



Vlaanderen
is milieu

EMISSIONS NAAR OPPERVLAKTEWATER VAN MEDICIJNEN UIT VETERINAIR GEBRUIK

VMM-ARDW-DSRW/OL201500029 – PERCEEL 1



EMISSIONS NAAR OPPERVLAKTEWATER VAN MEDICIJNEN UIT VETERINAIR GEBRUIK

VMM-ARDW-DSRW/OL201500029 – PERCEEL A

Inhoud

1. SAMENVATTING	2
2. PROBLEEMSTELLING	3
3. MATERIAAL EN METHODEN	4
3.1 Keuze mesttypes.....	4
3.2 Staalname.....	4
3.3 Antibioticagebruik op de bedrijven.....	5
3.4 LC-MS/MS analyse	5
3.4.1 Opgespoorde antibiotica.....	5
3.4.2 Validatie methodologie aminoglycosiden	7
3.4.3 Extractie uit mest.....	8
3.4.4 Werkwijze kwantificatie	8
4. RESULTATEN	10
4.1 Herkomst van de meststalen.....	10
4.2 LC-MS/MS.....	11
4.2.1 Validatie methodologie aminoglycosiden en andere antibiotica (multi-residu).....	11
4.2.2 Gedetecteerde antibioticaresiduen in meststalen.....	12
4.2.3 Concentraties aan antibioticaresiduen in meststalen.....	14
4.2.4 Correlatie van LC-MS/MS resultaten met het antibioticagebruik.....	17
5. REFERENTIES.....	20

1. SAMENVATTING

In het kader van het One Health concept groeit tegenwoordig steeds meer de bezorgdheid omtrent antibioticaresiduen die in de bodem en het oppervlakte- en grondwater terecht kunnen komen. Als gevolg van behandeling van dieren met antibiotica worden immers antibioticaresiduen via de mest of urine uitgescheiden, die wanneer deze mest gebruikt wordt om landbouwgronden te bemesten terechtkomen in het milieu.

Tijdens deze studie werden 100 drijfmeststalen verzameld over Vlaanderen; 91 van varkensmest en 9 van kalvermest. Deze drijfmeststalen werden genomen door de Mestbank op moment van lediging van de kelder of na mesttransport. De stalen werden geanalyseerd op antibioticaresiduen met behulp van vloeistof chromatografie-tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS). Van de 100 drijfmeststalen waren er 4 meststalen die geen antibioticaresiduen bevatten. In de andere 96 meststalen werden tussen de één tot 15 verschillende antibioticaresiduen gedetecteerd. De antibiotica doxycycline, lincomycine en sulfadiazine werden het meest frequent gedetecteerd. De antibiotica neomycine, oxytetracycline, doxycycline en sulfadiazine werden in de hoogste concentraties teruggevonden, nl. met gemiddelden boven 1000 µg/kg mest. Hierbij moet echter opgemerkt worden dat voor sulfadiazine bij 64 van 73 meststalen waar dit antibioticum gedetecteerd werd, de gemeten concentratie onder 100 µg/kg was en bij 3 stalen de gemeten concentratie hoger was dan 1000 µg/kg, waarvan 1 meer dan 80000 µg/kg wat het hoge gemiddelde verklaart. De antibiotica tylosine, flumequine en lincomycine werden in middelhoge concentraties teruggevonden met gemiddelde concentraties boven 100 µg/kg mest. De antibiotica paromomycine, gentamicine, tilmicosine, tulathromycine, thiamuline, chloortetracycline, tetracycline, ciprofloxacin, tylvalosine, enrofloxacin, marbofloxacin, gamithromycine, danofloxacin, sulfadoxine, trimethoprim en sulfamethazine werden allen teruggevonden in gemiddelde concentraties onder 100 µg/kg mest met de 5 laatste antibiotica onder 10 µg/kg.

Deze studie had eveneens als doel om in kaart te brengen welke antibiotica toegediend waren aan de dieren vanwaar de meststalen afkomstig waren. Voor 35 bedrijven was het mogelijk om het antibioticagebruik in kaart te brengen. Hieruit bleek dat β-lactam antibiotica het meest gebruikt werden, gevolgd door de tetracyclines, lincomycine en colistine. β-lactam antibiotica werden in de meststalen niet gedetecteerd aangezien deze snel afgebroken worden in de matrix mest. Colistine was niet opgenomen in de gebruikte methodologie omdat deze component een afwijkende extractiemethodologie vergt dan de andere componenten. Voorts was het bij de bevraging betreffende antibioticagebruik niet altijd duidelijk hoe ver terug in de tijd gegaan moest worden aangezien niet altijd gekend was wanneer de mestkelder voor het laatst -al dan niet volledig- geledigd was. Bijkomend kon mest van andere dieren (met ander antibioticagebruik) aanwezig zijn in de mest waarvan een staal was genomen, aangezien -afhankelijk van mestopslagcapaciteit- mest van de ene kelder overgepompt kan worden naar een andere kelder. Omwille van deze redenen was het moeilijk om een correlatie te vinden tussen antibioticagebruik en de opgespoorde antibioticaresiduen.

In verder onderzoek is het noodzakelijk om het belang van de teruggevonden antibioticaconcentraties te onderzoeken. Zo moet de invloed van biotische (vb. UV, temperatuur) en abiotische (vb. stabiliteit van het antibioticum) factoren op deze antibiotica na het uitrijden van de mest op het land berekend worden om zo de impact van deze antibioticaresiduen in bodem en water te evalueren.

2. PROBLEEMSTELLING

Naast de gekende milieuproblematiek die mest veroorzaakt, groeit tegenwoordig bezorgdheid omtrent antibioticaresiduen die mogelijk via uitgereden mest in de bodem en het oppervlakte- en grondwater terecht kunnen komen.

Als gevolg van behandeling van dieren met antibiotica worden antibioticaresiduen uitgescheiden via de mest of urine die op die manier ook terecht komen in het milieu. Men schat dat over het algemeen 75% van alle antibiotica onveranderd in de mest of urine uitgescheiden worden (Chee-Sanford et al., 2009). Verder hebben enkele studies aangetoond dat de aanwezigheid van zelfs zeer lage antibioticaconcentraties, zoals aanwezig in het milieu, kunnen selecteren voor resistente bacteriën, die ook aanwezig kunnen blijven eens de selectieve druk opgeheven wordt (van der Horst et al., 2011).

De laatste jaren zijn er enkele studies gepubliceerd over antibioticaresiduen in mest en in de bodem. Deze studies wijzen erop dat antibioticaresiduen zeer lang aanwezig kunnen blijven in de bodem afhankelijk van het soort antibioticum, de bodemeigenschappen, pH, temperatuur, vochtigheid en de reeds aanwezige bacteriële gemeenschap. De stabiliteit van antibiotica hangt voornamelijk af van het antibioticum zelf; zo worden β -lactam antibiotica zoals amoxicilline veelal vrij snel afgebroken in de bodem, terwijl tetracyclines en fluoroquinolonen meerdere maanden tot zelfs jaren stabiel kunnen blijven in de bodem (Jechalke et al., 2014). Het gedrag van antibiotica in de bodem kan ook verschillen. Zo toonden Hamsher et al. (2005) aan dat tetracyclines accumuleerden in de bovenste 30 cm van de bodem na herhaaldelijk uitrijden van mest met concentraties hoger dan 150 $\mu\text{g/kg}$ bodem. Voor sulfamethazine werden slechts zeer lage waarden gemeten in de toplaag, maar dit antibioticum werd teruggevonden op een diepte van 1.4 m in het grondwater wat wijst op een mogelijke uitwassing van het antibioticum naar het grondwaterniveau. Verder heeft men ook aangetoond dat antibiotica opneembaar zijn door groenten en gewassen en dat er een lineair verband bestaat tussen accumulatie in planten en concentratie van een bepaald antibioticum (Dolliver et al., 2006).

Het doel van deze studie was om antibioticaresiduen te gaan kwantificeren in meststalen die op Vlaamse landbouwgrond uitgereden worden.

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1 Keuze mesttypes

In Vlaanderen werd in 2015 ongeveer 126 miljoen kg N en 60 miljoen kg P₂O₅ dierlijke mest geproduceerd, waarvan ongeveer 55% afkomstig was van runderen, 33% van varkens en 10% van pluimvee (Mestrapport, 2016). Er werd in 2015 92 miljoen kg N en 41 miljoen kg P₂O₅ dierlijke mest op Vlaamse landbouwgrond uitgereden. De mest van de runderen wordt vrijwel volledig gebruikt op Vlaamse landbouwgrond, in tegenstelling tot de pluimveemestproductie waarvan slechts een minieme fractie op grond wordt geplaatst. Pluimveemest wordt immers door het hoge fosfaatgehalte minder gebruikt op landbouwgronden en wordt veeleer gecomposteerd en/of geëxporteerd. Ongeveer de helft van de varkensmestproductie wordt op Vlaamse landbouwgrond uitgereden. De overige helft wordt verwerkt en geëxporteerd uit Vlaanderen. Mest van runderen en varkens wordt voornamelijk gebruikt om graslanden te bemesten en maïs en graangewassen te telen (Tabel 1).

Sector	Productie dierlijke mest in Vlaanderen ^a Uitgedrukt in miljoen kg N (%)	Gebruik dierlijke mest op Vlaamse landbouwgronden ^a Uitgedrukt in miljoen kg N (%)	Geschat gebruik antibiotica in België ^b Uitgedrukt in ton
Totaal	126	92.4	267.7
Runderen	69.1 (55%)	65.0 (70%)	25.2 ¹
Varkens	41.0 (33%)	22.4 (24%)	159.4 ²
Pluimvee	13.2 (10%)	0.62 (<1%)	26.5 ³

Tabel 1. Productie van dierlijke mest en gebruik van dierlijke mest in Vlaanderen in 2015, uitgedrukt in miljoen kg N. Indien uitgedrukt in P₂O₅ bekomt men percentages.

1 enkel vleeskalveren (aangezien melkkoeien weinig antibiotica toegediend krijgen)

2 gebaseerd op vleesvarkens

3 enkel vleeskippen (aangezien legkippen weinig antibiotica toegediend krijgen)

a Mestrapport (2016)

b Fillippitzi et al. (2014)

Aangezien pluimveemest als ruwe mest niet gebruikt wordt op Vlaamse bodems, werd beslist om de studie te richten op varkensmest en rundermest. Rekening houdend met 1/ het hoge antibioticagebruik bij varkens en vleeskalveren en 2/ het aantal dieren in Vlaanderen binnen deze sectoren (6.26 miljoen varkens vs 150.000 vleeskalveren) werd beslist om 100 stalen van ruwe varkensmest en ruwe vleeskalvermeststalen te nemen in een verhouding die de werkelijke situatie weerspiegelt.

3.2 Staalname

Er werden tussen 22 februari en 5 mei 2017 100 drijfmeststalen verzameld over Vlaanderen. Er werd geopteerd om de staalname te laten uitvoeren door de Mestbank, tijdens het laden of het lossen van de drijfmest. Ten eerste is men zo zeker van de homogenisatie van de stalen, aangezien de Mestbank eveneens stalen neemt ter bepaling van het stikstof en fosfaatgehalte. Ten tweede zijn op die manier de bedrijven representatief over heel Vlaanderen gekozen, rekening houdende met de dichtheid van de varkens- en vleeskalverindustrie in de verschillende gebieden.

Tijdens de staalname werd eveneens een begeleidende brief afgegeven aan de landbouwer om te melden dat er een extra staal werd genomen voor analyse op antibioticaresiduen op het ILVO en dat ze in een latere fase gecontacteerd zouden worden om het antibioticaregister in te kijken. Een beperkt aantal landbouwers weigerden om een staal te laten nemen. Dit had echter geen invloed op de studie omdat het slechts een

beperkt aantal was, omdat ze eerder weigerden uit principiële redenen en omdat er stalen werden genomen tot het aantal van 100 stalen werd bereikt.

De door de mestbank verzamelde stalen werden verzegeld en gekoeld bewaard tot ze (gekoeld) getransporteerd werden naar het ILVO. Daar werden de stalen onmiddellijk na aankomst gehomogeniseerd en uitverdeeld in porties van 2g en 5 g in polypropyleenbuizen (in drievoud) en in de diepvries (-20°C) bewaard tot analyse.

3.3 Antibioticagebruik op de bedrijven

Informatieoverdracht van Mestbank naar ILVO betreffende de ligging van de bedrijven, de contactgegevens van de landbouwers, informatie over de diersoort en -type en de xy-coördinaten waar de mest werd uitgereden werd goedgekeurd door de privacycommissie (Beraadslaging VTC 05/2017).

In de loop van juni, juli en augustus werden alle landbouwers uit de studie gecontacteerd (2x telefonisch). Een groot deel was niet bereikbaar en een aantal weigerden medewerking. Uiteindelijk werden van 35 bedrijven gegevens verkregen betreffende het antibioticagebruik, hetzij via een bezoek, hetzij via mail, afhankelijk van wat de landbouwer zelf wenste. Bijkomend werd ook gevraagd naar de laatste lediging van de mestkelder voor de eigenlijke staalname.

3.4 LC-MS/MS analyse

3.4.1 Opgespoorde antibiotica

De methodologie om antibioticaresiduen, hierna 'multiresidu-methode' genoemd, in mest te analyseren is beschreven in het ILVO artikel "Development, validation and application of an ultra-high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. T. Van den Meersche et al, 2015 J. Chromatogr. A, 1429, 248-257".

In deze methode werd gewerkt op ceftiofur, doxycycline, oxytetracycline, sulfadiazine, trimethoprim en tylosine A. Daarnaast beschikt het ILVO over een ISO17025 geaccrediteerde methode voor de bepaling van diergeneesmiddelen in vlees (CL/015). Alle antibiotica die met die methode opgespoord worden in vlees werden toegevoegd aan de methodologie beschreven voor mest. Voor de antibiotica die uiteindelijk teruggevonden werden in de messtalen van het project werden de detectielimiet (LOD), de kwantificatielimiet (LOQ) en de uitgebreide meetonzekerheid bepaald (behalve de meetonzekerheid voor tiamuline, tulathromycine en chloortetracycline). Voor de aminoglycosiden echter is deze methode niet bruikbaar door hun afwijkende chemische eigenschappen. Voor deze groep van antibiotica moest een andere methode ontwikkeld en gevalideerd worden. Hierbij werd gesteund op een bestaande methode voor de bepaling van aminoglycosiden in vlees en er werd een mini-validatie uitgevoerd in mest met de bepaling van LOD, LOQ en uitgebreide meetonzekerheid. Daarbij werd gebruik gemaakt van gegevens bekomen op 2 verschillende dagen en 3 verschillende concentratielevels (hoog, midden en laag).

In hoger vermeld artikel van Van den Meersche (2015) werd ook colistine geanalyseerd. Om colistine te kunnen extraheren moest er 6 % trichloorazijnzuur gebruikt worden wat echter nefast bleek voor een aantal andere componenten (vb. β -lactamantibiotica) uit de multi-residu methode. Daarom werd er geopteerd om in deze studie colistine weg te laten daar er met de multi-residu methode heel wat meer antibiotica konden gedetecteerd worden.

In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de opgespoorde antibiotica met de twee gebruikte methoden.

Multiresidu-methode	Aminoglycosiden
<i>β-lactamantibiotica</i>	apramycine
amoxicilline	dihydrostreptomycine
ampicilline	gentamicine
benzylpenicilline	kanamycine
cloxacilline	neomycine
dicloxacilline	paromomycine
nafcilline	spectinomycine
oxacilline	streptomycine
penicilline V	tobramycine
cefalexine	
cefalonium	<i>Inwendige standaarden</i>
cefapirine (+metaboliet desacetylcefaprine)	ribostamycine
cefazoline	
cefoperazone	
cefquinome	
ceftiofur (+metaboliet desfuroylceftiofur cysteïne disulfide)	
<i>Tetracyclines</i>	
chloortetracycline	
doxycycline	
oxytetracycline	
tetracycline	
<i>Macroliden</i>	
erythromycine	
gamithromycine	
spiramycine	
tilmicosine	
tulathromycine	
tylosine	
<i>Pleuromutilinen</i>	
tiamuline	
valnemuline	
<i>Quinolones</i>	
cinoxacine	
nalidixinezuur	
oxolinezuur	
<i>Fluoroquinolonen</i>	
ciprofloxacin	
danofloxacin	
difloxacin	
enoxacin	
enrofloxacin	
norfloxacin	
flumequine	
marbofloxacin	
sarafloxacin	
<i>Lincosamiden</i>	
lincomycine	
pirlymicine	
<i>Sulfamiden en trimethoprim</i>	
sulfachloropyridazine	
sulfaclozine	
sulfadiazine	
sulfadimethoxine	

sulfadoxine
sulfamerazine
sulfamethazine
sulfamethoxazole
sulfamethoxypyridazine
sulfapyridine
sulfaquinoxaline
sulfathiazole
trimethoprim

Amphenicolen
chloramphenicol
florfenicol
thiamfenicol

Diaminopyrimidinederivaten
dapsone

Inwendige standaarden
cincophen
trimethoprim-d9
sulfadimethoxine ¹³C₆
lomefloxacin
clindamycine
methacycline
cefotaxime
ceftiofur-d3
piperacilline
roxithromycine
chloramfenicol-d5

Tabel 2. Overzicht van de antibiotica die geanalyseerd kunnen worden in mest met behulp van LC-MS/MS.

3.4.2 Validatie methodologie aminoglycosiden

Voor de methode die ontwikkeld werd voor de bepaling van aminoglycosiden werd een mini-validatie uitgevoerd. De LOD en LOQ werden bepaald met de ijklijnmethode waarbij:

LOD = 3 x standaardafwijking van de y-asafsnede van de kalibratiecurve/richtingscoëfficiënt van de kalibratiecurve

LOQ = 10 x standaardafwijking van de y-asafsnede van de kalibratiecurve/richtingscoëfficiënt van de kalibratiecurve

Voor de bepaling van de lineariteit werden twee kalibratiecurves geanalyseerd in een concentratierange van 0 tot 2000 µg/kg (tot 4000 µg/kg voor streptomycine en tot 8000 µg/kg voor spectinomycine).

De terugvinding, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid werden bepaald met behulp van blanco varkensmest die belast werd aan 3 verschillende concentratieniveaus per component. Deze concentraties worden weergegeven in Tabel 3. De Uitgebreide meetonzekerheid werd berekend met een coverage factor van 2.

Component	Level 1 (µg/kg)	Level 2 (µg/kg)	Level 3 (µg/kg)
apramycine	250	500	1000
dihydrostreptomycine	250	500	1000
gentamycine	250	500	1000
kanamycine	250	500	1000
neomycine	250	500	1000
paromomycine	250	500	1000
spectinomycine	1000	2000	4000
streptomycine	500	1000	2000
tobramycine	250	500	1000

Tabel 3: concentratielevels gebruikt tijdens de validatie van de bepaling van aminoglycosiden

3.4.3 Extractie uit mest

Multiresidu-methode: Aan het ontdooide meststaal (2g) werden de inwendige standaarden toegevoegd. Het mengsel werd 10 minuten geëquilibreerd alvorens 2 ml trichloorazijnzuur (6 % in acetonitrile, ACN) toe te voegen. Vervolgens werd het mengsel gedurende 30 minuten gehomogeniseerd op de schudder. Dit mengsel werd vervolgens gedurende 15 minuten gecentrifugeerd aan 4000g. Het supernatans werd overgebracht in een nieuwe polypropyleenbuis en drooggedampt onder stikstof bij 45°C. Het residu werd opgelost in 1 ml water/ACN (80/20, v/v). Dit werd vervolgens gedurende 1 min gevortexed en 5 min in het ultrasoonbad geplaatst. Dit mengsel werd tot slot gefiltreerd over een 0,22 µm filter, 10 x verdund, gehomogeniseerd en 5 µl werd in het LC-MS/MS systeem geïnjecteerd (Acquity UHPLC, Kinetex C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,7 µm, 100Å) en Security Guard ULTRA cartridge UHPLC C₁₈, solvent 1: H₂O/ACN (95/5, v/v) + 0,5 % mierenzuur + 0,1 % ammoniumformaat, solvent 2: ACN + 0,1 % mierenzuur). Er werd een gradiëntelutie uitgevoerd waarbij men vertrekt van een laag percentage ACN naar een hoog percentage ACN.

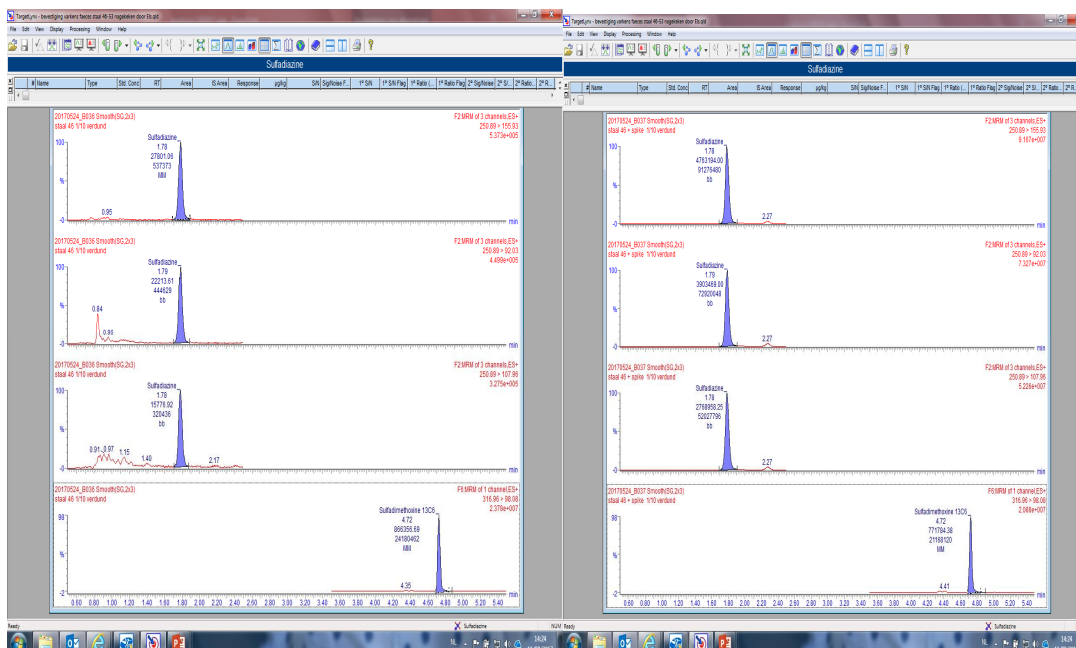
Aminoglycosiden: Aan het ontdooide meststaal (5g) werd de inwendige standaard toegevoegd. Het mengsel werd 10 minuten geëquilibreerd alvorens 15 ml trichloorazijnzuur (20 %) toe te voegen. Vervolgens werd het mengsel gedurende 15 minuten gecentrifugeerd aan 4700 tpm. Het supernatans werd vervolgens opgezuiverd over OASIS HLB vaste fase extractiekolommen. Tot slot werd het extract gefilterd en 10 µl geïnjecteerd in het LC-MS/MS systeem (Acquity UHPLC, kolom: Obelisc R (Sielc) (2,1 x 100 mm; 5 µm, 100Å) en analoge pre-kolom, solvent 1: water + 0,1 % mierenzuur, solvent 2: acetonitrile + 0,1 % mierenzuur). Er werd een gradiëntelutie uitgevoerd waarbij men vertrekt van een laag percentage ACN naar een hoog percentage ACN.

3.4.4 Werkwijze kwantificatie

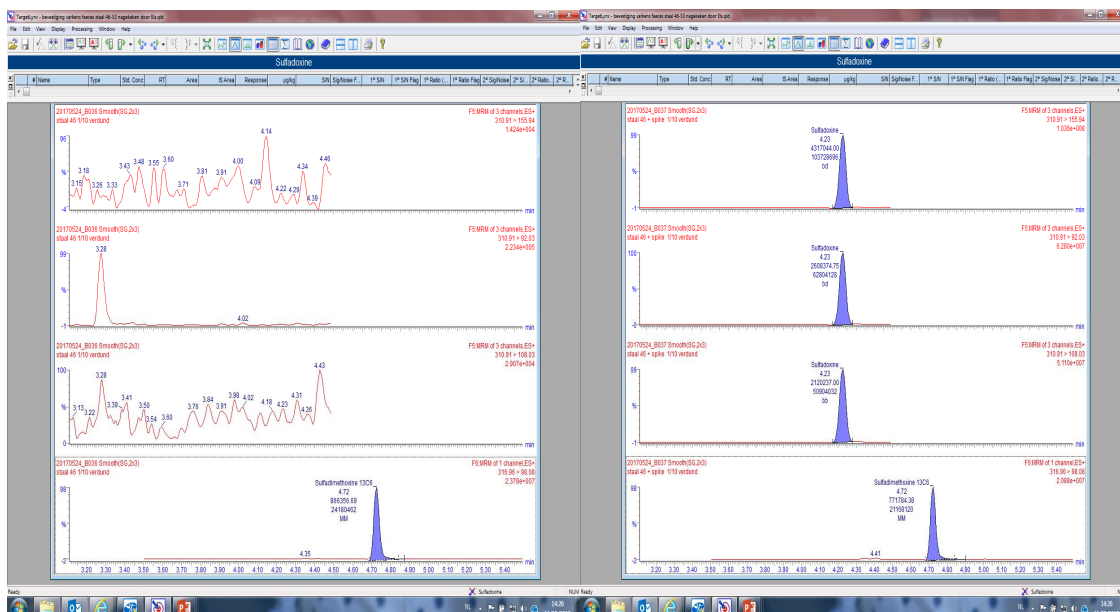
Door het verschil in samenstelling tussen de verschillende meststalen kon er niet gewerkt worden met ijklijnen van pure standaarden. In theorie zou dus voor elk staal standaardadditie moeten uitgevoerd zijn wat impliceert dat elk staal 6 maal moest geanalyseerd worden (1 keer als dusdanig en 5 keer belast met stijgende concentraties aan antibiotica). Dit was praktisch niet haalbaar (tijd + financieel). Daarom werd geopteerd om te werken met een 1-punts standaardadditie. Elke staal werd 4 keer geanalyseerd: 1 keer als dusdanig met de multi-residu methode, 1 keer belast met 500 µg/kg van alle antibiotica met de multi-residu methode; 1 keer als dusdanig met de aminoglycosiden methode en 1 keer belast aan 500 µg/kg aminoglycosiden met de aminoglycosiden methode. De bekomen concentraties moeten daarom als semi-kwantitatief beschouwd worden.

Als voorbeeld worden de chromatogrammen getoond voor staal 46 voor de componenten sulfadiazine en sulfadoxine. Aan de linkerkant staat het chromatogram van het staal als dusdanig, aan de rechterkant het chromatogram van het staal belast aan 500 µg/kg. Men kan vaststellen dat in staal 46 sulfadiazine aanwezig was en dat sulfadoxine niet aanwezig was; In de onderste traces ziet men het signaal van de inwendige standaard die aan alle stalen toegevoegd werd.

Sulfadiazine



Sulfadoxine



4. RESULTATEN

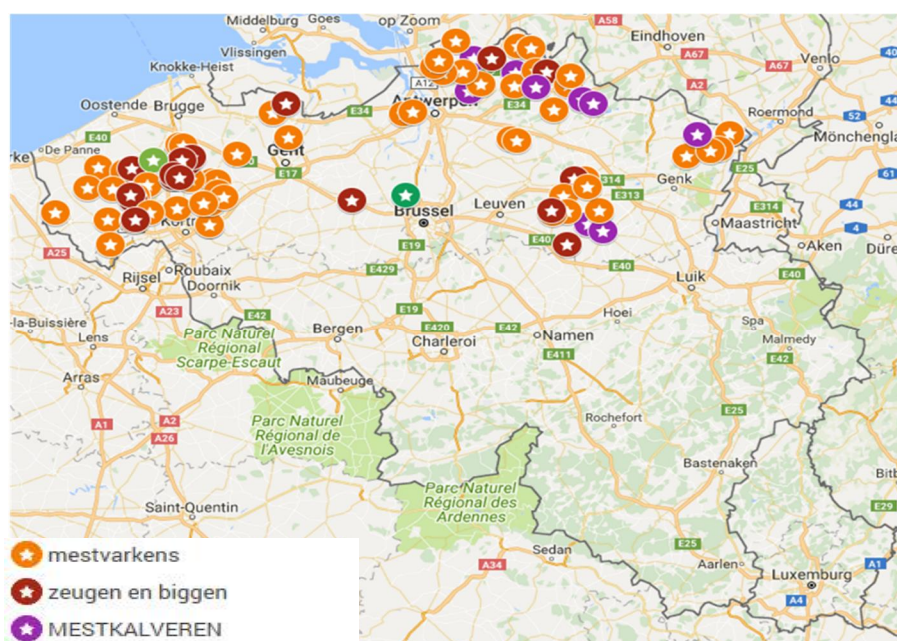
4.1 Herkomst van de meststalen

Er waren 9 stalen afkomstig uit de mestkalversector en 91 stalen uit de varkenssector. In deze groep werd er verder nog een onderscheid gemaakt tussen mestvarkens (n=72) en zeugen en biggen (n=17) omdat deze laatste groep over het algemeen meer antibiotica krijgt dan de mestvarkens. Bijvoorbeeld, sinds 2015 mogen mestvarkens vanaf de leeftijd van 15 weken geen met antibiotica gemedicineerde voeders toegediend meer krijgen.

Diersoort	Aantal stalen
mestkalveren	9
mestvarkens	72
zeugen en biggen	17
varkens onbepaald	2
Totaal	100

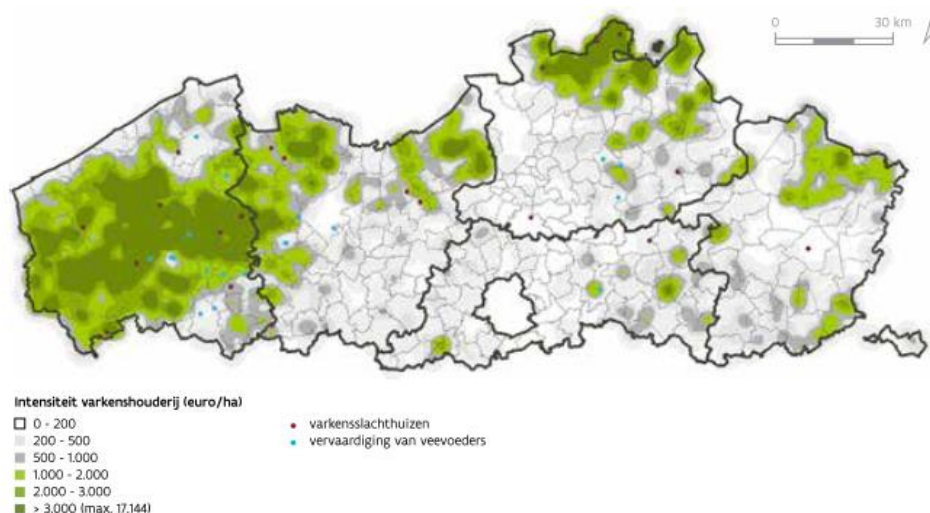
Tabel 4. Overzicht van de herkomst van de meststalen

Bijna de helft van de drijfmeststalen (n=45) werd genomen in West-Vlaamse bedrijven. Deze stalen betroffen allen varkensmeststalen: 34 waren afkomstig van vleesvarkens en 10 van zeugen en biggen. In Antwerpen werden 23 stalen genomen waarvan 6 van mestkalveren, 15 van mestvarkens en 2 van zeugen en biggenmest. Uit Limburg en arrondissement Leuven waren er 22 stalen afkomstig; 3 van mestkalveren, 16 van mestkalveren en 3 van zeugen en biggen. Er waren 9 meststalen afkomstig uit Oost-Vlaamse bedrijven, nl. 7 van mestvarkens en 2 van zeugen en biggen. Tot slot was er één staal afkomstig uit Vlaams-Brabant (Figuur 1).



Figuur 1: overzicht van de herkomst van de meststalen.

De vleeskalversector is voornamelijk gesitueerd in het noorden van Antwerpen en de ligging van alle varkensbedrijven in Vlaanderen kan gezien worden in Figuur 2. We kunnen dus concluderen dat de staalname de geografische spreiding de varkens- en mestkalverindustrie weerspiegelt.



Figuur 2. Intensiteit van de varkenshouderij per regio (Figuur uit Landbouwrapport 2016)

4.2 LC-MS/MS

4.2.1 Validatie methodologie aminoglycosiden en andere antibiotica (multi-residu)

In tabel 5 wordt een overzicht gegeven van de bekomen validatieparameters voor de bepaling van aminoglycosiden in varkensmest.

Component	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Herhaalbaarheid (%)	Intralabo- reproduceerbaarheid (%)	Meetonzekerheid (%)	Lineariteit (R ²)
apramycine	34	113	8	9	29	0.9946
dihydrostreptomycine	10	33	6	8	22	0.9938
gentamicine	21	72	9	8	31	0.9899
kanamycine	73	243	20	26	64	0.9763
neomycine	47	157	11	15	46	0.9885
paromomycine	29	97	6	9	30	0.9954
spectinomycine	394	1313	25	55	126	0.9112
streptomycine	32	107	7	7	22	0.9946
tobramycine	17	57	8	10	35	0.9895

Tabel 5. Overzicht validatieparameters voor de bepaling van aminoglycosiden in varkensmest

Bij het uitvoeren van de validatie bleek dat de inwendige standaard ribostamycine niet ideaal was daar naarmate hogere concentraties werden toegevoegd van de aminoglycosiden er een grote interferentie optrad op de trace van ribostamycine. Dit werd in de methodes van vlees en melk niet waargenomen. Daarom werden alle berekeningen absoluut uitgevoerd (niet relatief ten opzichte van inwendige standaard).

Naar analogie met de validatieparameters bekomen voor de bepaling van aminoglycosiden in vlees en melk zijn de bekomen meetonzekerheden bekomen voor sommige componenten (vb. spectinomycine en

kanamycine) aan de hoge kant. Voor spectinomycine werd niet voldaan aan het interne criterium voor lineariteit wat zich ook vertaalt in de grote meetonzekerheid. Dit is een groep van componenten waarvan de analyse niet zo eenvoudig is.

Voor de antibiotica (behorend tot de groep van de multi-residu) die teruggevonden werden in de meststalen werden LOD, LOQ en uitgebreide meetonzekerheid bepaald. De bekomen resultaten werden weergegeven in tabel 6. De meetonzekerheid voor tiamuline, tulathromycine en chloortetracycline werd niet bepaald. Ter info geven we mee dat de uitgebreide meetonzekerheden voor deze componenten in vlees respectievelijk 29%, 29% en 22% bedragen.

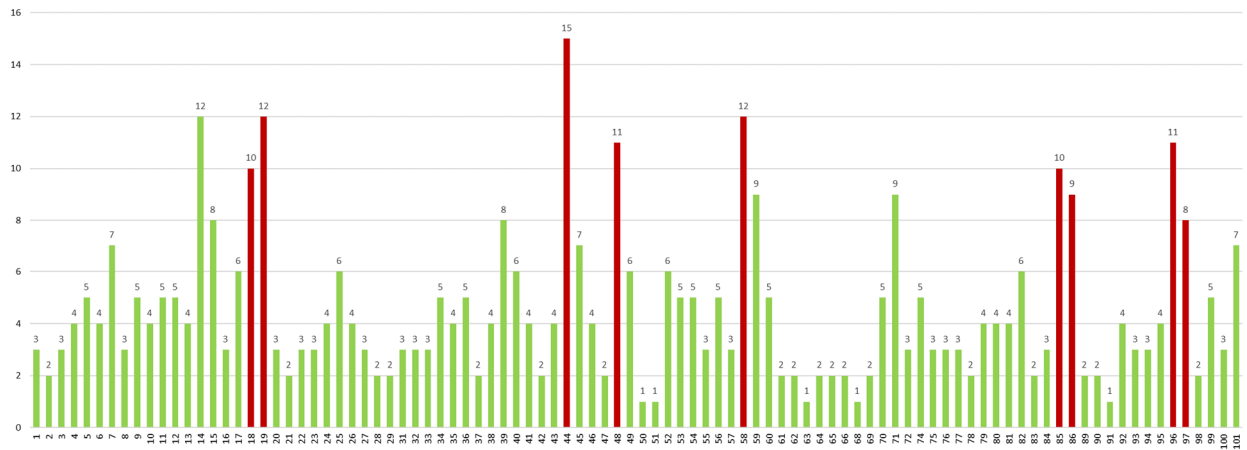
Component	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	uitgebreide meetonzekerheid (%) (k=2)
flumequine	0,76	2,5	31
sulfamethazine	0,89	3,0	22
sulfadoxine	0,81	2,7	22
ciprofloxacin	1,6	5,2	31
danofloxacin	1,8	5,8	26
enrofloxacin	1,9	6,2	44
marbofloxacin	1,8	5,8	26
lincomycine	2,7	9,0	33
tetracycline	3,0	9,9	43
gamithromycine	1,8	5,8	34
tilmicosine	2,4	8,0	17
tylosine	5,2	12,7	28
tylvalosine	1,6	5,2	37
tiamuline	5,0*	16,7*	-
tulathromycine	10,0*	33,3*	-
chloortetracycline	4,0*	13,3*	-

Tabel 6: validatiegegevens voor antibiotica (multi-residu) teruggevonden in mest (* werd visueel bepaald aan de hand van de chromatogrammen)

4.2.2 Gedetecteerde antibioticaresiduen in meststalen

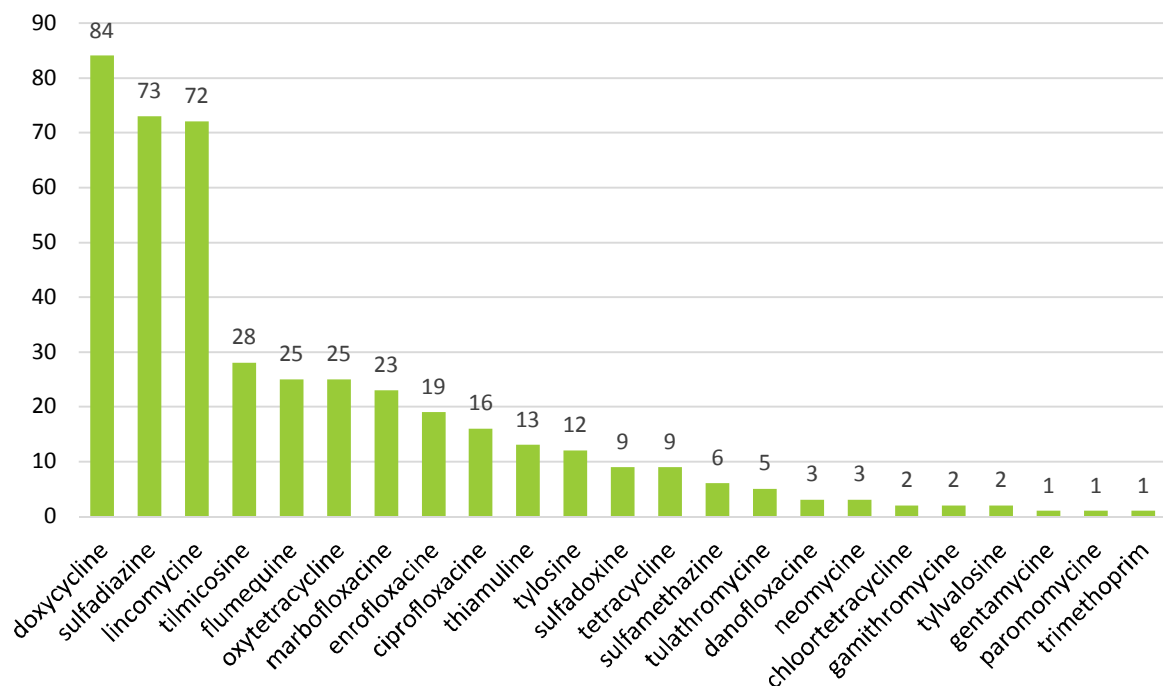
Alhoewel penicillines ook vaak gebruikt worden in de varkenssector (vb. amoxicilline, ceftiofur, ...) werden deze antibiotica niet gedetecteerd in de mest geanalyseerd in het kader van deze studie. Ook in de publicatie van Van den Meersche (2015) werd dit gemeld. Ook Berendsen et al. (2015) maakten melding van het feit dat penicillines onstabiel zijn in de matrix mest.

In 4 van de 100 meststalen werden geen antibioticaresiduen teruggevonden, nl. drie meststalen afkomstig van mestvarkens (staal 30, 67 en 88) en één van zeugen en biggen (staal 87). In de andere 96 meststalen werden tussen de één tot 15 verschillende antibioticaresiduen gedetecteerd (Figuur 3).



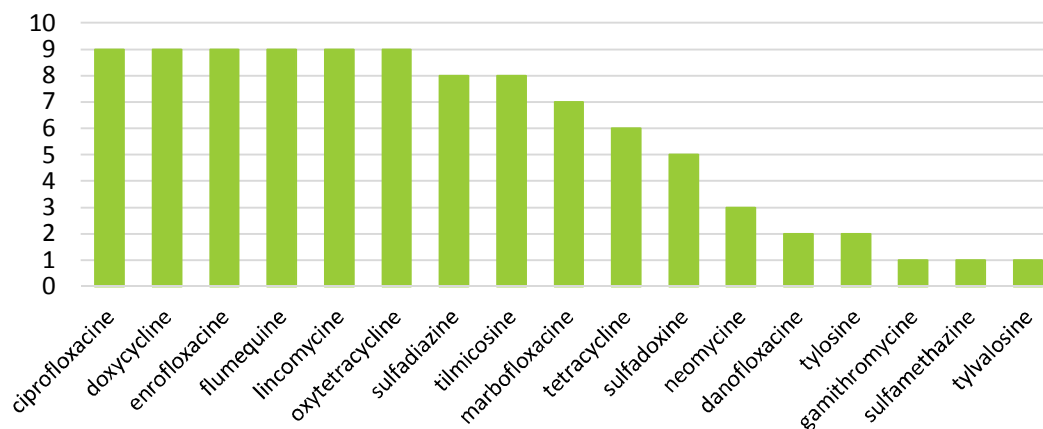
Figuur 3. Het aantal gedetecteerde antibioticaresiduen per meststaal (groen: meststaal van varkens, rood meststaal van mestkalveren, n=96)

Bepaalde antibioticaresiduen werden vaker aangetroffen dan andere componenten. Zo werden doxycycline, lincomycine en sulfadiazine het meest frequent gedetecteerd, waarbij deze antibiotica in meer dan 70% van de meststalen werden teruggevonden. De antibiotica tilmicosine, flumequine, oxytetracycline, marbofloxacin werden in meer dan 20% van de meststalen teruggevonden. Enrofloxacin, ciprofloxacin, thiamuline en tylosine werden in meer dan 10% van de stalen gedetecteerd. De andere antibiotica werden in minder dan 10% van de meststalen gedetecteerd.

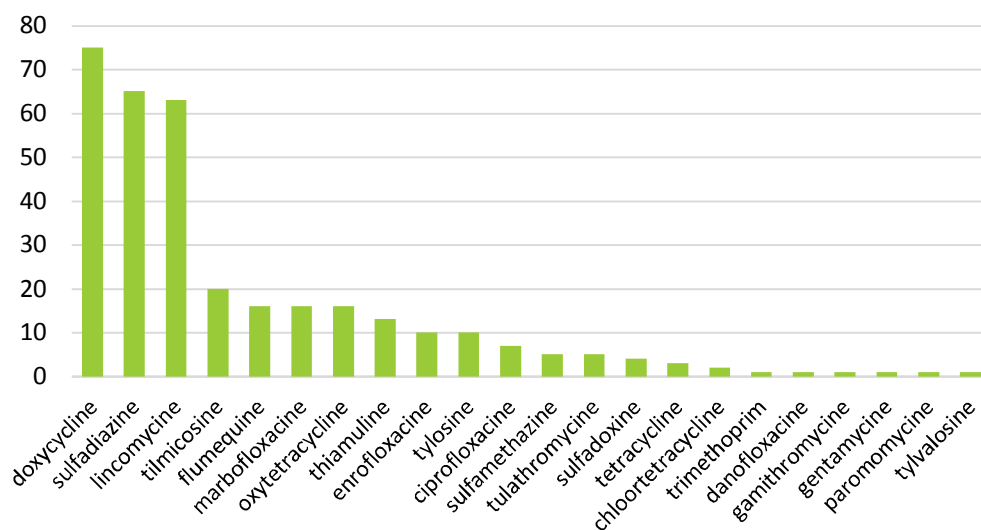


Figuur 4. Het aantal keer dat elk antibioticaresidu werd aangetroffen in de 100 meststalen.

In Figuur 5 en 6 worden de gedetecteerde antibioticaresiduen verder opgesplitst per diersoort. Bij de mestkalveren werden de tetracyclines doxycycline en oxytetracycline gedetecteerd in alle stalen, net zoals de quinolonen flumequine, enrofloxacin en zijn metaboliet ciprofloxacine, en het lincosamide lincomycine.



Figuur 5. Gedetecteerde antibioticaresiduen in mest van mestkalveren (n=9)



Figuur 6. Gedetecteerde antibioticaresiduen in varkensmest (n=91)

4.2.3 Concentraties aan antibioticaresiduen in meststalen

Wanneer een component gedetecteerd werd maar met een waarde onder de Limit of Quantification (LOQ) werd de waarde van LOQ gebruikt in de verdere berekeningen. Dit houdt dus in dat er mogelijk een lichte overschatting is in de lage concentraties (worst case scenario).

In bijlage 1 kan de tabel met de ruwe data teruggevonden worden met per staal de gemeten concentraties voor elk antibioticum. Tabel 7 geeft een samenvatting weer van het gemiddelde, mediaan, minimum, maximum, 1e en 3^e kwartiel van alle gekwantificeerde waarden per antibioticum.

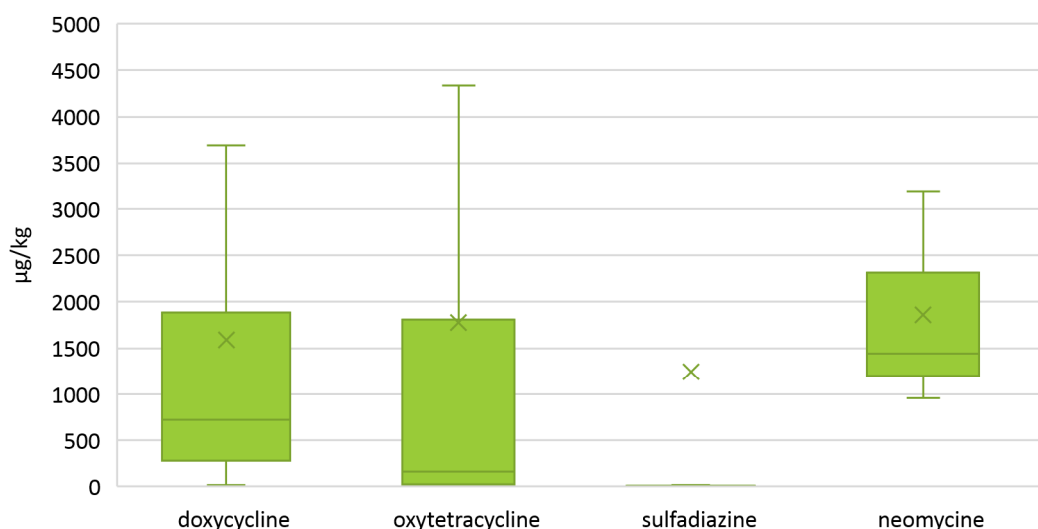
antibiotica	gemiddelde (µg/kg)	mediaan (µg/kg)	min (µg/kg)	max (µg/kg)	1e kwartiel (µg/kg)	3e kwartiel (µg/kg)
neomycine	1862,7	1442,0	960,0	3186,0	1201,0	2314,0
oxytetracycline	1776,5	160,7	11,3	19522,2	26,7	1810,0
doxycycline	1588,5	722,9	17,9	13632,1	277,0	1888,8
sulfadiazine	1246,6	3,5	3,5	84084,1	3,5	9,2
tylosine	697,1	163,2	17,3	5599,0	73,0	283,6
flumequine	248,1	11,0	2,5	4494,3	2,9	1027,8
lincomycine	159,4	21,9	9,0	3153,8	9,0	78,4
paromomycine	97,0	97,0	97,0	97,0	97,0	97,0
gentamicine	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0
tilmicosine	64,4	9,1	8,0	1148,5	8,0	22,1
tulathromycine	45,2	37,5	33,3	80,3	33,3	41,5
thiamuline	40,9	29,8	16,7	120,5	16,7	36,3
chloortetracycline	35,9	35,9	13,3	58,5	24,6	47,2
tetracycline	35,3	20,5	9,9	167,6	12,6	27,8
ciprofloxacin	29,9	7,9	5,2	234,3	5,2	28,5
tylvalosine	26,3	26,3	8,1	44,4	17,2	35,3
enrofloxacin	22,2	9,5	6,2	161,3	6,5	22,4
marbofloxacin	17,9	7,0	5,8	112,0	5,8	14,6
gamithromycine	8,0	8,0	5,8	10,2	6,9	9,1
danofloxacin	6,6	5,9	5,8	8,1	5,9	7,0
sulfadoxine	5,6	4,4	2,7	11,2	2,7	9,2
trimethoprim	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
sulfamethazine	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0

Tabel 7. Samenvatting van de gemeten concentraties in 96 meststalen (4 stalen waren negatief voor alle antibiotica en zijn niet opgenomen in de berekeningen).

Men ziet dat de gemiddelde concentraties voor neomycine, oxytetracycline, doxycycline, sulfadiazine, tylosine en hoger liggen dan de andere antibiotica. Zoals hoger vermeld zijn doxycycline en sulfadiazine ook de twee meest gedetecteerde antibiotica in de meststalen.

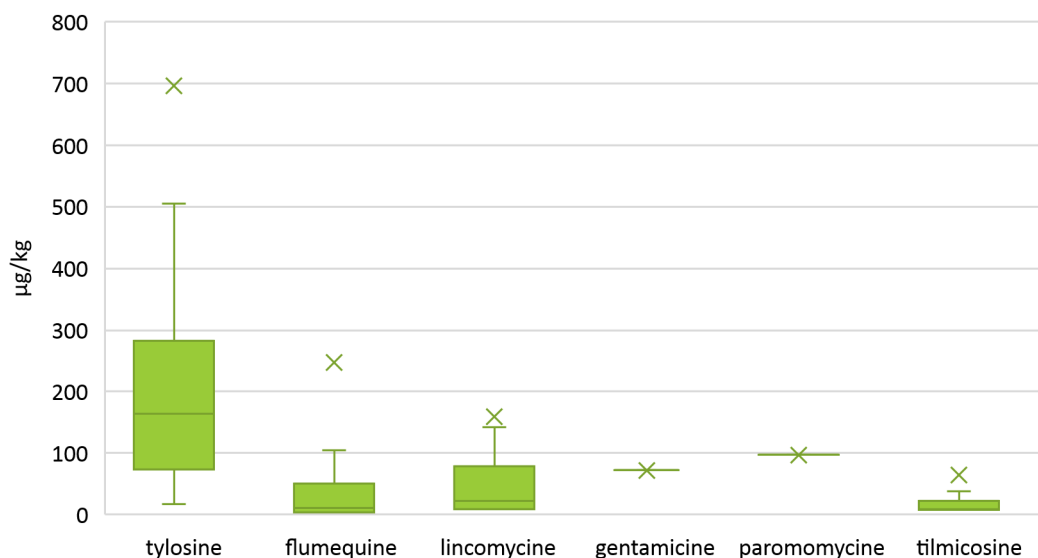
De hoge, middelhoge en lage concentraties worden hieronder verder apart gevisualiseerd en besproken.

Doxycycline, oxytetracycline, sulfadiazine en neomycine waren antibiotica met gemiddelde concentraties hoger dan 1000 µg/kg mest (Figuur 7). Sulfadiazine werd 73 keer gedetecteerd in de meststalen. Bij 64 van deze 73 waarnemingen was de gemeten concentratie onder 100 µg/kg, bij 6 waarnemingen was de gemeten concentratie tussen 100 en 1000 µg/kg en bij 3 waarnemingen was de gemeten concentratie hoger dan 1000 µg/kg, waarvan 1 meer dan 80000 µg/kg. Dit verklaart het hoge gemiddelde en de lage mediaan. Twee van deze hoge concentraties boven de 1000 µg/kg werden gemeten in stalen afkomstig van mestkalveren. Voor neomycine waren er slechts 3 waarnemingen, enkel in de kalversector.

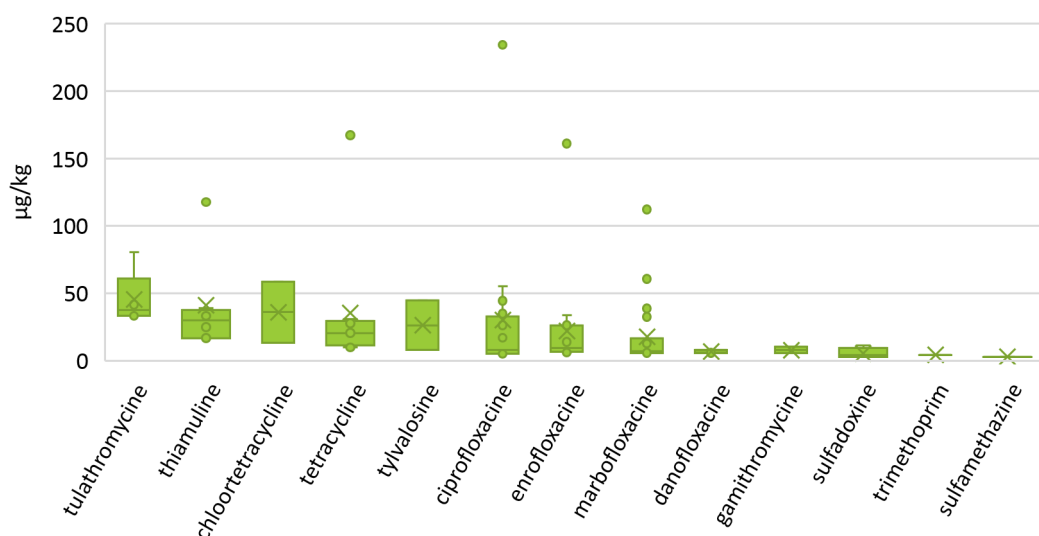


Figuur 7. Box-whiskers plots van de antibiotica met de hoogste concentraties, nl. gemiddelden (voorgesteld door x) > 1000 µg/kg drijfmest. Uitbijters worden niet getoond.

De antibiotica tylosine, flumequine en lincomycine werden in middelhoge concentraties teruggevonden met gemiddelde concentraties boven 100 µg/kg mest (Figuur 8). Paromomycine en gentamicine werden elk in slechts één staal teruggevonden met telkens een concentratie onder de LOQ, nl. 97 µg/kg voor paromomycine en 72 µg/kg voor gentamicine.



Figuur 8. Box-whiskers plots van de antibiotica met concentraties waarvan de gemiddelden (voorgesteld door x) > 50 µg/kg maar < 1000 µg/kg drijfmest. Uitbijters worden niet getoond.



Figuur 9. Box-whiskers plots van de antibiotica met concentraties waarvan de gemiddelden (voorgesteld door x) < 50 $\mu\text{g/kg}$. Uitbijters worden niet getoond.

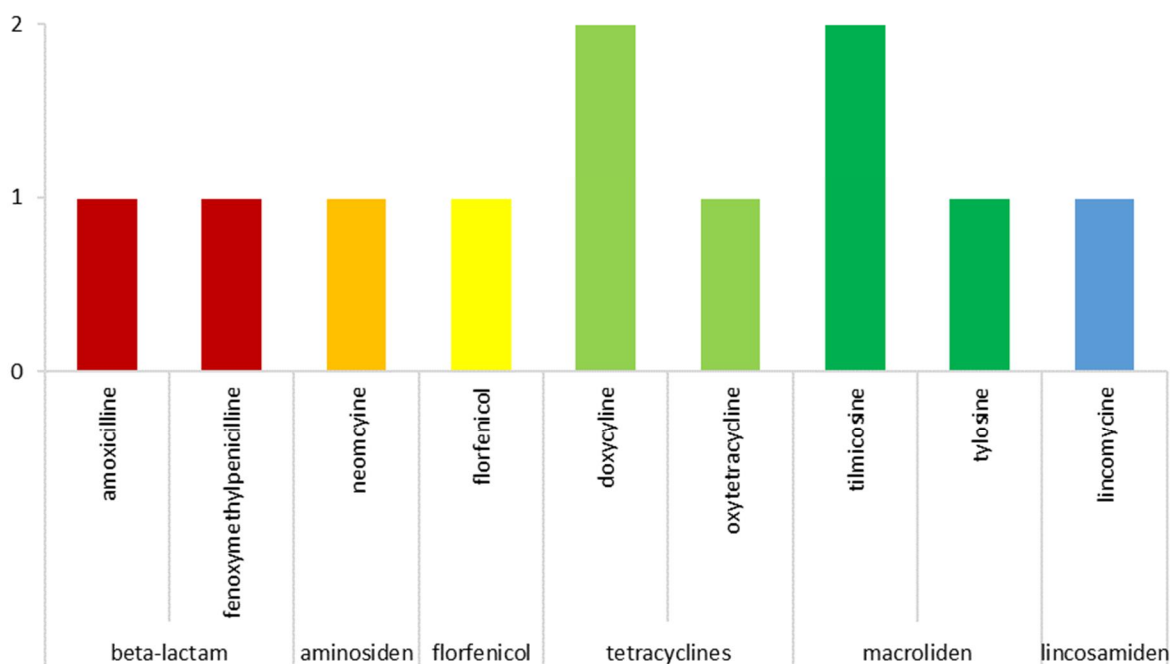
De antibiotica tulathromycine, thiamuline, chloortetracycline, tetracycline, tylvalosine, ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, danofloxacin, gamithromycine, sulfadoxine, trimethoprim en sulfamethazine werden allen teruggevonden in gemiddelde concentraties onder 50 $\mu\text{g/kg}$ mest met de 5 laatste antibiotica onder 10 $\mu\text{g/kg}$ (Figuur 9). Chloortetracycline, tylvalosine, gamithromycine werden elk slechts twee keer gedetecteerd, trimethoprim werd slechts één keer gedetecteerd.

4.2.4 Correlatie van LC-MS/MS resultaten met het antibioticagebruik

Er werd van 2 vleeskalverbedrijven en 33 varkensbedrijven het antibioticagebruik verkregen. Tijdens de gesprekken met de landbouwers bleek dat het tijdstip van de lediging van de kelder niet altijd gekend was. Zo was eind augustus (einde uitrijdseizoen) van het vorige jaar de mestkelder veelal leeg, maar was het niet altijd duidelijk wat gebeurd was tussen eind augustus en de staalname van de Mestbank. Soms was de stal niet meer leeggehaald in deze tussentijd, soms volledig aan het begin van het uitrijdseizoen (half februari) en soms deels. Vaak waren de exacte data ook niet gekend, aangezien bijvoorbeeld andere landbouwers via de burenregeling mest konden halen om uit te rijden. Bij sommige landbouwers werd de mestkelder slechts zelden gelegeerd, terwijl bij andere landbouwers er tweewekelijks werd uitgereden. Door de slechte weersomstandigheden in februari 2017, werd er bijna geen mest uitgereden in februari. Dit houdt in dat sommige landbouwers capaciteitsproblemen hadden en dit oplosten door de mest te laten verwerken (geen x-y coördinaten beschikbaar in dat geval) of door mest tussen verschillende mestkelders te verpompen. Het is dus mogelijk dat zeugen- en biggenmest verpompt werd naar de vleesvarkens of *vice versa*.

Omwille van deze redenen is het vrij moeilijk om een correlatie te vinden tussen antibioticagebruik en antibioticaresiduen. Het was immers niet duidelijk hoe lang terug in de tijd gegaan moest worden betreffende het antibioticagebruik. Bijkomend kon dus mest van andere varkens (met ander antibioticagebruik) aanwezig zijn in de mest waarvan een staal is genomen. Belangrijk is evenwel te benadrukken dat alle mest waarvan stalen zijn genomen uitgereden zijn op Vlaamse landbouwbodems of voldeden om uitgereden te worden (vb. in geval dat de mest naar de mestverwerking werd getransporteerd o.w.v. onvoldoende eigen mestopslagcapaciteit).

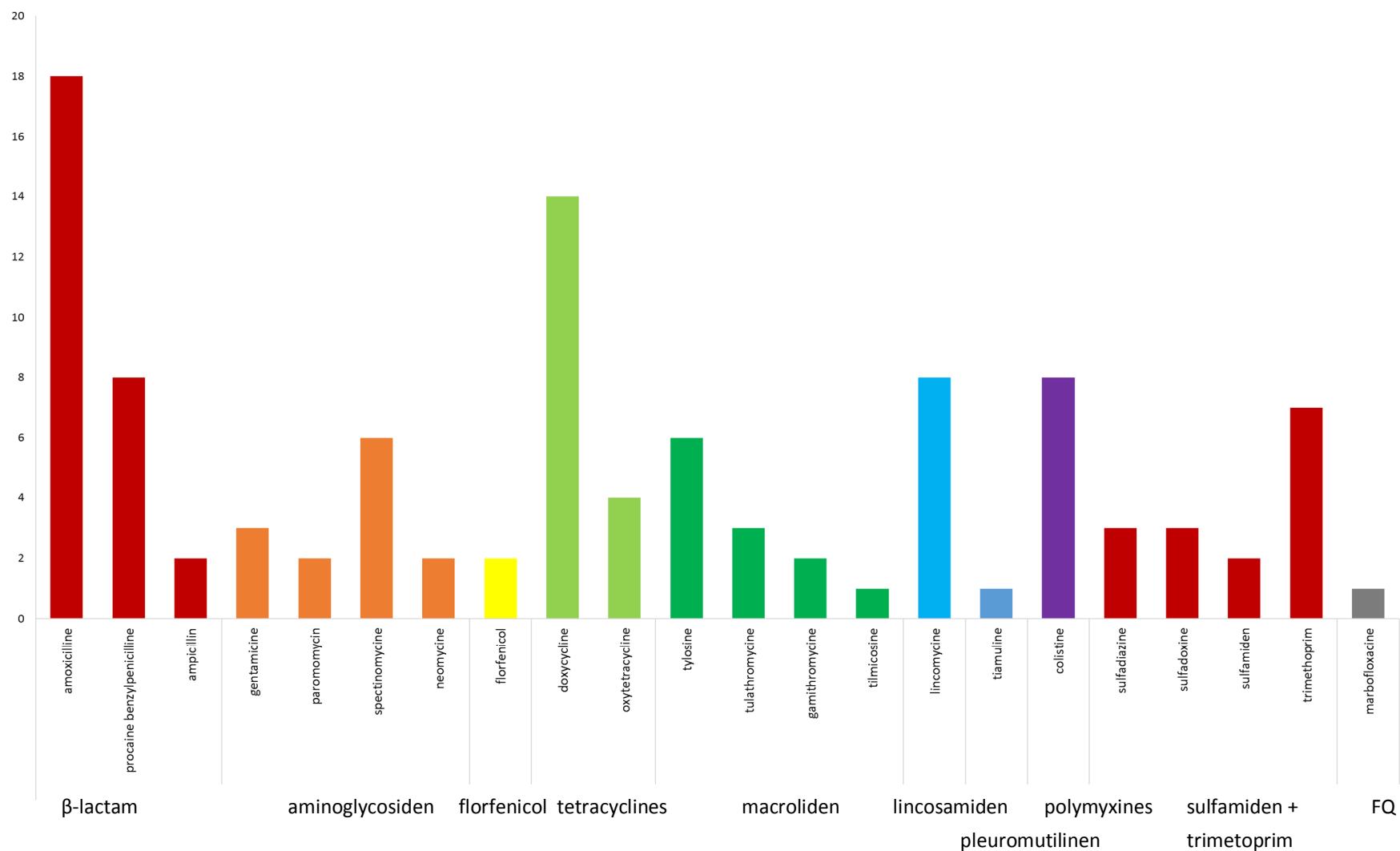
In figuur 10 wordt het antibioticagebruik van de 2 vleeskalverbedrijven getoond.



Figuur 10: antibioticagebruik op 2 vleeskalverbedrijven

Aangezien het hier slechts om twee bedrijven gaat, kunnen er geen besluiten voor het antibioticagebruik voor de vleeskalversector getrokken worden. Voor het bedrijf waar meststaal 86 werd genomen, werden de toegediende antibiotica doxycycline, oxytetracycline en tilmicosine teruggevonden. Voor het andere bedrijf (meststaal 97) werd lincomycine, doxycycline en tilmicosine gebruikt die teruggevonden werden in het meststaal, maar werd eveneens het gebruik van florfenicol, neomycine, tylosine, amoxicilline en fenoxymethylpenicilline gemeld die niet teruggevonden werd. Voor amoxicilline en fenoxymethylpenicilline kon dit verwacht worden, aangezien deze antibiotica snel worden afgebroken. Voor beide stalen werden echter nog residuen gedetecteerd waarvan geen gebruik geregistreerd is. Dit kan bijvoorbeeld te maken hebben met reeds oud gebruik of overgepompte mest.

In figuur 11 wordt het antibioticagebruik van de 35 varkensbedrijven gevisualiseerd. Er waren 27 stalen afkomstig uit mestkelders van vleesvarkens en 6 stalen uit mestkelders van zeugen en biggen. Zoals hoger uitgelegd gaven sommige varkenshouders aan mest tussen mestkelders te verpompen in functie van de opslagcapaciteit. Dit verklaart de geringe correlatie tussen antibioticagebruik en de teruggevonden residuen. Opvallend is dat er 6 bedrijven rapporteerden geen groepsbehandelingen in de desbetreffende stal gebruikt te hebben in de periode tussen voorlaatste en laatste lediging of –in geval deze data niet gekend werden– in de laatste 6 maanden, maar dat er toch elke keer antibioticaresiduen teruggevonden werden. Voor vb. doxycycline werd voor alle 6 bedrijven concentraties tussen 100 en 2000 ppb teruggevonden. Het is dus mogelijk dat er mest verpompt werd, maar tetracyclines zijn door hun chemische structuur zeer stabiel en het is dus mogelijk dat deze lang in de mestkelder kunnen opgespoord worden.



Figuur 11: antibioticagebruik op 33 varkensbedrijven

5. REFERENTIES

- Berendsen B.J., Wegh R.S., Memelink J., Zuidema T., Stolker L.A. (2015). The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 132: 258-68.
- Chee-Sanford J.C., Mackie R.I., Koike S., Krapac I.G., Lin Y.F., Yannarell A.C., Maxwell S., Aminov R.I. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual.* 38(3):1086-1108.
- Dolliver H., Gupta S., Noll S. (2008). Antibiotic degradation during manure composting. *J Environ Qual.* 37(3): 1245-53.
- Filippitzi M.E., Callens B., Pardon B., Persoons D., Dewulf J. (2014). Antimicrobial use in pigs, broilers and veal calves in Belgium, *VDT* 83: 215-224.
- Hamscher G., Pawelzick H.T., Höper H., Nau H. (2005). Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ Toxicol Chem.* 24(4): 861-868.
- Jechalke S., Heuer H., Siemens J., Amelung W., Smalla K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.* 22(9): 536-545.
- Mestrapport 2016, Vlaamse Landmaatschappij, (2016).
- Van den Meersche T., Van Pamel E., Van Poucke C., Herman L., Heyndrickx M., Rasschaert G., Daeseleire E. (2016). Development, validation and application of an ultra-high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. *J Chromatogr A.* 1429: 248-57.
- van der Horst M.A., Schuurmans J.M., Smid M.C., Koenders B.B., ter Kuile B.H. (2011). De novo acquisition of resistance to three antibiotics by *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* 17(2): 141-147.

