 Residues of [¹⁴C]-Malachite green in eggs and fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after treatment of eggs.
 J. of Fish Diseases 18: 239-247.
- Mellergaard, S., Buchmann, K. en Bjerregaard, J. 1990
 Mebendazole residues in eels after an anthelmintic treatment in intensive eel culture.
 In: Residues of veterinary medicines in food. Proc. of the Euroresidue conference,
- Nakagawa, M., Murata, K. Shimokawa, T., Honda, T., Kojima, S. and Uchiyama, M. 1984
 Determination of residual methylene blue and malachite green in muscle and liver of rainbow trout and eel.
 J. Hyg. Chem. 30(5): 301-308.
- Nouws, J.F.M., Boon, J.H., Driessen, F., Mengelers, M.J.B., Booms, G.H.R. en van der
 Residue depletion of oxytetracycline in European eel.
 Residues of veterinary drugs in food: proc. of the Euroresidue II conference,
- Nouws, J.F.M., Grondel, J.L., Boon, J.H. en van Ginneken, V.J.Th. 1992
 Pharmacokinetics of antibiotica in some fresh water fish species.
 In: Chemotherapy in Aquaculture. C.Michel en D.J.Alderman edotors. Office
- O'Grady, P., Moloney, M. en Smith, P.R. 1988
 Bath administration of the quinolone antibiotic flumequine to brown trout *Salmo trutta* and Atlantic salmon *S. Salar*.
 Diseases of Aquatic Organisms 4: 27-33.
- Rogstad, A., Ellingsen, O.F. en Syvertsen, C. 1993
 Pharmacokinetics and bioavailability of flumequine and oxolinic acid after various routes of administration to Atlantic salmon in seawater.
 Aquaculture 110: 207-220.
- Rogstad, A., Hormazabal, V., Ellington, O.F. en Rasmussen, K.E. 1991
 Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater.
 Aquaculture 96: 219-226.

- Salte, R. en Liestol, K. 1983
Drug withdrawal times from farmed fish. Depletion of oxytetracycline, sulfadiazine and trimethprim from muscular tissue of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
Acta Vet. Scan. 24: 418-430.
- Schütte, A.R. en Grondel, J.L. 1988
Therapeutica en visteelt in Nederland.
Verslag Vakgroep EDC, LandbouwUniversiteit Wageningen.
- Sills, J.B. 1979
Residues of formaldehyde undetected in fish exposed to formalin.
Prog. Fish Cult. 41(2): 67-68.
- Snieszko, S.F. en Friddle, S.B. 1951
Tissue levels of various sulfonamides in trout.
Transaction Am. Fish. Soc. 80: 240-250.
- Sohlberg S., Aulie A. en Søli N. 1994
Temperature -dependent absorption and elimination of flumequine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in fresh water.
Aquaculture 119: 1-10.
- Strasdine, G.A. en McBride, J.R. 1979
Serum anti-biotic levels in adult sockeye salmon as a function of route of administration.
J. Fish Biol. 15: 135-140.
- Subasinghe R.P. en Yusoff F.M. 1993
Retention of formaldehyde in the tissues of two tropical species following exposure to therapeutic levels.
Aquaculture & Fisheries Management 24: 693-697.
- Uno, K., Aoki, T. en Ueno, R. 1992
Pharmacokinetic study of oxytetracycline in cultured rainbow trout, amogo salmon and yellowtail.
Jap. Soc. Sci. Fish. 58: 1151-1156.
- Xu, D. en Rogers, W.A. 1993
Formaldehyde residue in striped bass muscle.
Journal of Aquatic Animal Health 5: 306-312.

