

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLOUX

*Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infra-rouge
dans la recherche d'antibiotiques dans le lait*

Jean-Michel ROMNEE

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en
sciences agronomiques et ingénierie biologique

PROMOTEUR : PR. G. LOGNAY

CO-PROMOTEUR : DR. P. DARDENNE

2009

ROMNEE Jean-Michel (2009). Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infra-rouge dans la recherche d'antibiotiques dans le lait . *Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 336 p., 60 tabl., 129 fig.*

Résumé : La recherche développée vise à étudier les différents tests microbiens disponibles pour la détection des antibiotiques dans le lait, ainsi que leur couplage à la spectrométrie infra-rouge (MIR et SPIR). Dans un premier temps, l'applicabilité de certains tests de détection des antibiotiques est envisagée directement à la ferme. Cette étude met en évidence certaines interférences (désinfectants et alimentation), pouvant conduire à des résultats faux positifs. De plus, les différences de sensibilité observées entre tests posent la question de l'homogénéité du contrôle lors des tests officiels réalisés sur les livraisons de lait. Sur base des conclusions tirées de cette première partie de l'étude, la spectrométrie infra-rouge est envisagée comme moyen de mise en évidence de l'inhibition bactérienne résultant de la présence de résidus d'antibiotiques. Cette seconde partie a nécessité le développement d'outils analytiques permettant le comptage rapide des bactéries utilisées d'une part et de réaliser le suivi de la croissance bactérienne par chromatographie liquide d'autre part. Ce suivi physico-chimique est basé sur un indice de métabolisme intégrant différents acides organiques, dont le principal est l'acide lactique. Ces outils analytiques sont appliqués à des échantillons de laits dopés ou non en antibiotiques, analysés par spectrométrie infra-rouge. La confrontation des résultats analytiques aux spectres obtenus dans le moyen infra-rouge ou dans le proche infra-rouge (caméra SPIR) montre le potentiel de ce mode de détection de l'inhibition bactérienne, corrélée à la production d'acides organiques.

ROMNEE Jean-Michel (2009). Potentialities of the microbial tests and infra-red spectrometry in the search for antibiotics in milk. *Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 336 p., 60 tabl., 129 fig.*

Summary : Developed research aims at studying the various microbial tests available for the detection of antibiotics in milk, like their coupling with infra-red spectrometry (MIR and SPIR). Initially, the applicability of certain tests of detection of antibiotics is considered directly with the farm. This study highlights certain interferences (disinfecting and feed), being able to lead to false-positives results. Moreover, the differences in sensitivity observed between tests raise the question of the homogeneity of control during the official tests carried out about the milk deliveries. On the basis of conclusion drawn from this first part of the study, infra-red spectrometry is considered like means of detection of bacterial inhibition resulting from the presence of antibiotic residues. This second part required the development of analytical tools allowing the fast counting of the bacteria used on the one hand and to carry out the follow-up of the bacterial growth by liquid chromatography on the other hand. This physico-chemical follow-up is based on an index of metabolism integrating various organic acids, whose main thing is the lactic acid. These analytical tools are applied to spiked milk samples and to unspiked milk samples, analyzed by infra-red spectrometry. The confrontation of the analytical results to the spectra obtained in MIR or PIR spectrometry (camera) shows the potential of this mode of detection of the bacterial inhibition, correlated with the production of organic acids.

Copyright. Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886 sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous une autre forme est donc faite en violation avec la loi.

Au terme de la rédaction de ce travail, il m'est difficile d'établir la liste des personnes à remercier ... Remercier individuellement, c'est prendre un risque, le risque d'oublier, oublier les petites mains, oublier ceux qui n'ont fait que passer quelques heures, quelques jours sur ce travail, en lisant, en discutant ... Et ce risque, je ne veux pas le prendre ...

Que tous ceux qui ont été impliqués de près ou de loin dans la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude : sans votre contribution, il m'aurait été impossible de mener à bien ce projet.

Je ne peux passer sous silence la patience dont ont dû faire preuve, Fabienne, mon épouse, et Mathias et Clémence, nos enfants, supportant vaillamment les aléas de la vie de laboratoire.

Merci à tous de me permettre de tourner cette page et de me lancer dans de nouveaux défis : cela fait pas mal de temps que j'ajoute, que je modifie, que je complète, en oubliant parfois que le mieux est l'ennemi du bien et qu'il faut avoir l'humilité de s'arrêter à temps...

Jean-Michel

RÉSUMÉ

Au 1^{er} octobre 1994, la Belgique a choisi de modifier la méthode de détection des antibiotiques dans le lait, alors en vigueur à l'époque. La nouvelle méthode mettait en présence de l'échantillon de lait un milieu de culture ensemencé avec des spores de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. La présence de résidus antibiotiques était révélée par l'inhibition de la souche et donc, par le maintien de l'indicateur de pH (pourpre de bromocrésol) présent dans le milieu. L'épreuve de confirmation était, quant à elle, basée sur le diamètre d'inhibition obtenu sur une boîte de pétri ensemencée avec la même souche pour un échantillon positif à la première étape de screening.

Le choix de cette nouvelle méthode visait à atteindre les limites maximales de résidus définies dans la législation européenne pour un certain nombre de molécules antibiotiques (règlement 2377/90).

La première étape de cette étude cherche à définir les conditions d'utilisation à la ferme de différents kits de détection de résidus inhibiteurs. Ces kits, basés sur des principes différents (microbilogique ou enzymatique) constituent un outil particulièrement efficace pour le producteur qui cherche à limiter les risques de contamination du lait de son tank. Le choix du kits à utiliser repose avant tout sur la connaissance des molécules mises en œuvre dans le traitement. Les collaborations mises en place avec les vétérinaires de terrain ont montré le manque d'information relatif à la maîtrise de l'élimination des résidus dans le lait : certains traitements, habituellement considérés comme non contaminant (traitement intra-utérin, notamment) ont montré la présence de résidus à des concentrations particulièrement élevées. De plus, les résultats obtenus par les différents tests dans des conditions identiques après l'application de traitements vétérinaires illustrent la difficulté de choisir le test optimal : les souches bactériennes sur lesquelles repose la détection présentent des sensibilités différentes aux divers antibiotiques rencontrés. L'un des tests mis en œuvre est basé sur une réaction enzymatique destinée à révéler la présence de résidus à noyau β -lactame (groupe de la pénicilline), son emploi est donc totalement déconseillé lorsque le traitement n'inclut pas de molécule de ce groupe.

Pour permettre une meilleure évaluation de ces kits et de la méthode officielle mise en œuvre, des essais ont été menés pour tester le mode de conservation des standards de référence utilisés pour valider les résultats : nos essais montrent que la congélation et la lyophilisation sont deux formes acceptables de conservation des laits dopés à la pénicilline, à la cloxacilline, à la sulfadiazine et à l'oxytétracycline.

La mise en œuvre de tests microbiologiques laisse ouverte la possibilité d'obtenir des résultats positifs consécutifs à la présence de résidus inhibiteurs autres que les antibiotiques. Ces résidus peuvent provenir d'agents de nettoyage (désinfectants) ou avoir une origine indéterminée. Les premiers essais ont ainsi montré que la modification de l'alimentation et le passage à une alimentation constituée d'ensilage et de compléments minéraux pouvait induire des réponses faussement positives dans un troupeau (jusqu'à 40 % des animaux positifs en individuel). Les facteurs responsables de ces résultats n'ont cependant pas pu être identifiés.

La difficulté d'obtenir une réponse homogène sur l'ensemble du territoire lors des contrôles officiels et les différences de sensibilité mises en évidence entre le test préparé au laboratoire et le Delvotest SP, a conduit les instances de contrôles à choisir le Delvotest MCS comme seul test de référence en Belgique. L'apparition d'autres tests, basés sur le même principe et sur la même bactérie, impose des essais pour évaluer ces nouveaux kits. Le Copan Milk Test a ainsi été étudié pour évaluer son utilisation potentielle dans le schéma de contrôle mis en place en Belgique. Dans le cadre de cette étude, un effet lot de production a été décelé entre les trois lots étudiés. De plus, l'étape de pasteurisation destinée à la destruction des enzymes naturellement présentes dans le lait a induit une modification du comportement du test : les laits pasteurisés ne donnent pas une réponse semblable aux mêmes laits crus. Cette différence est à intégrer dans le schéma de contrôle, les laits étant testés crus dans un premier temps, le résultat positif étant confirmé après pasteurisation. Les résultats d'évaluation obtenus pour le Copan Milk Test ont conduit à modifier la méthode officielle de recherche des résidus inhibiteurs et à intégrer ce test comme screening.

Une étape a été franchie dans le protocole de la méthode officielle lorsque celle-ci a été complétée par l'introduction des tests rapides comme épreuve de confirmation. Les nouveaux tests dédiés à la recherche des antibiotiques à noyau β -lactame font donc l'objet d'une étude avant une éventuelle demande d'intégration dans le protocole officiel. Dans ce contexte, le test Charm MRL β -lactame/tétracycline a été évalué. Les résultats obtenus lors de cette évaluation montrent que ce test peut être utilisé de manière efficace lors du contrôle du lait : aucune interférence biologique (cellules et germes) ou chimique (antiseptiques, antibiotiques d'autres groupes) n'a été mise en évidence, les limites de détection étant acceptables pour les molécules étudiées.

Les différents tests microbiologiques ont cependant montré qu'il était nécessaire de disposer d'autres outils afin de confirmer les résultats obtenus. C'est pourquoi une méthode chromatographique a été développée pour confirmer la présence de résidus de sulfamides. Cette

méthode est basée sur la fluorescence d'un complexe formé par le sulfamide et la fluorescamine. Cette méthode a pu être appliquée après traitement afin de chiffrer la contamination du lait. Elle a aussi été appliquée afin d'évaluer la conservation analytique de la sulfadiazine, utilisée comme standard.

Les interférences mises en évidence lors des tests microbiologiques ont conduit à la recherche d'un indicateur du métabolisme autre que le pH. C'est pourquoi la spectrométrie infra-rouge a été envisagée : les modifications du milieu doivent conduire, lors de la croissance de la souche, à une modification du spectre mesuré. Certaines bandes spectrales, observées lors de la différence entre spectre initial et spectre mesuré après incubation, sont caractéristiques du métabolisme : apparition de l'acide lactique, disparition du sucre présent dans le milieu. Le suivi du métabolisme dans le moyen infra-rouge a nécessité le développement de deux outils : le premier a permis, sur base d'équipement existant, destiné au comptage des bactéries dans le lait cru, de dénombrer rapidement les bactéries au cours de leur croissance et de visualiser directement l'activité des antibiotiques sur le Bacillus de référence. Le second correspond à la définition d'un indice de métabolisme, calculé sur les chromatogrammes obtenus en HPLC lors du dosage des acides organiques produits.

Le souhait de mesurer de grandes séries d'échantillons a conduit à chercher une configuration analytique différente, raison pour laquelle la caméra proche infra-rouge a été envisagée. L'usage de cette caméra a permis de mettre en évidence l'inhibition de la souche bactérienne. Ainsi, le traitement des images obtenues après incubation indique clairement une distinction entre les échantillons de lait non dopés et les échantillons de lait contenant de la pénicilline. Cette différence n'est pas perceptible sur les échantillons avant incubation. Le changement de configuration de la caméra (passage de la position basse à la position haute pour prendre la photo de l'ensemble de la microplaqué) montre que cette configuration n'est pas adaptée, du moins telle qu'elle était définie. En effet, la distinction entre les deux types d'échantillons ne reposait plus sur l'inhibition mais bien sur la position du puits dans la microplaqué.

SUMMARY

At October 1st, 1994, Belgium chose to modify the method of detection of antibiotics in milk, in use at the time. The new method put in the presence of the milk sample a culture medium sown with spores of *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. The presence of antibiotic residues was revealed by the inhibition of the strain and thus, by the maintenance of the indicator of pH (bromocresol purple) present in the medium. The confirmation test was based on the diameter of inhibition obtained on a Petri dish sown with the same strain for a positive sample at the first stage of screening.

The choice of this new method aimed at reaching the maximum residues limits defined in the EU regulation for a certain number of antibiotic molecules (council regulation 2377/90).

The first stage of this study seeks to define the conditions of use in the farm of various detection kits for antibiotics residues. These kits, based on different principles (microbiologic or enzymatic) constitute a particularly effective tool for the producer who seeks to limit the risks of contamination of his milk. The choice of the kits to be used lies above all on the knowledge of the molecules implemented in the treatment. The collaborations with the veterinary showed the lack of information relating to the control of the elimination of the residues in milk : treatments, usually considered as noncontaminant (intra-uterine treatment, in particular) showed the presence of residues at particularly high concentrations. Moreover, the results obtained by the various tests under identical conditions after the application of veterinary treatments illustrate the difficulty in choosing the optimal test: the bacterial strains have different sensitivities to various antibiotics. One of the tests implemented is based on an enzymatic reaction intended to reveal β -lactam antibiotics (group of penicillin). It can not be advised when the treatment does not include a molecule of this group.

To allow a better evaluation of these kits and official method was implemented. The tests were carried out to test the mode of conservation of the standards of reference used to validate the results : the results obtained for these tests show that freezing and freeze-drying are two acceptable forms of conservation of the milks doped with penicillin, the cloxacilline, sulphadiazine and oxytetracycline.

The implementation of microbiological tests leaves open the possibility of obtaining consecutive positive tests with the presence of inhibiting residues others that the antibiotics. These residues can come from agents of cleaning (disinfecting) or to have an unspecified origin. The first tests thus showed that the modification of the feed and the passage to a feed made up of silage and mineral

complements could induce false positive responses in a herd (up to 40% of the positive animals into individual milk samples). The factors responsible for these results however could not be identified.

The difficulty in obtaining a homogeneous answer on the whole of the territory at the time as of official controls and the differences in sensitivity highlighted between the test prepared to the laboratory and Delvotest SP, led the authorities of controls to choose only Delvotest MCS as a reference test in Belgium. The appearance of other tests, based on the same principle and the same bacterium, imposes further trials tests to evaluate these new tests. Copan Milk Test was thus studied to evaluate its potential use in the diagram of control set up in Belgium. Within the framework of this study, a batch effect (date of production) was traced between the three different batches under study. Moreover, the stage of pasteurization intended for the destruction of the enzymes naturally present in milk induced a modification of the behavior of the test: raw milks do not give an answer similar to the one obtained on pasteurised corresponding milks. This difference is to be integrated in the diagram of control, milks being tested initially on raw milk, the positive test being confirmed after pasteurization. The results of evaluation obtained for Copan Milk Test resulted in modifying the official method of research of the inhibiting residues and in integrating this method as a screening test.

Another step was reached in the protocol of the official method when this one was supplemented by the introduction of the fast tests as confirmation. New tests dedicated in the search of β -lactam antibiotics are thus the subject of a study before a possible request for integration in the official protocol. In this context, the Charm MRL β -lactam/tetracyclin test was evaluated. The results obtained during this evaluation show that this test can be used efficiently during the control of milk : no biological interference (cells and germs) or chemical (disinfectants, antibiotics of auters groups) was highlighted, limits of detection being acceptable for the molecules under study.

The various microbiological tests however showed that it was necessary to have other tools in order to confirm the results obtained. This is why a chromatographic method was developed to confirm the presence of sulphamide residues. This method is based on the fluorescence property of a complex formed by sulphamide and the fluorescamine. This method could be applied after treatment in order to quantify the contamination of milk. It was also applied in order to evaluate the analytical conservation of sulphadiazine, used as standard.

The interferences highlighted during the micribiological tests led in the search of an indicator of the metabolism other than the pH. This is why infra-red spectrometry was considered: the

modifications of the medium must lead, at the time of the growth of the strain, with a modification of the measured spectrum. Spectral bands, observed at the time of the difference between initial spectrum and spectrum measured after incubation, are characteristic of the metabolism: appearance of the lactic acid, disappearance of sugar present initially in the medium. The follow-up of the metabolism in the infra-red means required the development of two tools. The first one allowed, on the basis of existing equipment, intended for the counting of the bacteria in believed milk, to quickly count the bacteria during their growth and to directly visualize the activity of antibiotics on the Bacillus of reference. The second one corresponds to the definition of an index of metabolism, calculated on the chromatograms obtained by HPLC corresponding to the produced organic acids.

The wish to measure great series of samples resulted in seeking a different analytical configuration, reason for which a near infra-red camera was considered. The use of this camera made it possible to highlight the inhibition of the bacterial strain. Thus, the image processing obtained after incubation clearly indicates a distinction between blank milk samples and milk samples containing penicillin. This difference is not clearly perceptible on the samples before incubation. The change of configuration of the camera (moving from the low position to the high position to take the picture of the whole of microplate) shows that this configuration is not adapted, at least such as it was tested. Indeed, the distinction between the two types of samples did not really lie on inhibition but well on their position on the microplate.

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	I
SUMMARY	IV
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	XVII
LISTE DES TABLEAUX	XIX
LISTE DES FIGURES	XXII
LISTE DES FIGURES	XXII
LISTE DES ÉQUATIONS	XXX
LISTE DES ÉQUATIONS	XXX
LISTE DES SCHEMAS	XXXI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	32
CHAPITRE 2 : GLOSSAIRE DE TERMES ET DEFINITIONS	34
CHAPITRE 3 : LES INHIBITEURS	39
3.1. LES INHIBITEURS NATURELS	39
3.1.1. <i>Le lysozyme</i>	39
3.1.2. <i>La lactoferrine</i>	41
3.1.3. <i>Le système lactoperoxydase</i>	41
3.1.4. <i>Les immunoglobulines</i>	41
3.1.5. <i>Autres inhibiteurs naturels</i>	42
3.2. LES ANTIBIOTIQUES	42
3.2.1. <i>Nature et classification</i>	42
3.2.2. <i>Utilisation en élevage</i>	45
3.2.2.1. <i>Usage thérapeutique</i>	46
3.2.2.2. <i>Usage zootechnique</i>	47
3.2.3. <i>Utilisation en agriculture</i>	48
3.2.4. <i>Pharmacocinétique des antibiotiques</i>	50
3.2.4.1. <i>Administration orale ou parentérale</i>	52
3.2.4.2. <i>Administration intra-utérine</i>	52
3.2.4.3. <i>Administration intra-mammaire</i>	53
3.2.5. <i>Pharmacodynamique des résidus d'antibiotiques dans le lait</i>	53
3.2.5.1. <i>Santé du consommateur</i>	53
3.2.5.2. <i>Risques technologiques</i>	54
3.2.5.3. <i>Risques environnementaux</i>	56
3.2.5.4. <i>Conséquences financières</i>	57
3.2.6. <i>Aspects économiques</i>	57
3.2.7. <i>Détection</i>	59

3.2.7.1. <i>Méthodes microbiologiques</i>	60
3.2.7.2. <i>Détection rapide</i>	62
3.2.7.3. <i>Méthodes analytiques</i>	63
3.2.7.4. <i>Evolutions actuelles</i>	64
CHAPITRE 4 : LES ASPECTS LEGISLATIFS ET LE CONTROLE OFFICIEL EN BELGIQUE	67
4.1. EN EUROPE.....	67
4.2. EN BELGIQUE	75
4.2.1. <i>A la ferme</i>	75
4.2.2. <i>Dans la filière</i>	78
4.2.3. <i>Quelques chiffres en Région Wallonne</i>	80
4.4. CONCLUSIONS	83
CHAPITRE 5 : LA SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE	84
5.1. FONDEMENTS THEORIQUES.....	84
5.1.1. <i>Rappels historiques</i>	84
5.1.2. <i>Lois fondamentales</i>	86
5.1.3. <i>Vibrations</i>	87
5.2. MESURES ET ECHANTILLONS	88
5.3. LA SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE DANS L'AGRO-ALIMENTAIRE.....	88
5.3.1. <i>Le moyen infra-rouge</i>	88
5.3.2. <i>Le proche infra-rouge</i>	90
CHAPITRE 6 : EVALUATION DE KITS DE DETECTION D'ANTIBIOTIQUES DISPONIBLES POUR LES PRODUCTEURS – UNE UTILISATION A LA FERME	91
6.1. INTRODUCTION	91
6.2. OBJECTIFS	91
6.3. MATERIEL ET METHODE	92
6.3.1. <i>Méthode de diffusion en tube</i>	92
6.3.1.1. <i>Milieux, solutions et micro-organisme test</i>	92
6.3.1.2. <i>Préparation des microplaques</i>	93
6.3.1.3. <i>Mode opératoire</i>	94
6.3.1.4. <i>Interprétation des résultats</i>	94
6.3.2. <i>Mise en évidence de la présence de sulfamides</i>	94
6.3.2.1. <i>Milieux, solutions et micro-organisme test</i>	94
6.3.2.2. <i>Préparation des microplaques</i>	95
6.3.2.3. <i>Mode opératoire</i>	95
6.3.2.4. <i>Interprétation des résultats</i>	95
6.3.3. <i>Mise en évidence des pénicillines</i>	96
6.3.3.1. <i>Milieux, solutions et micro-organisme test</i>	96
6.3.3.2. <i>Préparation des boîtes de pétri</i>	97
6.3.3.3. <i>Préparation des échantillons</i>	97

6.3.3.4. Mode opératoire	97
6.3.3.5. Interprétation des résultats	97
6.3.4. <i>Delvotest® SP (Gist-Brocades)</i>	98
6.3.4.1. Principe du test	98
6.3.4.2. Interprétation des résultats	99
6.3.5 <i>Valio T101® (Sanofi Bio-Industries)</i>	100
6.3.5.1. Principe du test	100
6.3.5.2. Interprétation des résultats	100
6.3.6. <i>Penzym®S (UCB BioProducts)</i>	101
6.3.6.1. Principe du test	101
6.3.6.2. Interprétation des résultats	101
6.3.7. Collecte des échantillons	102
6.4. RESULTATS	103
6.5. DISCUSSION	106
6.6. CONCLUSIONS	114
CHAPITRE 7 : DELVOTEST® SP : RESULTATS FAUX POSITIFS	116
7.1. INTRODUCTION	116
7.2. OBJECTIFS	116
7.3. MATERIEL ET METHODE	116
7.3.1. Essai préliminaire	116
7.3.2. Essai	117
7.4. RESULTATS	118
7.5. DISCUSSION	119
7.6. CONCLUSIONS	121
CHAPITRE 8 : AUTRE INTERFERENCE POTENTIELLE : LES DESINFECTANTS UTILISES LORS DE LA TRAITE	123
8.1. INTRODUCTION	123
8.2. OBJECTIFS	123
8.3. MATERIEL ET METHODES	123
8.3.1. Chlorhexidine	123
8.3.2. Mamello-1	124
8.3.3. Animaux	125
8.3.4. Traitements appliqués	125
8.3.5. Schéma expérimental	125
8.3.6. Analyses effectuées	126
8.3.7. Limite de sensibilité du <i>Delvotest® MCS</i> au digluconate de chlorexidine	126
8.3.7.1. Echantillons analysés	127
8.4. RESULTATS ET DISCUSSION	127
8.4.1. Limite de sensibilité du <i>Delvotest® MCS</i> au digluconate de chlorhexidine	127

8.4.1.1. <i>Essai avec le produit « Mamelو-1 »</i>	127
8.4.1.2. <i>Essai avec la chlorhexidine pure</i>	128
8.4.2. <i>Résultats de la détection de substances inhibitrices dans le lait (Delvotest® MCS)</i>	128
8.5 CONCLUSIONS	128
CHAPITRE 9 : EVALUATION D'UN KIT DE DETECTION SIMILAIRE AU DELVOTEST® MCS, LE COPAN MILK TEST	130
9.1. INTRODUCTION	130
9.2. OBJECTIFS	130
9.3. DESCRIPTION ET PRINCIPE DU TEST	130
9.4. CHOIX DES ECHANTILLONS UTILISES	131
9.5. CONFIGURATION D'ANALYSE	131
9.6. EVALUATIONS EFFECTUEES	132
9.6.1. <i>Homogénéité au sein d'une même plaque</i>	132
9.6.2. <i>Homogénéité au sein d'un même lot</i>	132
9.6.3. <i>Homogénéité entre lots</i>	132
9.6.4. <i>Limite de sensibilité</i>	132
9.6.5. <i>Effet de la pasteurisation</i>	132
9.6.6. <i>Effet de la durée d'incubation</i>	133
9.7. MATERIEL ET METHODE	133
9.7.1. <i>Essais 1 et 2 : homogénéité au sein d'une même plaque et entre plaques d'un même lot</i>	133
9.7.1.1. <i>Objectif</i>	133
9.7.1.2. <i>Echantillons analysés</i>	133
9.7.1.3. <i>Répartition sur la plaque</i>	133
9.7.1.4. <i>Paramètres étudiés et méthodes de traitement des résultats mises en oeuvre</i>	133
9.7.2. <i>Essai 3 : homogénéité entre lots</i>	133
9.7.2.1. <i>Objectif</i>	133
9.7.2.2. <i>Echantillons analysés</i>	134
9.7.2.3. <i>Répartition sur les plaques</i>	135
9.7.2.4. <i>Paramètres étudiés et méthodes de traitement des résultats mises en oeuvre</i>	136
9.7.3. <i>Essai 4 : comportement du test vis à vis de laits crus</i>	136
9.7.3.1. <i>Objectif</i>	136
9.7.3.2. <i>Echantillons analysés</i>	136
9.7.3.3. <i>Répartition sur les plaques</i>	136
9.7.4. <i>Essai 5 : comportement du test sur laits pasteurisés</i>	137
9.7.4.1. <i>Objectif</i>	137
9.7.4.2. <i>Echantillons analysés</i>	137
9.7.4.3. <i>Répartition sur les plaques</i>	137
9.8. RESULTATS	138
9.8.1. <i>Essai 1 : homogénéité au sein d'une même plaque</i>	138

9.8.2. <i>Essai 2 : homogénéité au sein d'un même lot</i>	139
9.8.3. <i>Essai 3 : homogénéité entre lots</i>	139
9.8.4. <i>Limite de sensibilité du Copan Milk Test</i>	142
9.8.5. <i>Essai 4 : Comportement du CMT par rapport aux laits de tank (lait crus)</i>	148
9.8.6. <i>Essai 5 : Comportement du CMT par rapport à la pasteurisation de laits de tank</i>	151
9.9. CONCLUSIONS	155
CHAPITRE 10 : DE LA STABILITE DES STANDARDS UTILISES COMME CONTROLE LORS DES TESTS MICROBIOLOGIQUES.....	159
10.1. INTRODUCTION	159
10.2. OBJECTIFS	159
10.3. MATERIEL ET METHODES.....	160
10.3.1. <i>Comptage des germes</i>	160
10.3.1.1. <i>Préparation des échantillons</i>	160
10.3.1.2. <i>Préparation des milieux</i>	160
10.3.1.3. <i>Décongélation des échantillons</i>	161
10.3.1.4. <i>Préparation des dilutions</i>	161
10.3.1.5. <i>Ensemencement et incubation</i>	161
10.3.1.6. <i>Comptage</i>	161
10.3.2. <i>Suivi du pH de laits congelés</i>	162
10.3.2.1. <i>Préparation des échantillons</i>	162
10.3.2.2. <i>Décongélation des échantillons</i>	162
10.3.2.3. <i>Prise du pH</i>	162
10.3.3. <i>Détermination de la perte en eau après lyophilisation</i>	162
10.3.3.1. <i>Congélation</i>	162
10.3.3.2. <i>Lyophilisation</i>	162
10.3.3.3. <i>Calcul de la teneur en matière sèche après lyophilisation</i>	163
10.3.4. <i>Analyse de la sulfadiazine par HPLC</i>	164
10.3.4.1. <i>Réactifs</i>	164
10.3.4.2. <i>Paramètres HPLC</i>	164
10.3.4.3. <i>Protocole</i>	165
10.3.5. <i>Préparation des dilutions d'antibiotiques</i>	165
10.3.6. <i>Conservation des dilutions d'antibiotiques</i>	166
10.3.6.1. <i>La congélation</i>	166
10.3.6.2. <i>La lyophilisation</i>	166
10.3.7. <i>Reconstitution des échantillons</i>	166
10.5. RESULTATS.....	166
10.5.1. <i>Limites de sensibilité du Delvotest® MCS</i>	166
10.5.2. <i>Détermination de la teneur en matière sèche après lyophilisation</i>	169

10.5.3. Suivi du pH et de la contamination bactérienne d'un lait conservé par congélation.....	173
10.5.4. Suivi de la stabilité de quatre antibiotiques utilisés comme standards lors des tests d'inhibition bactérienne – conservation par congélation ou par lyophilisation.....	176
10.5.5. Suivi par HPLC de la teneur en sulfadiazine lors de la conservation de standard.....	185
10.6. CONCLUSIONS	190
CHAPITRE 11 : LE CHARM MRL β-LACTAME/TETRACYCLINE, DETECTION DE DEUX GROUPES D'ANTIBIOTIQUES IMPORTANTS EN MEDECINE VETERINAIRE	191
11.1. INTRODUCTION.....	191
11.2. OBJECTIFS	191
11.3. PRINCIPE DU TEST ET DE SON LECTEUR.....	192
11.4. ESSAIS ET RESULTATS.....	193
11.4.1. Homogénéité intra-lots.....	193
11.4.2. Homogénéité Inter-lots.....	194
11.4.3. Limite de sensibilité à la pénicilline G, à l'amoxicilline, à l'ampicilline, à la chlortétracycline et à l'oxytétracycline.....	196
11.4.3.1. Échantillons.....	196
11.4.3.2. Incertitude de la limite	197
Incertitude de pesée.....	197
Incertitude de volume	197
Incertitude combinée	198
11.4.3.3. Résultats	198
11.4.4. Limite de sensibilité à la pénicilline G (standard USP).....	205
11.4.4.1. Échantillons.....	205
11.4.4.2. Protocole	206
11.4.5. Interférences microbiologiques - cellules somatiques	207
11.4.6. Interférences microbiologiques - Germes	209
11.4.7. Interférences chimiques	211
11.4.8. Stabilité de la réponse dans le temps	215
11.5. CONCLUSIONS	216
CHAPITRE 12 : MISE AU POINT D'UNE METHODE DE COMPTAGE RAPIDE DE <i>G. STEAROTHERMOPHILUS</i> VAR. <i>CALIDOLACTIS</i>	218
12.1 INTRODUCTION.....	218
12.2. OBJECTIFS	218
12.3. MATERIEL ET METHODE	218
12.3.1. Milieux à utiliser – composition et préparation	218
12.3.1.1. PCA (Plate Count Agar).....	218
12.3.1.2. Bouillon nutritif.....	218
12.3.1.3. Gélose nutritive	219
12.3.2. Méthodes de comptage sur boîte.....	219

12.3.2.1. <i>Préparation des échantillons</i>	219
12.3.2.2. <i>Comptages</i>	219
12.3.3. <i>BactoscanTM FC</i>	219
12.4. RESULTATS.....	221
12.4.1. <i>Vérification des conditions de stérilité du milieu, comptage de la teneur en spores initiale et vérification de l'incapacité des spores à se développer à 55°C</i>	221
12.4.2. <i>Vérification du non-comptage des spores de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> par le Bactoscan FC</i>	222
12.4.3. <i>Vérification de la seule croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> à 64°C</i>	223
12.4.4. <i>Table de conversion</i>	224
12.4.4.1. <i>Evaluation de l'erreur de transfert</i>	224
12.4.4.2. <i>Limite de détection</i>	225
12.4.4.3. <i>Précision</i>	225
12.4.4.4. <i>Répétabilité et reproductibilité</i>	226
12.4.4.5. <i>Comptage BactoScan FC et comparaison avec la méthode de référence</i>	228
12.4.4.6. <i>Droite de calibrage</i>	230
12.4.5. <i>Interférences</i>	232
12.4.6. <i>Mise en évidence de l'inhibition bactérienne par différentes molécules antibiotiques, lors des comptages par BactoScan FC</i>	233
12.5. CONCLUSIONS	236
CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL CHROMATOGRAPHIQUE DESTINE A L'ANALYSE DES SULFAMIDES.....	238
13.1. INTRODUCTION	238
13.2. OBJECTIFS	238
13.3. MATERIEL ET METHODE	239
13.3.1. <i>Réactifs</i>	239
13.3.2. <i>Matériel</i>	239
13.3.3. <i>Méthode</i>	239
13.3.3.1. <i>Préparation des solutions de standards</i>	239
13.3.3.2. <i>Préparation des réactifs</i>	240
13.3.3.3. <i>Préparation des échantillons</i>	240
13.3.3.4. <i>Conditions d'étude de la fluorescence</i>	241
13.4. RESULTATS.....	242
13.4.1. <i>Choix des conditions de fluorescence</i>	242
13.4.2. <i>Stabilité de la fluorescence obtenue</i>	244
13.4.3. <i>Séparation et identification des sulfamides</i>	250
13.4.4. <i>Choix du standard interne</i>	251
13.4.5. <i>Caractérisation de la méthode</i>	253
13.4.6. <i>Analyse d'échantillons</i>	255

13.4.6.1. Cinétique d'élimination de sulfamides	255
13.4.6.2. Confirmation de résultats positifs aux tests de screening	258
13.5. CONCLUSIONS	260
CHAPITRE 2 : SUIVI DU METABOLISME DE <i>GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS</i> VAR. <i>CALIDOLACTIS</i> PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	262
14.1. INTRODUCTION	262
14.2. OBJECTIFS	262
14.3. MATERIEL ET METHODE	262
14.3.1. Mise en évidence du métabolisme	262
14.3.2. Méthode Macro – préparation des échantillons	263
14.3.2.1. Réactifs	263
14.3.2.2. Protocole	263
14.3.3. Méthode Micro – préparation des échantillons	264
14.3.3.1. Réactifs	264
14.3.3.2. Protocole	264
14.3.4. Conditions chromatographiques	264
14.3.5. Identification des pics d'intérêt	265
14.3.6. Suivi du métabolisme de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> en microplaques	265
14.3.7. Mise en évidence, en microplaques, de l'activité antibactérienne de certains antibiotiques sur <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	266
14.3.8. Détermination de la limite de détection pour différents antibiotiques rencontrés sur le terrain (pénicilline, cloxacilline, sulfadiazine, oxytétracycline, tylosine, dihydrostreptomycine)	267
14.4. RESULTATS	268
14.4.1. Mise en évidence du métabolisme	268
14.4.2. Identification des pics d'intérêt	269
14.4.3. Suivi du métabolisme de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> en microplaques	269
14.4.4. Mise en évidence, en microplaques, de l'activité antibactérienne de certains antibiotiques sur <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	270
14.4.5. Détermination de la limite de détection pour différents antibiotiques rencontrés sur le terrain (pénicilline, cloxacilline, sulfadiazine, oxytétracycline, tylosine, dihydrostreptomycine)	274
14.5. CONCLUSIONS	278
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DU METABOLISME DE <i>GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS</i> VAR. <i>CALIDOLACTIS</i> PAR SPECTROMETRIE DANS LE MOYEN INFRA-ROUGE	279
15.1. INTRODUCTION	279
15.2. OBJECTIF	279
15.3. MATERIEL ET METHODE	279
15.3.1. Equipement utilisé	279

15.3.2. Milieux et réactifs.....	281
15.3.2.1. Bouillon ElPcGl (Extrait de levure – peptone de caséine – glucose)	281
15.3.2.2. Bouillon ElPcLc(Extrait de levure – peptone de caséine – lactose » - bouillon ElPcLc)	281
15.3.2.3. Solution de lactose.....	282
15.3.2.4. Solution de carbonate de calcium.....	282
15.4. RESULTATS.....	282
15.4.1. Détermination des conditions de préparation des échantillons pour analyse à l'Anadis AEGYS Mi 200 : stabilisation de la température de l'échantillon.....	282
15.4.2. Mise en évidence du métabolisme	283
15.4.2.1. Cellule de transmission	283
15.4.2.2. Cellule de réflexion thermostatée	286
15.4.3. Activité de certains antibiotiques	290
15.4.3.1. Activité de la pénicilline G et de l'amoxicilline, deux antibiotiques à noyau β -lactame	290
15.4.3.2. Action synergique de sulfamide et de triméthoprime.....	291
15.4.3.3. Interaction entre le carbonate de calcium et les tétracyclines.....	295
15.4.4. Influence du pH du lait.....	298
15.4.5. Confrontation de résultats MIR, chromatographiques et biologiques	299
15.4.5.1. Spectrométrie MIR : élimination des résultats aberrants	300
15.4.5.2. Relation pH – Delta spectre	301
15.4.5.3. Globalisation des données (comptages microbiologiques, déterminations chromatographiques, spectres MIR et pH)	302
15.5. CONCLUSIONS	305
CHAPITRE 4 : SUIVI DU METABOLISME DE <i>GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS</i> VAR. <i>CALIDOLACTIS</i> PAR SPECTROMETRIE DANS LE PROCHE INFRA-ROUGE	308
16.1. INTRODUCTION	308
16.2. OBJECTIF	308
16.3. MATERIEL ET METHODE	308
16.3.1. Equipement utilisé.....	308
16.3.2. Protocole de l'étude par caméra SPIR.....	309
16.3.2.1. Essais préliminaires	309
16.3.2.2. Etude globale.....	310
16.4. RESULTATS.....	311
16.4.1. Essai préliminaire	311
16.4.1.1. Mise en évidence de l'acide lactique	311
16.4.1.2. Mise en évidence de l'inhibition bactérienne	312
16.4.2. Etude globale	312
16.5. CONCLUSIONS	313
CHAPITRE 13 CONCLUSIONS GENERALES.....	315
CHAPITRE 14 INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	326

CHAPITRE 15 ANNEXE 1 : FICHE DE SUIVI DE TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES A LA FERME.....	336
CHAPITRE 16 ANNEXE 2 : DOCUMENTS ET PRESENTATIONS REALISES EN RAPPORT AVEC CE TRAVAIL	337
<i>Publications scientifiques</i>	337
<i>Publications techniques</i>	337
<i>Présentations.....</i>	339
<i>Rapports.....</i>	340

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADME	Absorption – Distribution – Métabolisme – Excrétion
AFSCA	Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire
AFSSA	Agence française pour la santé et la sécurité alimentaire
BPMV	Bonnes pratiques d'utilisation des médicaments vétérinaires
CMA	Concentration maximale admissible
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMT	Copan Milk Test (test de détection des antibiotiques)
CRAW	Centre wallon de Recherches agronomiques
CRAW-D6	Centre wallon de Recherches agronomiques – Département <i>Production et nutrition animales</i>
CRAW-D7	Centre wallon de Recherches agronomiques – Département <i>Qualité des productions agricoles</i>
CS	Coefficient de sécurité
CVMP	<i>Committee for Veterinary Medicinal Products</i>
DART	<i>direct analysis in real time</i> – analyse directe en temps réel
DESI	<i>desorption electrospray ionization</i>
DJA	Dose journalière admissible
DJAT	Dose journalière admissible temporaire
DSE	Dose sans effet
DSEO	Dose sans effet observable
DVK ILVO Melle	<i>Departement voor de Kwaliteit van dierlijke Producten en Transformatietechnologie – Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek – Melle</i>
ElPcGl	Extrait de levure – Peptone de caséine – Glucose (bouillon)
Gsc	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> – chromatographie liquide à haute pression
JEFCA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> – Codex Alimentarius
LMR	Limite maximale de résidus
LMRMV	Limite maximale de résidus pour les médicaments vétérinaires
MIR	moyen infra-rouge
MS	<i>mass spectrometry</i> – spectrométrie de masse
MS _x	matière sèche
<i>p</i> -ABA	<i>para-amino benzoic acid</i> – acide <i>p</i> -amino benzoïque

PCA SM	<i>Plate count agar skim milk</i>
PCBs	polychlorobiphényles
PIR	proche infra-rouge
ppb	part par billion (part par milliard) – unité usuelle – correspond à $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
ppm	part par million – unité usuelle – correspond à $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
QMA	Quantité maximale admissible
SPIR	spectrométrie dans le proche infra-rouge
UI	unité internationale (utilisée pour renseigner sur l'activité de la pénicilline et de certains antibiotiques)
UPLC	<i>ultra pressure liquid chromatography</i> – chromatographie liquide ultra performante
Tof	<i>time of flight</i> – temps de vol (spectromètre de masse à)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3-2 : Utilisation des antibiotiques en production végétale.....	49
Tableau 3-4 : Répartition des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire (usage thérapeutique) pour l'année 1997 en Europe, y compris la Suisse - FEDESA	58
Tableau 3-5 : Utilisation estimée des antimicrobiens pour l'année 1997 en Europe, y compris la Suisse – FEDESA	59
Tableau 3-6. Evolution dans la détection des antibiotiques au début de leur utilisation (Romnee J.M., 2007).....	61
Tableau 4-1. Règlement CEE 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale – Annexe I – Exemple	68
Tableau 4-2. Règlement CEE 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale – Annexe II – Exemple	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 4-3. Règlement CEE 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale – Annexe III – Exemple	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 4-4. Règlement CEE 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale – Annexe IV – Exemple.....	68
Tableau 4-5. Facteurs de correction (par rapport au muscle) utilisés pour le calcul des CMA pour les résidus de médicaments vétérinaires au Canada (Mitchell J.M. <i>et al.</i> , 1998).....	71
Tableau 4-6. Limites maximales de résidus (LMR) ou tolérance pour différents antibiotiques dans le lait, au Canada, dans l'Union Européenne et aux Etats-Unis	72
Tableau 10-2. Concentrations des différentes solutions d'antibiotiques	165
Tableau 10-3. Dilutions préparées ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – série 1	166
Tableau 10-4. Limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – pourcentage d'inhibition totale série 1 ...	167
Tableau 10-5. Dilutions préparées (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – série 2	167
Tableau 10-6. Limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – pourcentage d'inhibition totale série 2 ...	167
Tableau 10-7. Dilutions préparées (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – série 3	168
Tableau 10-8. Limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – pourcentage d'inhibition totale série 3 ...	168
Tableau 10-9. Dilutions préparées (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – série 4	168
Tableau 10-10. Limite de sensibilité du Delvotest [®] MCS – pourcentage d'inhibition totale série 4.	169

Tableau 10-11. Limite de sensibilité du Delvotest® MCS (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	169
Tableau 10-12. Données brutes obtenues lors de la détermination de la teneur en matière sèche après lyophilisation	170
Tableau 10-13. Pourcentage de matière sèche obtenus après les étapes de lyophilisation (MS), séchage 1 (MS ₀) et séchage 2 (MS ₁)	171
Tableau 10-14. Globalisation des résultats de mesure de la matière sèche après lyophilisation, après séchage 1 heure à 103°C et après séchage 2 heures à 103°C	173
Tableau 10-15. Comptage et mesure du pH réalisés pendant une période de 54 jours sur du lait cru congelé et sur du lait UHT	174
Tableau 10-16. Concentrations en antibiotique préparées pour évaluer la stabilité au mode de conservation (lyophilisation et congélation à -20°C)	177
Tableau 10-17. Résultats obtenus pour la Pénicilline G au cours de 11 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS	178
Tableau 10-18. Résultats obtenus pour la Cloxacilline au cours de 11 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS	179
Tableau 10-19. Résultats obtenus pour la Sulfadiazine au cours de 11 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS	180
Tableau 10-20. Résultats obtenus pour l'oxytétracycline au cours de 10 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS	181
Tableau 10-21. Composition des 16 dilutions utilisées pour l'évaluation de la lecture automatisée du Delvotest® MCS	183
Tableau 10-22. Résultats de l'évaluation de la lecture automatisée du Delvotest® MCS – CRAWD7 – Valeur de Z = -2,85	184
Tableau 10-23. Taux de récupération sur laits frais, conservé au réfrigérateur (18 heures) et congelé (48 heures)	188
Tableau 10-24. Taux de récupération sur lait frais, sur lait congelé et sur lait lyophilisé (après 5 semaines de conservation)	189
Tableau 11-5. Liste des antibiotiques testés et concentrations mises en œuvre	196
Tableau 12-1. Résultats des comptages effectués pour la vérification des conditions de stérilité du milieu et la détermination de la teneur en spores initiale	221
Tableau 12-2. Résultats des comptages effectués pour la vérification du non-comptage des spores par le Bactoscan FC	222
Tableau 12-3. Evaluation de la non contamination de la croissance à 64°C	223
Tableau 12-4. Résultats obtenus pour le calcul de l'erreur de transfert ($\text{impulsions}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $\text{bacteria}\cdot\text{mL}^{-1}$)	224
Tableau 12-5. Paramètres calculés lors de l'estimation de l'erreur de transfert ($\text{impulsions}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $\text{bacteria}\cdot\text{mL}^{-1}$)	225

Tableau 12-7. Reproductibilité des comptages BactoScan FC sur plus de 24 heures (impulsions·mL ⁻¹ ou bacteria·mL ⁻¹).....	227
Tableau 12-8. Cinétique de croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> au Bactoscan FC et par méthode de comptage sur boîte	229
Tableau 12-9. Cinétique de croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> au Bactoscan FC et par méthode de comptage sur boîte – résultats obtenus.....	231
Tableau 12-10. Nature et concentration des antibiotiques testés (μg·L ⁻¹ ou ppb)	233
Tableau 13-1. Ordre d’élution et temps de rétention des sulfamides étudiés (100 μg·L ⁻¹ ou ppb)	245
Tableau 13-2. Equations de régression linéaire et coefficients de détermination obtenus pour les sulfamides étudiés (100 μg·L ⁻¹ ou ppb) – température de 20°C.....	247
Tableau 13-3. Demi-vie du complexe fluorescent obtenu pour les sulfamides étudiés (100 μg·L ⁻¹ ou ppb)	248
Tableau 13-5. Paramètres chromatographiques calculés pour la méthode de séparation des sulfamides développée – facteur de résolution (R), facteur de séparation (α) et facteur de rétention (k ‘)	254
Tableau 13-6. Limites de détection calculées pour les différents sulfamides étudiés	255
Tableau 13-7. Suivi de la cinétique d’élimination de la sulfaméthazine dans le lait après traitement intra-utérin – mise en situation	255
Tableau 13-8. Suivi de la cinétique d’élimination différents sulfamides dans le lait après traitement par injection intra-veineuse – mise en situation	256
Tableau 13-9. Confirmation de la présence et dosage des sulfamides (μg·L ⁻¹) présents dans des échantillons positifs aux tests de screening « Sulfamides »	259
Tableau 15-1. Temps de passage dans les deux bains (eau glacée et eau à 42.3°C)	282
Tableau 15-2. Identification des zones spectrales (cm ⁻¹) d’intérêt – mesure du delta spectre après 24 heures d’incubation en l’absence de résidus inhibiteurs.....	285
Tableau 15-3. Conditions d’étude de l’activité de la pénicilline G et de l’amoxicilline sur <i>Gsc</i> , traduite dans le spectre MIR	290
Tableau 15-4. Médicaments vétérinaires utilisant l’association « Sulfamide – Triméthoprime » (<i>Compendium des médicaments vétérinaires de l’AGIM – AVGI-AGIM, 2001</i>)	292
Tableau 15-5. Mise en évidence de l’effet synergique « <i>Sulfamide – Triméthoprime</i> » - concentrations mises en oeuvre	294
Tableau 15-6. $\Delta_{\text{Absorbance}}$ mesurés pour les différents nombre d’onde – mise en évidence du complexe « Tétracycline – Carbonate de calcium ».....	297
Tableau 15-7. Mise en évidence de l’influence du pH du lait sur le métabolisme de <i>Gsc</i> – globalisation des résultats	299
Tableau 16-1. Essai préliminaire – visualisation du métabolisme après 24 heures d’incubation	310
Tableau 16-2. Essai préliminaire – homogénéité de l’éclairage de la micro-plaque	310

LISTE DES FIGURES

Figure 0-1. Structure de la pénicilline	43
Figure 0-2. Sites d'actions des antibiotiques (Euzéby J.P., 2009)	45
Figure 0-3. Identification de l'origine de la contamination (Fabre J.M. <i>et al.</i> , 1995)	46
Figure 0-4. Phases de la pharmacocinétique (ADME) (traduit de Debackere M., 1995)	51
Figure 0-5. Elimination de la sulfadimidine dans le lait après traitement intra-utérin (dose appliquée : 1 * 75 mL et 2 * 75 mL)	53
Figure 0-6. Obtention de produits laitiers fermentés et conséquences de la présence de résidus d'antibiotiques (Form G., 2003)	55
Figure 0-7. Voies de dissémination des résidus d'antibiotiques dans l'environnement	56
Figure 0-8. Structure de la filière laitière et contrôle des résidus d'antibiotiques	59
Figure 0-9. Moyens de contrôle mis en place aux différents niveaux de la filière	60
Figure 0-10. Révélation de l'inhibition bactérienne : zone d'inhibition et indicateur de pH	62
Figure 0-11. Confirmation d'un résultat microbiologique par un test rapide (BetaStar)	63
Figure 0-12. Séparation de résidus de médicaments vétérinaires (antibiotiques, antiparasitaires, désinfectants) par UPLC TM -détection détecteur à barettes de diodes (Romnee J.M., 2007, résultats non publiés)	65
Figure 0-13. Principes de l'évaluation toxicologique des antibiotiques	70
Figure 0-14. Détection des inhibiteurs dans le lait – Protocole au 1 ^{er} octobre 1994 – ^a : Delvotest [®] SP ou test de diffusion en tube préparé au laboratoire	75
Figure 0-15. Protocole de détection des inhibiteurs dans le lait – ^a : Delvotest [®] MCS (2000) ou Copan Milk Test [®] (2005)	77
Figure 0-16. Protocole de détection des inhibiteurs dans le lait – Introduction des tests rapides (2007) – ^a : Copan Milk Test ou Delvotest MCS – ^b : β-s.t.a.r 25	78
Figure 0-17. Schéma intégré de la détection des antibiotiques dans le lait – structure aux différents niveaux de la filière laitière (Heeschen W.H. & Suhren G., 1995)	79
Figure 0-18. Evolution en Belgique du nombre de producteurs	80

Figure 0-19. Evolution du nombre de contrôles et de résultats positifs (Comité du Lait, Battice)	81
Figure 0-20. Evolution du pourcentage de résultats positifs de janvier 2004 à décembre 2006 – Wallonie et Belgique ³⁶	82
Figure 0-21. Spectre électromagnétique (Sinnaeve G., 2001)	86
Figure 0-22. Modes de vibrations moléculaires (Wilmet A., 2000)	88
Figure 0-23. Interprétation du résultat de la mise en évidence des sulfamides	95
Figure 0-24. Exemple de résultats avec zone d'inhibition	97
Figure 0-25. Interprétation des résultats du Delvotest [®] SP (Données DSM)	99
Figure 0-26. Effet d'une incubation prolongée sur la sensibilité du Delvotest [®] SP (le temps t = 0 correspond au moment où la sensibilité est maximale – virage de l'indicateur) (Données DSM)	99
Figure 0-27. Valio T101 [®] - test et interprétation des résultats	100
Figure 0-28. Principe du fonctionnement du Penzym [®] S	101
Figure 0-29. Structure de collecte des échantillons de lait	102
Figure 0-30. Répartition géographique des échantillons de lait prélevés et analysés	103
Figure 0-31. Répartition des groupes d'antibiotiques dans le traitement des diverses pathologies rencontrées	104
Figure 0-32. Formule chimique de la chlorhexidine – C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀	124
Figure 0-1. Répartition des blocs sur la microplaqué	135
Figure 0-2. Répartition des 27 dilutions d'antibiotiques sur les trois plaques	135
Figure 0-3. Répartition des échantillons de laits crus de tank sur la microplaqué (essai 4)	137
Figure 0-4. Répartition des échantillons de laits de tank pasteurisés sur la microplaqué (essai 5)	137
Figure 0-5. Répartition des échantillons de laits de tank pasteurisés sur la microplaqué 2	139
Figure 0-6. Marché français des antibiotiques – pourcentage occupé par chacune des classes dans les antibiotiques produits à destination de la médecine vétérinaire (pourcentage calculé sur le tonnage brut) en rapport avec la voie d'administration – AFSSA 1999	143

Figure 0-7. Détermination de la limite de détection pour l'oxytétracycline au moyen de la procédure PROBIT (logiciel SAS)	143
Figure 0-8. Représentation graphique des limites obtenues avec le CMT pour 5 antibiotiques (en comparaison avec les LMR respectives)	145
Figure 0-9. Diagramme de répartition des valeurs de Z obtenues pour les Blancos (n = 144)	147
Figure 0-10. Répartition des valeurs de Z obtenues pour les différents blancos dans les séries d'analyses	147
Figure 0-11. Résultats obtenus pour les trois lots de CMT sur les 45 laits crus de tank, analysés en double (lecture après 3 heures d'incubation) – blancos inclus dans les résultats	149
Figure 0-12. Résultats obtenus pour les trois lots de CMT sur les 45 laits de tank, après pasteurisation, analysés en double (lecture après 3 heures d'incubation) – blancos inclus dans les résultats	151
Figure 0-13. Correspondance entre les résultats obtenus sur laits crus et sur laits pasteurisés (moyenne calculée sur les doublets) – 3 heures d'incubation	152
Figure 0-14. Cinétique d'acidification d'un lait cru (échantillon), d'un lait UHT (blancos), d'un lait dopé à la pénicilline, d'un lait dopé à la cloxacilline, d'un lait dopé à l'oxytétracycline et d'un lait dopé à la sulfaméthazine	153
Figure 0-15. Lyophilisateur Lyovac GT2	163
Figure 0-16. Répartition des pertes en eau lors du second séchage	172
Figure 0-17. Schéma de répartition du lait cru pour le suivi du pH et de la charge en germes, après congélation	174
Figure 0-18. Evolution des laits congelés : pH et comptage microbien	175
Figure 0-19. Suivi du pH de laits crus congelés	176
Figure 0-20. Evolution de la fluorescence de la sulfadiazine et de la sulfaméthazine au cours du temps (pourcentage d'aire, T = 60 minutes correspondant à 100 %)	186
Figure 0-21. Cinétique d'émission de fluorescence – Sulfadiazine et Sulfaméthazine	186
Figure 0-22. Evolution du rapport de la fluorescence de la sulfadiazine et de la sulfaméthazine (standard interne) au cours du temps	187

Figure 0-23. Rendement d'extraction de la sulfadiazine après conservation par lyophilisation et par congélation	189
Figure 0-1. Interprétation du résultat obtenu avec le <i>Charm Rosa</i>	192
Figure 0-1. Schéma de fonctionnement du Bactoscan FC (Ninane V. <i>et al.</i> , 2000)	220
Figure 0-2. Diagramme de dispersion des résultats obtenus en conditions de reproductibilité	228
Figure 0-3. Cinétique de croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> : comparaison du Bactoscan FC et de la méthode de comptage sur boîte	229
Figure 0-4. Diagramme de dispersion des valeurs obtenues par le Bactoscan FC et par la méthode de comptage sur boîte	230
Figure 0-5. Cinétique de croissance – relation entre les valeurs mesurées par BactoScan FC et les comptages déterminés sur boîtes de pétri	231
Figure 0-6. Réaction de Maillard obtenue sur le milieu chauffé après 5 heures d'incubation	232
Figure 0-7. Cinétiques « BactoScan FC » en présence d'antibiotiques (LMR)	234
Figure 0-8. Cinétiques « Boîtes de pétri » en présence de 2 antibiotiques à noyau β -lactame, la benzylpénicilline et la cloxacilline	234
Figure 0-9. Cinétiques « Boîtes de pétri » en présence de 2 antibiotiques, la sulfadiazine et l'oxytétracycline	235
Figure 0-10. Cinétiques « Boîtes de pétri » en présence de la dihydrostreptomycine	236
Figure 0-1. Réaction de fluorescence entre la fluorescamine et les sulfamides	242
Figure 0-2. Cinétiques de fluorescence d'une solution de sulfamérazine $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ – incidence du pH	242
Figure 0-3. Cinétiques de fluorescence d'une solution de sulfaméthazine et d'une solution de sulfadiméthoxine ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) – incidence de la concentration en fluorescamine	243
Figure 0-4. Cinétiques du développement de la fluorescence d'une solution de sulfaméthazine ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) – incidence de la concentration en fluorescamine	243
Figure 0-5. Cinétiques de fluorescence de différents sulfamides ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) – incidence de la nature du sulfamide	244

Figure 0-6. Evolution de la fluorescence des sulfamides ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) au cours de 24 heures à température ambiante (20°C) – enregistrements réalisés toutes les 30 minutes	245
Figure 0-7. Evolution de la fluorescence des sulfamides ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) après transformation de la réponse du détecteur en logarithme népérien (\ln) – température ambiante (20°C)	246
Figure 0-8. Evolution de la fluorescence des sulfamides ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) – comparaison des cinétiques de dégradation à 4°C et à 20°C	248
Figure 0-9. Evolution de la fluorescence des sulfamides ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) – répétabilité de la cinétique de dégradation à 20°C	250
Figure 0-10. Chromatogramme de la séparation des complexes fluorescents <i>sulfamide-fluorescamine</i> ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm} - \lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)	251
Figure 0-11. Chromatogramme de la séparation des sulfamides et de l'acide <i>p</i> -aminobenzoïque ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm} - \lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)	252
Figure 0-12. Chromatogramme de la séparation des sulfamides et du sulfamoxole ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm} - \lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)	252
Figure 0-13. Chromatogramme de la séparation des sulfamides et du sulfatroxazole ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm} - \lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)	253
Figure 0-14. Cinétique d'élimination de la sulfaméthazine après traitement intra-utérin au Sulfaphénicol®	256
Figure 0-15. Cinétique d'élimination de sulfamides après traitement intra-veineux au Tétramidan®	257
Figure 0-16. Illustrations de la séparation des sulfamides pour des échantillons provenant de la filière laitière - chromatogrammes	258
Figure 0-1. Schéma du fermenteur	263
Figure 0-2. Schéma expérimental pour évaluer l'activité de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> en microplaqué	266
Figure 0-3. Schéma expérimental pour évaluer, en microplaqué, l'activité antibactérienne de 4 antibiotiques sur <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	267

Figure 0-4. Évolution du milieu de culture en l'absence (A : incubation 3 heures sans spores) et en présence de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> (B : incubation pendant 24 heures après l'ajout de spores)	268
Figure 0-5. Identification des pics d'intérêt (A : mélange d'acides – B : constituants du milieu)	269
Figure 0-6. Cinétique de la croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> en microplaqué (A : milieu liquide et spores – B : milieu liquide, lait et spores)	270
Figure 0-7. Indicateur du métabolisme M – paramètres de calcul	271
Figure 0-8. Evolution de l'indicateur de métabolisme M au cours du temps : milieu liquide additionné de lait et milieu liquide ensemencé, additionné de lait	272
Figure 0-9. Activité antibactérienne de la pénicilline G ($3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), de la cloxacilline ($60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), de la sulfadiazine ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et de l'oxytétracycline ($250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sur <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> en microplaqué – Indicateur de métabolisme M	273
Figure 0-10. Limite de détection de la pénicilline G – indicateur de métabolisme M	274
Figure 0-11. Limite de détection de la cloxacilline – indicateur de métabolisme M	275
Figure 0-12. Limite de détection de la sulfadiazine – indicateur de métabolisme M	275
Figure 0-13. Limite de détection de l'oxytétracycline – Indice du métabolisme M	276
Figure 0-14. Limite de détection de la tylosine – Indice de métabolisme M	277
Figure 0-15. Limite de détection de la dihydrostreptomycine – Indicateur de métabolisme M	277
Figure 0-1. Appareil Anadis AEGYS Mi 200	280
Figure 0-2. Cellule de pompage de l'Anadis AEGYS Mi 200	280
Figure 0-3. Cellules de l'Anadis AEGYS Mi 200	281
Figure 0-4. Evolution de la température dans les échantillons plongés dans les bains d'eau glacée et à $42,3^\circ\text{C}$	283
Figure 0-5. Métabolisme de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> en l'absence d'antibiotiques, mise en évidence par différence spectrale (calcul du Delta Spectre) après 24 heures d'incubation à 64°C	284

Figure 0-6. Mesure du bouillon <i>ElPcGl</i> (4 répétitions)	285
Figure 0-7. Superposition du delta spectre (24 heures d'incubation), du glucose (5 % dans H ₂ O) et de l'acide lactique (5 % dans H ₂ O)	286
Figure 0-8. Déviation standard (unité d'absorbance) mesurée sur 5 séries de rinçage (éther ou paraffine)	287
Figure 0-9. Rinçage de la cellule à l'eau osmosée – matrice étudiée : lait	287
Figure 0-10. Comparaison des spectres obtenus sur cellule de transmission et sur cellule ATR pour le lait – n = 5	288
Figure 0-11. Cinétique du métabolisme de <i>Gsc</i> mesurée sur cellule ATR	289
Figure 0-12. Cinétique du métabolisme de <i>Gsc</i> en présence d'amoxicilline (1 µg·L ⁻¹)	291
Figure 0-13. Cinétique du métabolisme de <i>Gsc</i> en présence de pénicilline G (1 µg·L ⁻¹) seule (à gauche) et additionnée de pénicillinase (à droite)	291
Figure 0-14. Mode d'action des sulfamides et du triméthoprime (adapté de <i>Encyclopédia Universalis</i>)	293
Figure 0-15. Cinétique de <i>Gsc</i> réalisée dans du lait dopé avec 10 ppb de sulfamérazine et 50 ppb de triméthoprime	294
Figure 0-16. Cinétique de <i>Gsc</i> réalisée dans du lait dopé avec 50 ppb de sulfamérazine et 50 ppb de triméthoprime	295
Figure 0-17. Cinétique de <i>Gsc</i> réalisée dans du milieu <i>ElPcGl</i> en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium (0,75 %)	296
Figure 0-18. Cinétique de <i>Gsc</i> réalisée dans du milieu <i>ElPcGl</i> en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium (2,25 %)	296
Figure 0-19. Cinétique de <i>Gsc</i> réalisée dans du milieu <i>ElPcGl</i> en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium (3,75 %)	297
Figure 0-20. Cinétiques de <i>Gsc</i> réalisées dans du milieu <i>ElPcGl</i> en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium – indice de métabolisme M'	298

Figure 0-21. Cinétiques de <i>Gsc</i> réalisées dans des laits de pH différents (pH = 6,65 à gauche et pH = 7,50 à droite)	299
Figure 0-22. Globalisation des Delta spectres obtenus – élimination des aberrants	300
Figure 0-23. Analyse en composantes principales des Delta spectres (n = 75)	301
Figure 0-24. Relation entre pH prédit et pH mesuré (n = 75)	302
Figure 0-25. Carte factorielle des différents résultats obtenus : pH, comptages microbiologiques, déterminations chromatographiques (n = 75)	303
Figure 0-26. Projection des Delta spectres sur la carte factorielle des différents résultats obtenus : pH, comptages microbiologiques, déterminations chromatographiques (n = 75)	304
Figure 0-27. Projection des Delta spectres sur la carte factorielle des différents résultats obtenus : répartition en classes	305
Figure 0-1. Caméra SPIR « Matrix »	309
Figure 0-2. Essai préliminaire : répartition sur la micro-plaque Copan Milk Test	309
Figure 0-3. Essai préliminaire : homogénéité de l'éclairage – répartition sur la micro-plaque en quartz à bords noirs	310
Figure 0-4. Essai préliminaire : diffusion de l'acide lactique dans la micro-plaque de CMT – photo prise à la caméra SPIR	311
Figure 0-5. Diffusion de l'acide lactique dans la micro-plaque de CMT – <i>Indexed Factor Scores (Factor 6)</i>	311
Figure 0-6. Mise en évidence de l'inhibition de <i>GSC</i> après 24 heures d'incubation en présence de résidus de pénicilline G (20 µg·L ⁻¹)	312
Figure 0-7. Mise en évidence de l'inhibition de <i>Gsc</i> après 24 heures d'incubation	313

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1	70
Équation 2	71
Équation 3	71
Équation 4	224
Équation 5	271
Équation 6	271

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 6-1. Principe de détection sur boîte de pétri des antibiotiques à noyau β -lactame 98

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

La détection des antibiotiques dans le lait reste une préoccupation majeure de la filière laitière. En effet, les risques encourus par les différents participants sont particulièrement élevés pour les deux acteurs : le producteur laitier se voit pénaliser et le transformateur perd une quantité non négligeable de matière première. A côté de ces risques purement commerciaux, se profilent les risques liés à la santé publique : allergie et antibiorésistance. Bien que ce dernier ne semble pas lié directement aux résistances rencontrées dans la médecine humaine, il semble important de ne pas le négliger afin d'éviter la possibilité de transférer une résistance acquise auprès de bovins à des bactéries pathogènes pour l'homme. Ces transferts de résistance peuvent être renforcés par la dissémination anarchique des résidus antibiotiques dans l'environnement.

Dans l'étude bibliographique, une synthèse a été rédigée sur les inhibiteurs au sens large. Cette synthèse comprend des éléments de terminologie, particulièrement importante dans le domaine des résidus, des éléments propres aux inhibiteurs naturels ou antibiotiques ainsi qu'une description des législation européenne et belge, dressant pour finir un état des lieux du système de contrôle mis en place en Belgique. Quelques inhibiteurs naturels, susceptibles d'interférer avec les tests de détection des antibiotiques sont d'abord décrits. Ensuite, les antibiotiques utilisés en médecine sont replacés dans leur contexte d'utilisation à la ferme, envisageant les différentes applications possibles : promoteurs de croissance, thérapeutiques, usage en agriculture. L'élimination des résidus est ensuite envisagée, en fonction du mode d'administration des médicaments. Les conséquences de la présence de ces résidus dans les matières premières sont analysées pour permettre de définir les modes de détection à mettre en œuvre dans la filière, si celle-ci souhaite conserver la qualité de son produit. Ces moyens sont quelque peu détaillés, en les replaçant aux différents endroits de la filière. Un chapitre relatif à la spectrométrie infra-rouge clôture cette étude bibliographique.

Cette partie vise à donner les éléments de base nécessaires à la bonne compréhension de la partie expérimentale.

Avant d'aborder les conclusions et certaines perspectives dans le domaine de la détection des antibiotiques dans le lait, une série d'essais ont été menés pour caractériser et évaluer le processus de détection des antibiotiques dans le lait en Belgique. L'approche envisagée pour le suivi de ces essais repose sur le côté pratique de la détection : quels sont les outils dont dispose la filière pour se prémunir contre ce type d'accidents ?

Le premier intervenant de la filière étant le producteur, il semblait logique de débuter l'analyse des moyens au niveau de la ferme. C'est pourquoi, l'étude initiale de ce travail consiste à évaluer les outils disponibles pour une application directement à la ferme. Les résultats obtenus dans cet essai ont conduit à envisager des éléments pouvant interférer dans le résultat du test : alimentation du cheptel bovin et désinfectant, utilisé lors de la traite.

Le niveau suivant de la filière pour lequel les tests de détection sont importants concerne le contrôle officiel : il est important de choisir le test adéquat pour permettre le contrôle du respect de la législation. Deux types de tests (microbiologique et rapide) sont évalués afin de permettre leur intégration dans le protocole de contrôle mis en place en Belgique.

Les résultats obtenus lors des tests de screening étant non spécifiques, le développement d'outils analytiques plus appropriés est nécessaires. Le métabolisme, mis en évidence dans les tests microbiologiques a ainsi été suivi par chromatographie liquide. Ce suivi a débouché sur la définition d'un indicateur intégrant la variation de différents composés (principalement des acides) au cours du temps (croissance ou inhibition de la souche test). Le calcul de cet indicateur permet de quantifier la croissance de la souche. Une méthode spécifique de chromatographie liquide a été développée pour suivre la présence de sulfamides. Son application a été évaluée lors du suivi de l'élimination après traitement, lors de la conservation de standards et lors de l'analyse de laits donnant un résultat positif aux tests de screening (monitoring).

Le transfert des méthodes analytiques vers la spectrométrie infra-rouge a été envisagé pour réduire les manipulations nécessaires à bon nombre de protocoles analytiques de type chromatographique. Deux approches ont été privilégiées dans ces essais : le transfert vers le moyen infra-rouge (suivi du milieu liquide) et vers le proche infra-rouge, en utilisant la caméra.

Chacun des chapitres relatifs à ces différents essais reprend ses propres conclusions. Des conclusions générales, accompagnées de perspectives et de pistes de réflexion clôturent ce travail.

CHAPITRE 2 : GLOSSAIRE DE TERMES ET DÉFINITIONS

Dans le domaine des résidus et des contaminants, il est essentiel d'utiliser des termes dont la définition est claire et bien assise. La différence qui existe entre « résidus » et « contaminants » réside essentiellement dans le mode de pénétration de la chaîne alimentaire. Ainsi, les composés qui se retrouvent sur les plantes ou dans les animaux après l'utilisation de pesticides ou de médicaments sont appelés « résidus ». Il est possible de réduire leur présence par différentes façons :

- l'interdiction d'utilisation de certains composés sur les plantes ou sur les animaux (par exemple, le chloramphénicol sur vache laitière),
- la fixation d'une période de retrait entre la dernière application du composé et l'utilisation du produit,
- la fixation de limite maximale de résidus (LMR).

Dans le cas des contaminants, les composés pénètrent dans la chaîne alimentaire de manière incontrôlable, tant au cours de la production qu'au cours des différentes étapes de transformation. Parmi ces contaminants, plusieurs groupes sont particulièrement importants pour la filière alimentaire : les mycotoxines, les métaux lourds, les dioxines et PCBs. Leur présence reste plus difficile à maîtriser et les moyens à mettre en œuvre ne couvrent pas que le produit fini.

Ce glossaire permet de préciser la portée des différents termes utilisés dans le document. Il est basé sur diverses sources dont le document manuel de procédure du Codex Alimentarius. Certaines définitions sont données aux fins du Codex Alimentarius, leur acceptation étant donc limitée dans le cadre de ce travail. En effet, en terme d'exemple, la notion de médicament vétérinaire est bien entendu plus large que la définition donnée ci-dessous, qui s'applique essentiellement à des animaux producteurs d'aliments dans le cadre de ce travail.

- **Antibiotique** : substance chimique produite par des micro-organismes et capables, à faible concentration, d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes ou même de les détruire. Actuellement, on préfèrera une définition plus large : composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produit par synthèse, dont l'activité spécifique se manifeste à faible dose sur les micro-organismes.

- **Bonnes pratiques d'utilisation des médicaments vétérinaires (BPMV)¹** : usage officiel recommandé ou autorisé et comprenant les temps d'attente, approuvés par les autorités nationales, pour les médicaments vétérinaires dans des conditions pratiques.
- **Concentration minimale inhibitrice (CMI)** : la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée. D'une détermination peu précise, cette donnée est cependant consacrée par l'usage et bénéficie d'une masse importante d'informations.
- **Denrée alimentaire¹** : toute substance traitée, partiellement traitée ou brute, destinée à l'alimentation humaine. Elle englobe les boissons, le chewing-gum et toutes les substances utilisées dans la fabrication, la préparation et le traitement des aliments, à l'exclusion des substances employées uniquement sous forme de médicaments, de cosmétiques ou de tabac.
- **Dose journalière admissible temporaire (DJAT)** : une DJAT est fixée lorsque les données disponibles permettent de conclure que l'emploi de la substance pendant une courte période ne présente aucun risque pour la santé humaine, mais que des données supplémentaires en matière de sécurité sont nécessaires pour fixer une DJA ne présentant aucun danger pendant toute une vie. Un facteur de sécurité supérieur à la normale est utilisé pour l'établissement d'une DJAT et une date limite est fixée à laquelle les données appropriées pour trancher la question de sécurité doivent être soumises au JECFA.
- **Dose journellement admissible (DJA)** : estimation faite par le JEFCA de la quantité de médicaments vétérinaires, exprimée sur la base du poids corporel et pouvant être absorbée quotidiennement pendant toute une vie sans présenter de risque appréciable pour la santé (poids humain européen normalisé : 60 kg).
- **JEFCA** : Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires, administré conjointement par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le JEFCA se réunit depuis 1956, il était chargé à l'origine d'évaluer la sécurité sanitaire des additifs alimentaires. Aujourd'hui, ses activités portent également sur l'évaluation des contaminants, des substances toxiques d'origine naturelle et des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments

¹ : Codex Alimentarius – Manuel de procédure – Seizième édition – Rome, 1996

- **Lait** : il s’agit exclusivement de la sécrétion mammaire normale obtenue à partir d’une ou de plusieurs traites, sans addition ou extraction. Ce terme peut être utilisé pour un lait traité dont la composition n’a pas été altérée ou pour un lait dont la teneur en matières grasses a été normalisée conformément à une législation nationale. Ce terme peut également être utilisé en association avec un ou plusieurs mots pour désigner, le type, la qualité, l’origine et/ou l’utilisation prévue d’un tel lait ou pour décrire le traitement physique auquel il a été soumis ou la modification apportée à sa composition, dans la mesure où cette modification se limite à une addition et/ou une soustraction de composés dans un lait naturel. Dans le commerce international, l’origine du lait devra être stipulée s’il n’est pas d’origine bovine².
- **Limite de détection (LOD limit of detection)** : la plus petite quantité d’un analyte observable dans une matrice donnée (exprimée en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou en $\text{\mu g}\cdot\text{kg}^{-1}$ sur la base du poids frais).
- **Limite de quantification (LOQ limit of quantification)** : la plus petite quantité d’un analyte en dessous de laquelle il est difficile de quantifier la substance avec une incertitude acceptable. Elle peut être aussi définie comme concentration en résidu la plus basse qui peut être identifiée et quantifiée dans une matrice donnée (exprimée en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou en $\text{\mu g}\cdot\text{kg}^{-1}$ sur la base du poids frais). Généralement, elle correspond à 5 à 10 fois la LOD.
- **Limite maximale de résidus pour les médicaments vétérinaires (LMRMV)¹** : concentration maximale de résidu résultant de l’emploi d’un médicament vétérinaire (exprimée en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou en $\text{\mu g}\cdot\text{kg}^{-1}$ sur la base du poids frais) et recommandée par la Commission du *Codex Alimentarius* comme légalement permise ou estimée acceptable dans ou sur un aliment. Cette limite est basée sur le type et la quantité de résidu que jugée sans danger toxicologique pour la santé humaine tel qu’il est exprimé par la DJA, ou sur la base d’une DJA temporaire utilisant un facteur supplémentaire de sécurité. Elle intègre également d’autres risques de santé publique pertinents ainsi que certains aspects de technologie de transformation. Lors de l’établissement d’une LMR, les résidus se retrouvent dans les aliments d’origine végétale et/ou dans l’environnement ne doivent pas être laissés pour compte. De plus, la LMR est susceptible d’être réduite pour respecter les bonnes pratiques d’utilisation de médicaments vétérinaires, dans la mesure où des méthodes d’analyse pratiques sont disponibles.

² Anonyme (1987). Règlement (CEE) n° 1898/87 du Conseil concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation, J.O. N° L182, 03.07.1987, 36-38

- **Médicament vétérinaire¹** : toute substance appliquée ou administrée à tout animal producteur de nourriture, tels que les animaux producteurs de viande ou de lait, la volaille, les poissons ou les abeilles, que ce médicament soit utilisé dans un but thérapeutique, prophylactique ou de diagnostic, ou pour la modification de fonctions physiologiques ou du comportement.
- **Méthode de dépistage (*Screening method*)** : méthode de terrain rapide, relativement peu onéreuse et rudimentaire utilisée pour tester la présence d'une substance spécifique ou d'un groupe de substances étroitement liées, et suffisamment sélective et sensible pour permettre au moins une détection semi-quantitative des résidus, à des teneurs proches de la limite maximale établie.
- **Méthode réglementaire d'analyse** : méthode ayant fait l'objet d'un décret légal et/ou ayant été validée dans une étude multi-laboratoires et pouvant être mise en œuvre par un personnel de laboratoire spécialisé utilisant un équipement et du matériel couramment disponibles pour détecter et déterminer la concentration d'un résidu d'un médicament vétérinaire dans des produits comestibles d'origine animale, afin de s'assurer de la conformité à la LMR.
- **Méthode validée** : méthode d'analyse ayant été soumise à un essai interlaboratoires (EIL) pour en déterminer la fidélité, la précision, la reproductibilité et la robustesse. Des procédures écrites concises pour la sélection, la préparation et l'analyse quantitative de l'échantillon sont fournies.
- **Période de retrait et délai d'attente** : il s'agit du délai entre la dernière administration d'un médicament et le prélèvement de tissus ou produits comestibles sur un animal traité, garantissant que la teneur des résidus de médicament dans les aliments est conforme à la limite maximale de résidus pour ce médicament vétérinaire (LMRMV). La notion de temps d'attente a cependant évolué. En effet, un temps d'attente nul signifie que les denrées produites peuvent être commercialisées dès la fin du traitement. Le temps d'attente sans objet permet la commercialisation des denrées tout au long du traitement (Enriquez B., 2000).
- **Résidu marqueur** : résidu dont la teneur diminue suivant une relation connue avec la concentration de résidu total dans les tissus, les œufs ou le lait. Pour le déterminer, il faut

disposer d'une méthode d'analyse quantitative spécifique permettant de mesurer la concentration du résidu avec la sensibilité requise³.

- **Résidu total** : le résidu total d'un médicament dans un aliment d'origine animale comprend la substance mère et tous ses métabolites et dérivés restant dans l'aliment après administration du médicament à des animaux dont la chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine. La quantité de résidu total est généralement déterminée à l'aide de médicament radiomarqué et est exprimée en quantité de substance mère, en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ d'aliment.
- **Résidus de médicaments vétérinaires¹** : ils comprennent les composés souches et/ou leurs métabolites ainsi que les impuretés associées au médicament vétérinaire concerné, présents dans toute partie comestible du produit animal.

³ Joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives (1989) – Evaluation de résidus de certains médicaments vétérinaires dans les aliments : trente-quatrième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires. Genève

CHAPITRE 3 : LES INHIBITEURS

Il est d'usage de regrouper sous le vocable « **INHIBITEURS** » l'ensemble des substances capables d'inhiber à faible concentration le processus vital des micro-organismes, et dont la présence dans le lait a pour effet de ralentir ou de bloquer les fermentations sur lesquelles reposent de nombreux processus technologiques. La présence dans le lait de telles substances, si elle reste souvent involontaire, constitue une faute en regard de la loi.

Les inhibiteurs appartiennent à deux catégories de substances :

- les inhibiteurs dits « naturels »
- les inhibiteurs dits « non-naturels »

Parmi les inhibiteurs naturels, différents systèmes destinés à protéger le veau durant la période post-natale peuvent être cités. De nombreuses molécules chimiques utilisées tant dans les exploitations d'élevage (antibiotiques, antiparasitaires, désinfectants) que dans l'industrie de transformation (désinfectants) se retrouvent dans les inhibiteurs non-naturels ou de synthèse (Romnee J.M., 1996).

3.1. Les inhibiteurs naturels

Le lait procure non seulement les éléments nutritifs nécessaires à la bonne croissance du nouveau né mais lui fournit aussi les facteurs antimicrobiens destinés à le protéger en attendant un complet développement de ses propres systèmes de défense, notamment immunitaire. C'est le rôle premier du colostrum que de transmettre ces facteurs de protection. Comme la composition, la nature et la teneur de ces facteurs antimicrobiens diffèrent d'espèce à espèce. C'est ainsi que le lait humain est particulièrement riche en lactoferrine et en lysozyme alors que sa teneur en lactoperoxidase reste négligeable. Le lait de vache, quant à lui, présente des teneurs en lysozyme très faibles (Martinet J. & Houdebine L.-M., 1993). Les conséquences de ces différents inhibiteurs naturels sur la détection des antibiotiques seront discutées au point 3.2.9.1., consacré aux méthodes microbiologiques utilisées pour mettre en évidence la présence ou l'absence des antibiotiques.

3.1.1. Le lysozyme

Le lysozyme (1,4 β N acetylmuramidase) fut découvert par Fleming en 1922. Cette protéine relativement petite, de l'ordre de 130 acides aminés, se retrouve chez de nombreuses

espèces tant animales que végétales⁴. Dans les sécrétions animales qui le contiennent, on peut citer le sang, la salive, le blanc d'œuf, le lait. Dans le lait de vache, la teneur peut varier de 0,01 à 0,18 mg.l⁻¹, en fonction de l'état physiologique de l'animal (Carlsson A. & Björck L., 1989).

En effet, les laits mamiteux présentent des teneurs en lysozyme plus élevées. L'activité antibiotique du lysozyme est bien connue : il clive la liaison glycosidique entre l'acide N-acetylmuramique et la N-acetylglucosamine du peptidoglycane qui constitue la plupart de la paroi cellulaire bactérienne. La sensibilité des bactéries à cet inhibiteur naturel dépend de l'accessibilité du substrat de l'enzyme. Les bactéries Gram-positives sont plus sensibles car elles possèdent une paroi constituée presque exclusivement de peptidoglycane. Cependant, certaines bactéries comme les Staphylocoques possèdent une certaine résistance au lysozyme due à une présence importante dans leur paroi de certains composés (acides téichoïques, notamment) qui réduisent l'accessibilité au substrat. Les bactéries Gram-négatives, quant à elles, sont constituées d'une paroi contenant moins de peptidoglycane (5 à 10 %) et protégée par une couche de lyposaccharides, ce qui les rend moins sensibles à une attaque du lysozyme. Si cette protection est rompue, les bactéries Gram-négatives deviennent, elles aussi, sensibles au lysozyme. Payne *et al.* (1994) ont ainsi montré les effets antibactériens que le lysozyme pouvait présenter en association avec d'autres constituants, notamment l'apo-lactoferrine ou l'EDTA (Vakil J.R. *et al.*, 1969). L'action antibactérienne directe a pu être établie pour le lait maternel (Armengaud D., 2003). De plus, le lysozyme pourrait jouer un rôle d'immunomodulateur par le biais des fragments de peptidoglycane qu'il libère (Martinet J. & Houdebine L.M., 1993).

La stabilité du lysozyme est conditionnée, comme pour les autres enzymes, par une série de paramètres physico-chimiques tels que pH ou température. Bien que les pourcentages de perte varient selon les études, les données trouvées chez différents auteurs montrent que le lysozyme est particulièrement stable à la température en milieu acide (perte de 2 à 43 % de son activité selon les conditions de chauffage) (Juaregui-Adell J., 1975 – Eitenmiller *et al.*, 1976). Par contre, les mêmes conditions de chauffage appliquées en milieu basique (pH 9) conduisent à une perte de 75 à 98 % de son activité.

L'activité antibactérienne du lysozyme est réduite en présence de cations mono- (Na^+ , K^+ , NH_4^+) ou di-valents (Ca^{++} , Mg^{++}). Certains métaux présentent le même effet : Ni^{++} , Fe^{++} , ... (Benkerroum N., 2008).

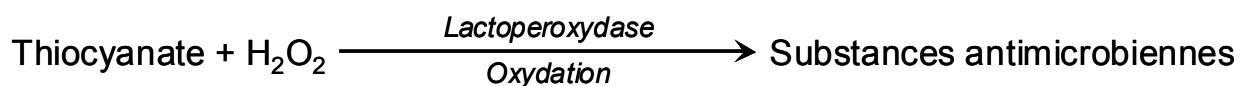
⁴ Merck Index (2001), Tirtheen edition

3.1.2. La lactoferrine

La lactoferrine est présente dans le lait de vache à des concentrations moindres que dans le lait humain (100 fois moins). Elle agit par fixation du fer, entraînant ainsi l'inhibition des systèmes enzymatiques nécessitant le fer. L'activité de la lactoferrine est limitée sur la bactéries lactiques car ces dernières sont peu consommatrices de fer.

3.1.3. Le système lactoperoxydase

Un des systèmes de défense du lait repose sur l'association « thiocyanate – lactoperoxydase – eau oxygénée », selon la réaction naturelle suivante :



Les différents intervenants de cette réaction sont présents dans le lait : les thiocyanates proviennent de l'alimentation, la lactoperoxydase est naturellement présente, tout comme l'eau oxygénée. Cette dernière reste cependant le facteur limitant. Son adjonction dans le lait rend le système particulièrement efficace en matière de conservation du lait, amenant le Codex à autorisé son application dans les pays en voie de développement, où la maîtrise de la chaîne du froid s'avère difficile⁵. L'utilisation de ce système ne vise pas à l'amélioration du produit mais bien à conserver sa qualité initiale.

3.1.4. Les immunoglobulines

Le lait cru contient des anticorps actifs contre certaines bactéries lactiques (streptocoques ou lactobacilles). Ces anticorps, appelés agglutinines, peuvent provoquer l'agglutination des bactéries lactiques. Leur présence excessive dans le lait peut conduire à des défauts de fermentation lors de la mise en œuvre des souches technologiques : le lait n'est pas correctement acidifié et la texture du caillé présente donc des défauts de structure (fissure) et de saveur (aigre) (Brouillet P., 1992).

Les immunoglobulines, peu présentes dans un lait normal, voient leur concentration augmenter dans le lait d'une vache atteinte de mammite. Elles sont cependant détruites par un chauffage de 20 secondes à 82°C.

⁵ Directives Codex CAC/GL 13 - 1991

3.1.5. Autres inhibiteurs naturels

D'autres inhibiteurs naturels ont pu être mis en évidence dans le lait. Ainsi, les acides gras présentent un pouvoir inhibiteur qui s'ajoute à l'inhibition provoquée par les autres agents naturels. Les laits présentant une forte activité des lypases (lypolysé) montrent une inhibition vis à vis de la souche test utilisée pour la détection des antibiotiques (Romnee J.M., résultats non publiés). Ababouch L. *et al.* (1992) ont montré que les acides linolénique et laurique présentaient une activité antibactérienne importante sur les spores de *Clostridium botulinum* 62A, *Clostridium sprogenes* PA3679 et *Bacillus cereus* F4165/75. D'autres auteurs⁶⁻⁷, cités par Ababouch L. *et al.* (1992) ont présenté la neutralisation (effet antagoniste) de l'activité antibactérienne des acides gras par l'amidon, le Ca²⁺, le Mg²⁺, la lécithine ou la sérum albumine.

3.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules d'origine biologique capables d'inhiber la croissance de micro-organismes ou même de les détruire sans pour autant affecter les cellules de l'hôte. Ils sont produits par des micro-organismes (bactéries ou champignons) ou ils résultent de modifications chimiques (hémi-synthèse) visant à améliorer le potentiel inhibiteur de la molécule naturelle ou ses paramètres pharmacocinétiques. Actuellement, les progrès de la chimie de synthèse ont permis de produire certains antibiotiques de manière artificielle. De plus, d'autres molécules possédant des propriétés antibactériennes ont rejoint le groupe des antibiotiques (sulfamides et dérivés, quinolones et dérivés, ...).

Certains essais ont par ailleurs été réalisés pour tenter de réduire la présence de pénicilline dans le lait (Kosikowski F.V. & Jimenez-Flores R., 1985 – Lee M.Z.P. & Richardson T., 1987). Ces essais ont cependant été abandonnés.

3.2.1. Nature et classification

Le premier antibiotique à usage clinique, la pénicilline G, (**Figure 3-1**) a été découvert par Fleming en 1929. Sa découverte résulte de l'action inhibitrice d'une colonie de *Penicillium notatum* sur *Staphylococcus aureus* lors d'une contamination accidentelle d'une boîte de Petri⁸.

⁶ FOSTER J.W. & WYNNE E.S. (1948). Physiological studies on spore germination, with special reference to *Clostridium botulinum*. IV. Inhibition of germination by unsaturated C₁₈ fatty acid. *J. Bacteriol.* **55**, 495-504 – cité par Ababouch L. *et al.* (1992)

⁷ GALBRAITH H., MILLER T.B., PATON A.M. & THOMPSON H.K. (1971). Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with Ca, Mg, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 803-813 – cité par Ababouch L. *et al.* (1992)

⁸ <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/penicill.htm> (2009-03-06)

Au début, la production de ces molécules présentant un pouvoir inhibiteur a été perçue comme un moyen de défense du champignon face à un agresseur microbiologique potentiel. Il a été ensuite montré (Juillard V. *et al.*, 1987) que les micro-organismes, notamment les bactéries lactiques, possèdent cette faculté de produire de nombreuses molécules actives.

Ces molécules apparemment sans intérêt, peuvent constituer un avantage dans le milieu où se développe le micro-organisme (Dessaux Y. *et al.*, 2004). C'est ainsi que de nouvelles molécules pharmacologiquement actives sont isolées (Guezennec J., 2004).

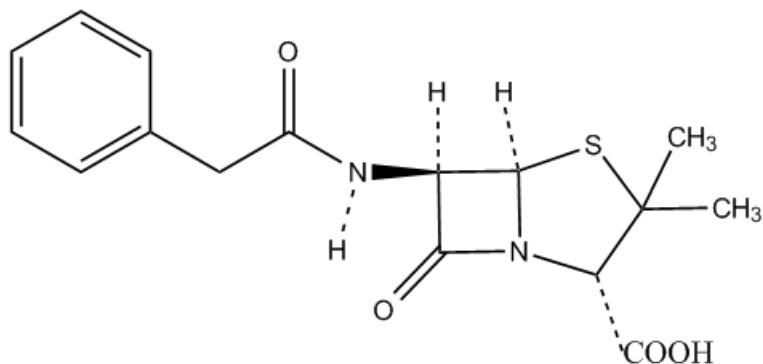


Figure 3-1. Structure de la pénicilline

Le nombre de molécules actuellement disponibles a imposé de répartir les antibiotiques en différentes classes. Les modes de répartition sont multiples : structure chimique, mode d'action, spectre d'activité ou cible(s) bactérienne(s).

Le mode de classification le plus simple repose sur la structure chimique des molécules. Il est ainsi possible de générer 9 groupes d'antibactériens utilisés en médecine vétérinaire, sur le cheptel laitier (**Tableau 3-1**).

Les antibiotiques peuvent aussi être classés selon qu'ils présentent une action bactériostatique (stabilisation de la croissance des bactéries : inoculum bactérien identique à l'inoculum initial après un contact de 18 à 24 heures avec l'antibiotique) ou bactéricide (destruction ou réduction significative de l'inoculum bactérien : diminution d'un inoculum de $105 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ [UFC : unité formant colonie] à un inoculum de $102 \text{ à } 103 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ après un contact de quelques heures avec une concentration donnée de l'antibiotique reconnu comme bactéricide) (Bergogne-Bérézin E., 2001). Pratiquement, un antibiotique bactéricide est nécessaire pour éradiquer complètement une infection grave ou présentant un inoculum important. Il est possible de distinguer les deux catégories en comparant la concentration minimale inhibitrice (CMI) à la concentration minimale bactéricide (CMB) : un antibiotique

bactéricide est un antibiotique pour lequel la CMB est sensiblement égale à la CMI. Par contre, l'antibiotique est dit bactériostatique lorsque la CMB est largement supérieure à la CMI. Cela signifie que la concentration en antibiotique au site d'infection n'est pas suffisante pour atteindre la valeur de la CMB.

Tableau 3-1. Classement des antibiotiques selon leur structure chimique (Heeschen W.H. & Blüthgen A., 2001)

Famille	Sous groupes	Représentant
Carbohydrates	Aminoglycosides	Streptomycine
	Autres glycosides (N- et O-)	Néomycine
Lactones macrocycliques	Macrolides	Erythromycine
	Polyènes	Amphotéricine
	Macrolactames	Oliomycine
Quinones et similaires		Tétracyclines
Peptides		Pénicillines – Céphalosporines – Bacitracine – Polymyxines
Hétérocycles contenant N	Hétérocycles simples	Pas d'importance pratique
	Hétérocycles multiples	
Hétérocycles contenant O	Dérivés « Furanes »	
	Dérivés « Pyranes »	Pas d'importance pratique
Alicycliques	Dérivés cycloalcanes	
	Petits terpènes	Streptovitacines
	Oligoterpènes	
Aromatiques	Composés benzéniques	Chloramphénicol
	Aromatiques multiples	Griséofulvine
	Aromatiques non benzénoïques	Novobiocine
Aliphatiques	Dérivés « Alcanes »	
	Dérivés de l'acide carbocyclique	Variotine

Cependant, il n'est pas toujours aisé de faire la distinction entre bactériostase et bactéricidie. En effet, la réponse est fonction de la concentration en agent antibiotique mais aussi de la nature du germe et de sa teneur. Ainsi, les antibiotiques du groupe des macrolides, bactériostatiques sur la plupart des gram-positives présentent une activité bactéricide sur *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme. L'importance des concentrations est démontrée dans des études où un inoculum donné est mis en présence de différentes concentrations en antibiotiques et où des comptages sont effectués après différents temps d'incubation (Bergogne-Bérézin E., 2001).

Le nombre et la nature des espèces bactériennes sensibles à un antibiotique donné définissent son spectre d'activité. La répartition entre le groupe des antibiotiques à large spectre (exemple : céphalosporines de 3^{ème} génération) et le groupe des antibiotiques à spectre étroit (exemple : glycopeptides) évolue. En effet, la synthèse de nouveaux dérivés peut élargir le spectre d'activité d'un groupe d'antibiotiques. Un exemple de cet élargissement de spectre d'activité concerne les aminopénicillines actives sur les bactéries gram-négatives et synthétisées à partir de la pénicilline G, un β -lactame à spectre étroit. Il en va de même lors de l'étude de l'activité d'un antibiotique donné sur de nouvelles bactéries (Bergogne-Bérézin E., 2001).

Un autre mode de classement repose sur les cibles bactériennes des antibiotiques. En effet, l'antibiotique doit présenter une action spécifique sur le germe visé. Il devra donc porter atteinte au métabolisme procaryote (voie métabolique essentielle ou cible spécifique) sans porter préjudice aux cellules eucaryotes de l'hôte (voie métabolique absente ou peu active).

Les mécanismes régissant l'action des antibactériens ne sont pas encore, à l'heure actuelle, parfaitement expliqués (Euzéby J.P., 2009). Cinq grands modes d'action sont cependant mis en évidence : synthèse du peptidoglycane, membrane cytoplasmique, ADN, synthèse des protéines et inhibition compétitive sont les cibles des antibactériens (**Figure 3-1**).

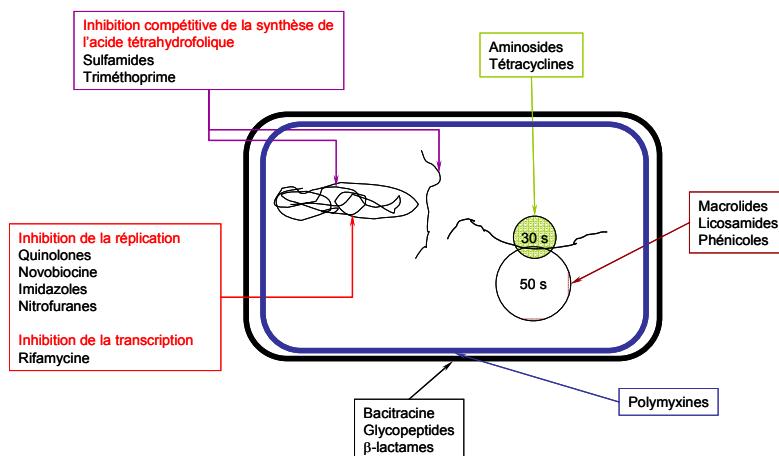


Figure 3-2. Sites d'actions des antibiotiques (Euzéby J.P., 2009)

3.2.2. Utilisation en élevage

L'utilisation des antibiotiques en élevage poursuit deux objectifs, l'un thérapeutique et l'autre zootechnique. L'objectif thérapeutique vise l'éradication d'une infection présente (but curatif) ou la prévention d'une infection possible lors d'un stress (but prophylactique) (Martel J.L. & Chaslus-Dancla E., 2000). L'objectif zootechnique résulte d'une observation faite au

début de l'utilisation des antibiotiques : de faibles quantités de ces substances ajoutées à l'alimentation permettaient d'accroître le gain de poids des animaux ainsi traités (Martel J.L. & Chaslus-Dancla E., 2001).

3.2.2.1. Usage thérapeutique

Dès la fin des années quarante, le traitement de mammites préconise l'utilisation d'antibiotiques (Barker C.A., 1945 – Schofield F.W., 1946 – Benson D.V., 1947 – Benson D.V., 1948 – Bryan C.S., 1951). A cette époque déjà, la problématique des résidus dans le lait produit était mise en évidence : les conséquences pour l'industrie laitière sont déjà évaluées (Katznelson H. & Hoods E.G., 1949 – Bryan C.S., 1951 – Johns C.K., 1953).

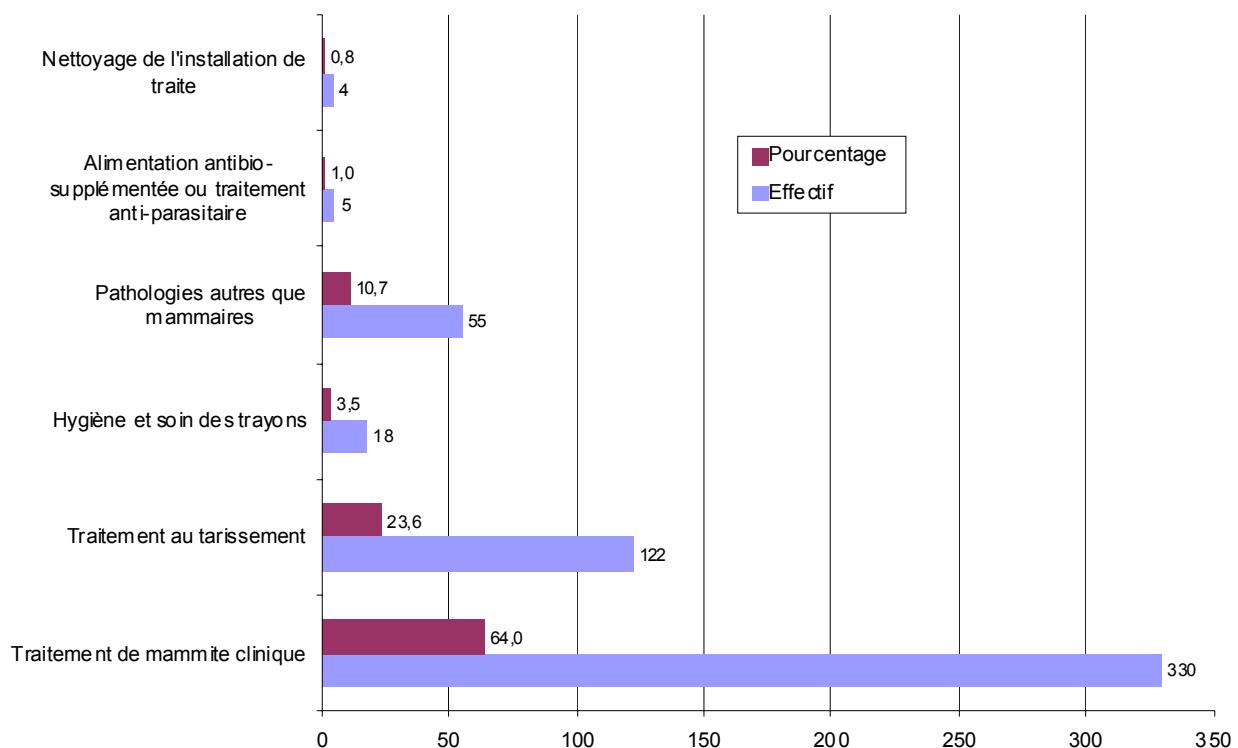


Figure 3-3. Identification de l'origine de la contamination (Fabre J.M. *et al.*, 1995)

Parmi les infections bactériennes les plus couramment rencontrées en élevage laitier, on retrouve notamment les mammites, les endométrites, les pneumonies, des problèmes au niveau du système digestif, les boiteries et aussi les encéphalites (Hady *et al.*, 1993). En raison de l'injection directe dans le pis, le traitement des mammites (en période de lactation ou lors des traitements au tarissement) représente le plus gros risque en matière de résidus. Ainsi, Fabre J.M. *et al.* présentaient en 1995, lors d'un Symposium de la Fédération Internationale de Laiterie consacré aux inhibiteurs dans le lait, les résultats d'une étude menée dans un millier de fermes françaises sur les origines de la contamination du lait (**Figure 3-3**).

Les pourcentages donnés dans cette étude rejoignent les pourcentages obtenus par d'autres auteurs : en 1986, Booth J.M. & Harding F. signalaient que 52 % des résultats positifs étaient dus à des traitements de mammites et que 27 % correspondaient à des traitements au tarissement. Dans ce cadre, l'effectif étudié était de 7500 fermes. Toutes les molécules décrites ne sont cependant pas utilisées en usage intra-mammaire. Ainsi, dans le Compendium des spécialités pharmaceutiques à usage vétérinaire (Claesens P., 1993), seules 27 préparations sont à usage intra-mammaire alors que 137 sont destinées aux autres applications (tous animaux confondus).

3.2.2.2. Usage zootechnique

Les antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance constituent une large partie du marché des antibiotiques. Ainsi, Prescott J.F. (1997)⁹ rapportait que 40 % de la production des antibiotiques des USA étaient destinés à l'alimentation animale (dont 55 % de la production de pénicilline G et 60 % de la production des tétracyclines).

L'effet « promoteur de croissance » des antibiotiques a été décrit lorsque des poulets consommant des résidus de production de tétracycline ont présenté un meilleur taux de croissance (Stokes E.L.R. & Jukes T.H., 1950). Depuis, les effets de doses sub-thérapeutiques ont largement été étudiés, avec dès 1969, la parution en Europe d'un rapport (Schwann M.M., 1969) mettant en garde contre l'usage inadapté des antibiotiques en alimentation animale et les risques potentiels pour la santé humaine. Ce rapport a eu comme conséquence de limiter l'usage des antibactériens en Europe et en Australie, contrairement aux USA où ils restent largement utilisés. Les conclusions de ce rapport recommandaient notamment de limiter l'usage en élevage à des molécules peu voire pas utilisées en médecine humaine ou vétérinaire. C'est ainsi que la pénicilline ou les tétracyclines ont rapidement été éliminées de l'alimentation animale dans les pays suivant les recommandations du rapport Swann. Il faut cependant attendre l'interdiction de l'usage des antibiotiques comme promoteur de croissance en Suède en 1986 (Commission on Antimicrobial Feed Additives, 1997). Le Danemark a suivi la Suède en interdisant l'usage de l'avoparcine (1995) lorsque des entérocoques résistant à la vancomycine ont été mis en évidence dans des élevages de poulets ou de porc recevant une alimentation antibio-supplémentée en avoparcine (Danish Veterinary Laboratory, 1995). L'Allemagne a suivi le mouvement en 1996. Le principe de précaution a

⁹ PRESCOTT J.F. (1997). Antibiotics : miracle drugs or pig food ? *Can. Vet. J.* **38**, 763-766 – cité par Barton M.D., 2000

conduit l'UE à éliminer de l'alimentation animale, l'avoparcine en 1997¹⁰ et d'autres molécules (virginiamycine, tylosine phosphate, spriamycine et bacitracine zinc) en 1999¹¹.

Le mode d'action des antibiotiques comme promoteurs de croissance est mal connu. En effet, les concentrations mises en œuvre sont généralement inférieures aux doses thérapeutiques mais elles peuvent par contre être supérieures aux concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les molécules présentes peuvent alors avoir un effet sur la flore intestinale : destruction de pathogènes, réduction de la production de toxines bactériennes, limitation de l'utilisation des nutriments par la flore indésirable, etc. ... (Prescott J.F. & Baggot J.D., 1993)¹². Cet effet est cependant plus marqué sur des animaux vivants dans un environnement d'une qualité hygiénique médiocre.

Les antibiotiques, donnés aux animaux comme promoteurs de croissance, doivent garantir une meilleure rentabilité au producteur (Taylor D.J., 1999). Ce gain de productivité se traduit notamment par une augmentation du taux de croissance (Thomke S. & Elwinger K., 1997). D'autres effets se font sentir sur la présence de germes tels que salmonella (Gustafson R.H. & Bowen R.E., 1997), campylobacters, listeria (Gutzman F. *et al.*, 1976 – Barrow P.A., 1989 – Corpet D.E., 1996) ou *Enterococcus faecium* ou *Enterococcus gallinarum* (Kaukas A. *et al.*, 1988).

Une réduction des rejets en N et en P a été constatée par différentes équipes (Roth F.X. & Kirchgessner M., 1994 – Verbeke W. & Viaene J., 1996 - Gropp J.M. & Shumacher A., 1997) après usage d'antibiotiques.

3.2.3 Utilisation en agriculture

Il peut paraître étonnant d'aborder l'usage des antibiotiques en agriculture, mais le potentiel de ces molécules a été reconnu par les phytopathologistes dès leur découverte. Ainsi, durant les années cinquante, une quarantaine d'antibiotiques ont été évalués pour la protection des plantes (Goodman R.N., 1959)¹³. Cependant, au vu du coût particulièrement élevé de ce

¹⁰ Réglementation européenne (1997) - avoparcine

¹¹ Réglementation européenne (1999) – tylosine, bacitracine, virginiamycine, spiramycine

¹² PRESCOTT J.F. & BAGGOT J.D. (1993). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 2^{ème} ed. 564-565. Ames, IA : Iowa State University Press – cité par McManus P.S. *et al.*, 2002

¹³ GOODMAN R.N. (1959). The influence of antibiotics on plants and plants disease control. In *Antibiotics : their chemistry and non-medicated uses*, ed. HS Goldberg 322-448. Princeton : van Nostrand – cité par McManus P.S. *et al.*, 2002

type de composés, les antibiotiques ne sont utilisés que sur des fruits à haute valeur ajoutée ou sur des plantes ornementales (Mc Manus P.S. *et al.*, 2002).

L'application des antibiotiques en agriculture se fait sous la forme d'une poudre constituée d'environ 20 % de substance active qui sera solubilisée dans l'eau pour atteindre des concentrations de l'ordre de 50 à 300 mg·L⁻¹. Cette solution sera ensuite pulvérisée sur les plantes ou sur les organes de plantes cibles. Le nombre de molécules utilisé pour cet usage est relativement restreint par rapport aux antibiotiques utilisés en médecine, humaine ou vétérinaire. Ainsi, quatre composés apparaissent comme moyen de lutte contre certaines maladies bactériennes, notamment le feu bactérien.

Tableau 3-2 : Utilisation des antibiotiques en production végétale

Molécule	Culture	Germe	Pathologie
Streptomycine	Roses	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Gale
	Pommes – Poires	<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien
	Fleurs coupées – Semences de pomme de terre	<i>Pectobacterium spp</i>	Pourriture
	Tabac	<i>Peronospora tabacina</i>	Moisissure bleue
	Céleri	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Feu bactérien
	Pommes – Poires – Arbres d'ornement	<i>Pseudomonas syringae</i>	Tâches sur les fruits – Chancre bactérien
	Tabac	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Tâches foliaires brunes
	Poivre – Tomates	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tâches bactériennes
Oxytétracycline	Pommes – Poires	<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien
	Pêches – Nectarines	<i>Xanthomonas arobricola</i>	Tâches bactériennes
Gentamicine	Pommes – Poires	<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien
	Productions végétales	<i>Erwinia – Pectobacterium – Pseudomonas – Ralstonia – Xanthomonas</i>	Maladies bactériennes
Acide oxolinique	Pommes – Poires	<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien

Depuis son introduction comme moyen de protection des cultures, la streptomycine est ainsi le premier antibiotique utilisé aux USA contre le feu bactérien *Erwinia amylovora* (Mc Manus P.S. *et al.*, 2002). En Europe, son usage est en principe interdit en productions végétales. L'Allemagne et l'Autriche ont cependant accordé des dérogations spéciales à ce principe lors de situations d'urgence avérée (OFAG, 2009).

Dans les zones (USA) où *Erwinia amylovora* est devenu résistant à la streptomycine, l'oxytétracycline peut être employée sous certaines conditions. Cette molécule est aussi utilisée dans les pays d'Amérique latine pour contrôler le feu bactérien et d'autres infections bactériennes. Il en est de même pour la gentamicine et l'acide oxolinique.

En globalisant les données publiées par Mc Manus P.S. *et al.* (2002), il est possible de synthétiser l'usage des antibiotiques en agriculture (**Tableau 3-2**).

L'apparition de bactéries résistantes notamment à la streptomycine, a amené les arboriculteurs à trouver d'autres moyens de lutte contre les maladies bactériennes. Ainsi, la streptomycine, autorisée aux USA pour contrôler la présence de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sur poivre ou tomate, n'est plus utilisée en raison de la résistance de la souche bactérienne à cet antibiotique. En effet, cette résistance, mise en évidence dès les années 1960, est maintenant largement répandue, rendant l'usage de la streptomycine inadéquat (Stall R.E. & Thayer P.L., 1962¹⁴ - Minsavage C.V. *et al.*, 1990¹⁵). Il en est de même pour la résistance à la streptomycine de *Erwinia amylovora*, résistance apparaissant aussi dans des zones où aucun traitement n'avait jamais été appliqué. C'est ainsi que l'apparition de la résistance du feu bactérien à la streptomycine mise en évidence au Liban est manifestement liée à la dissémination de souches provenant d'Israël où de nombreux traitements ont été appliqués (Mc Manus *et al.*, 2002).

Pour réduire l'émergence des résistances aux antibiotiques et maintenir l'efficacité des traitements en productions végétales, il serait intéressant d'envisager d'autres voies, par exemple en intégrant des composés naturels dans les moyens de lutte. L'utilisation de ces composés naturels conduit notamment en arboriculture fruitière, à l'induction d'une résistance systémique (Lateur M., 2002).

3.2.4. Pharmacocinétique des antibiotiques

La pharmacocinétique est l'étude du devenir du médicament dans l'organisme. Les quatre phases de la pharmacocinétique sont généralement regroupées sous le sigle ADME (**Figure 3-4**) : **Absorption** (pénétration) du produit dans l'organisme, **Distribution** du produit dans les tissus de l'organisme, **Métabolisme** (transformation) du produit en de nouvelles entités chimiques

¹⁴ STALL R.E. & THAYER P.L. (1962). Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis. Rep.* **46**, 389-392 – cité par McManus P.S. *et al.*, 2002

¹⁵ MINSAVAGE G.V., CANTEROS B.I. & STALL R.E. (1990). Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* **80**, 719-723 – cité par McManus P.S. *et al.*, 2002

grâce aux enzymes de l'organisme et **Excrétion** (élimination) du produit de l'organisme dans les urines, les fèces et le lait sous la forme de la molécule parent ou sous la forme de métabolites (Debackere M., 1995).

L'application d'antibiotiques peut se faire selon différentes voies : orale ou parentérale pour avoir un effet systémique, intra-mammaire ou intra-utérine pour avoir un effet local. La voie d'application intra-mammaire est particulièrement importante pour la contamination du lait par des résidus de molécules actives.

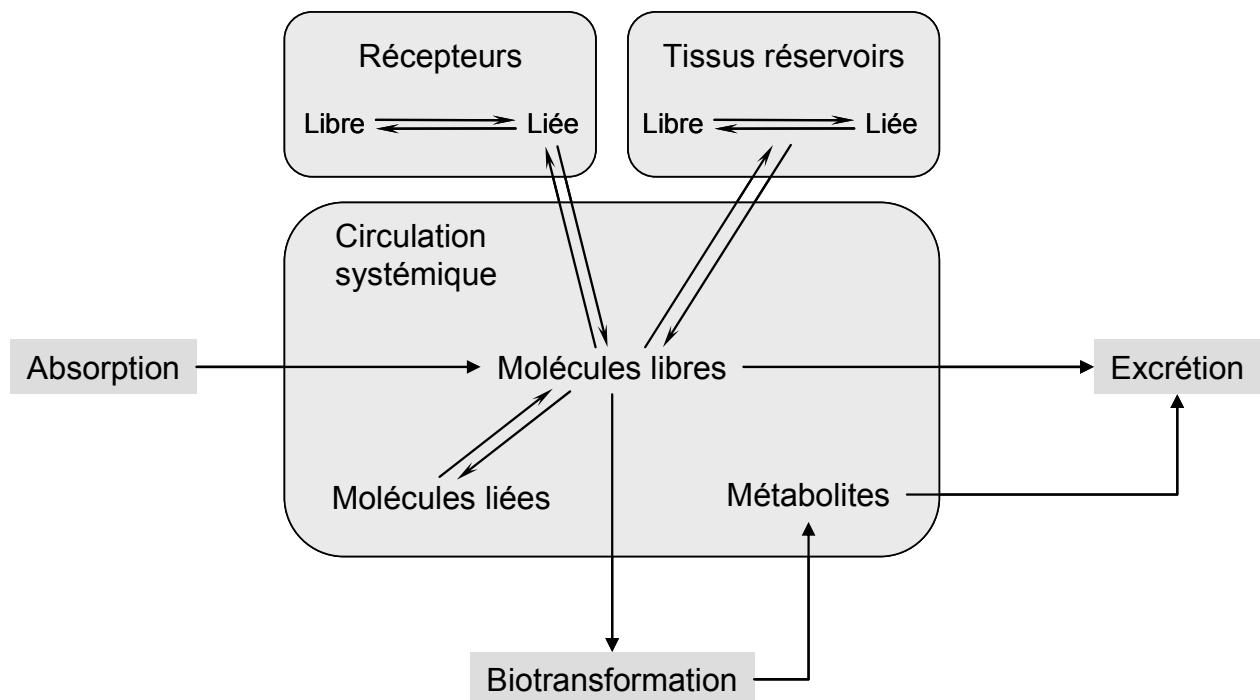


Figure 3-4. Phases de la pharmacocinétique (ADME) (traduit de Debackere M., 1995)

Seule la dernière étape de la pharmacocinétique est importante pour la recherche des résidus dans le lait. Cependant, la connaissance des différents équilibres régissant la répartition des molécules entre les tissus va conditionner le choix de la formulation du médicament et son mode d'administration pour atteindre le but premier de tout traitement : obtenir un effet thérapeutique dans un tissu cible. Pour mener à bien le traitement, quatre modes d'application peuvent être définis : deux voies systémiques (orale et parentérale) et deux voies locales (intra-mammaire et intra-utérine). Les deux voies systémiques seront envisagées simultanément, leur mode d'élimination reposant sur les mêmes principes, les deux voies locales seront par contre envisagées successivement, l'application intra-mammaire étant directement responsable de contamination du lait.

3.2.4.1. Administration orale ou parentérale

Les administrations orale et parentérale imposent le passage des molécules à travers différentes parois biologiques. Le passage de ces membranes repose notamment sur l'affinité des molécules pour l'un ou l'autre compartiment. Cette affinité prend en compte le pH du milieu. Cette influence du pH conduit à une modification de la répartition des molécules en cas de mammite. Ainsi, les antibiotiques faiblement acides seront présents dans le lait à des concentrations plus faibles que dans le sérum, contrairement aux antibiotiques faiblement basiques dont la concentration sera plus élevée dans le lait. Dans le cas de lait mammiteux, ces répartitions seront modifiées (Debackere M., 1995).

Lors de la validation d'une méthode analytique de détection des tétracyclines, Fletouris *et al.* (1990) ont ainsi montré que l'oxytétracycline administrée en une dose unique de $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de poids corporel s'éliminait dans le lait pendant environ 100 heures après l'injection. Les résultats obtenus par Rule *et al.* (2001) sur chèvre après injection intra-musculaire de $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de la même molécule confirment ces données. Des résidus de procaïne pénicilline G ont été mis en évidence par méthode microbiologique dans le lait durant près de 100 heures après différents traitements appliqués (de 7.000 à $28.000 \text{ UI} \cdot \text{kg}^{-1}$ de poids vif) par voie intra-musculaire. Les mêmes traitements appliqués par voie sous-cutanée ont conduit à la mise en évidence de résidus pendant plus de 130 heures (Dubreuil *et al.*, 2001). Ces résultats montrent l'importance du mode d'administration et de la dose injectée mais aussi la difficulté de transposer les données. Il est cependant difficile de comparer ces résultats avec d'autres, les volumes de lait produit étant inconnus. Si la comparaison est intéressante en terme de concentration, elle l'est aussi en terme de quantité éliminée : la quantité d'antibiotique excrétée peut difficilement être supérieure à la quantité d'antibiotique injectée.

3.2.4.2. Administration intra-utérine

Les données relatives à l'excrétion des antibiotiques après application intra-utérine sont rares et incomplètes. Il ne faut cependant pas éliminer le risque de contamination après ce type de traitement (Romnee J.M., 2007). Des résidus de sulfamides ont pu ainsi être détectés et dosés dans du lait après traitement par un médicament à base de sulfadimidine et de chloramphénicol (**Figure 3-5**).

En ce qui concerne les antibiotiques à noyau β -lactame, et plus particulièrement la pénicilline, un traitement de $2.000.000 \text{ UI}$ de pénicilline G conduit généralement à des résidus dans le lait pendant 24 heures au plus. Cependant, des cas particuliers ont été rapportés et ont

montré que le lait pouvait être contaminé jusqu'à 80 heures après l'application du traitement (Bishop J.R. *et al.*, 1984 – Haaland M.A. *et al.*, 1984). Après un traitement de ce type, il est donc recommandé de tester le lait avant de le collecter et de le livrer à un acheteur potentiel.

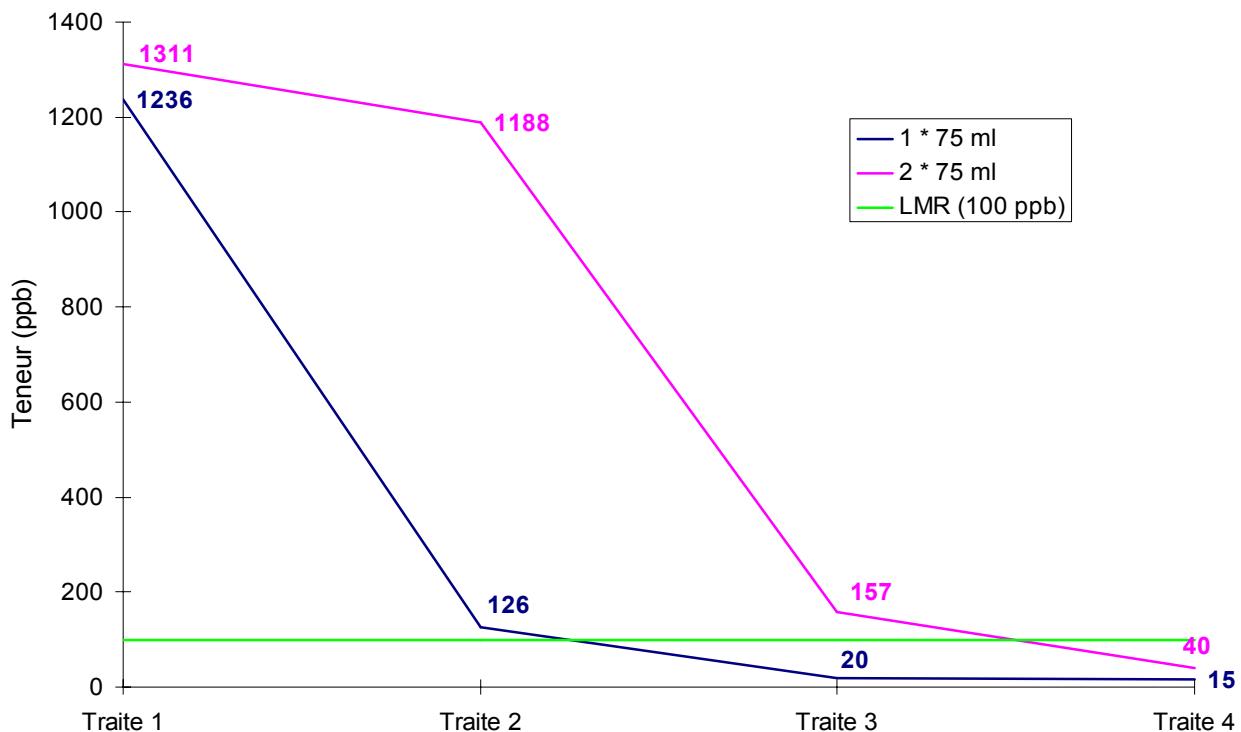


Figure 3-5. Elimination de la sulfadimidine dans le lait après traitement intra-utérin (dose appliquée : 1 * 75 mL et 2 * 75 mL)

3.2.4.3. Administration intra-mammaire

Ce type d'administration représente le risque le plus important en terme de contamination du lait. En effet, l'infusion directe dans le pis conduit, lors de la traite, à la présence massive de résidus dans le lait.

3.2.5. Pharmacodynamique des résidus d'antibiotiques dans le lait

Les effets pharmacodynamiques des résidus d'antibiotiques peuvent être divisés en plusieurs classes : santé du consommateur, technologiques, dispersion de molécules pharmacologiquement actives et finalement, économiques.

3.2.5.1. Santé du consommateur

Les risques rencontrés par le consommateur sont classés en deux catégories : allergies et antibiorésistance. Si le risque d'allergie aux antibiotiques à noyau β -lactame ou aux sulfamides

est connu (Wicker *et al.*, 1969 – Lindemayr *et al.*, 1981), il apparaît cependant que les concentrations en antibiotique potentiellement présentes dans le lait ne peuvent induire l'apparition d'une allergie.

Le risque lié à l'apparition d'antibiorésistance reste préoccupant. En effet, l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et en médecine vétérinaire conduit immanquablement à la sélection de bactéries résistantes (Schwarz S. et Chaslus-Dancla E., 2001). Le risque d'antibiorésistance consécutif à un usage massif d'antibiotiques en élevage est donc bien réel.

Il est possible de faire la distinction entre résistance naturelle et résistance acquise. Ainsi, la résistance naturelle peut être comprise comme étant une insensibilité aux antibiotiques, faisant partie du matériel génétique propre à un genre ou à une espèce bactérienne. La résistance acquise représente, quant à elle, l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre le germe insensible à une molécule ou à un groupe de molécules. Cette modification peut être obtenue soit par mutation au niveau d'un chromosome, soit par transfert d'ADN (plasmides ou transposons). La résistance inclut trois types de mécanismes : modification de la cible de l'antibiotique, synthèse d'enzymes capables d'inactiver les antibiotiques ou diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques. La présence d'une enzyme, par exemple une pénicillinase rendant résistant aux pénicillines, peut être d'origine naturelle (résistance de Klebsielles aux aminopénicillines) ou acquise (production d'une pénicillinase plasmidique chez les entérobactéries) (Yala D. *et al.* 2001).

La dynamique de la résistance est avant tout fonction des antibiotiques utilisés mais elle dépend aussi d'autres facteurs parmi lesquels une prédisposition génétique, l'échange de gènes de résistance et leur fonctionnalité chez différentes bactéries hôtes et la pression de sélection, notamment. Le transfert de la résistance acquise au niveau de l'agriculture vers l'homme a cependant pu être établie (Rhodes G. *et al.*, 2000).

3.2.5.2. Risques technologiques

L'industrie de transformation laitière s'est sensibilisée à la présence des résidus d'antibiotiques dès l'utilisation de ces molécules en élevage laitier. Ainsi, dès le début des années cinquante, des études ont montré l'importance de la sensibilité des starters industriels à la présence de résidus inhibiteurs (Katzenelson H. & Hoods E.G., 1949 – Bryan C.S., 1951 – Johns C.K., 1953).

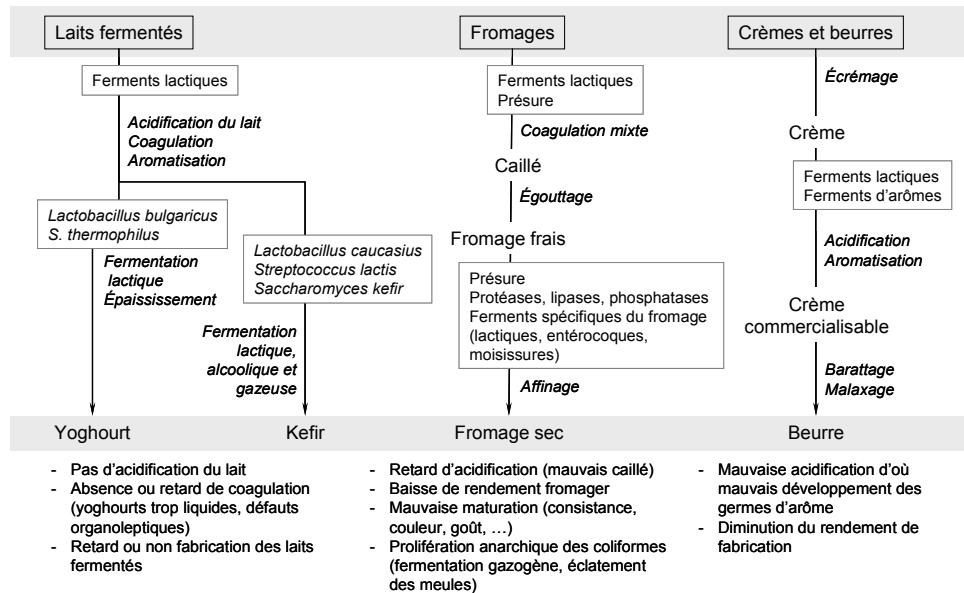


Figure 3-6. Obtention de produits laitiers fermentés et conséquences de la présence de résidus d'antibiotiques (Form G., 2003)

L'activité des résidus présents dans le lait peut se révéler à différents endroits du processus technologique. Différents types de produits laitiers peuvent être obtenus après fermentation (**Figure 3-6**).

Tableau 3-3. Sensibilité de souches technologiques à la pénicilline (Albrigth J.L. *et al.*, 1961 – Form G., 2003)

Souche bactérienne	Propriétés	Concentration en pénicilline inhibant la croissance (UI·mL ⁻¹)
<i>Streptococcus cremoris</i>	Coagulation spontanée	0,05 – 0,10
<i>Streptococcus lactis</i>	Coagulation spontanée	0,10 – 0,30
Starters Streptococci		0,10
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Acidification et maturation (spécifique des yoghurts)	0,01 – 0,05
<i>Streptococcus faecalis</i>		0,30
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Acidification - viscosité	0,30 – 0,60
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		0,30 – 0,60
<i>Lactobacillus caucasius</i>	Fermentation du kéfir	
<i>Lactobacillus casei</i>	Maturation des fromages	0,30 – 0,60
<i>Lactobacillus lactis</i>	Maturation des fromages et acidification	0,25 – 0,50
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Maturation des fromages et acidification	0,25 – 0,50
<i>Lactobacillus citrovorum</i>	Ferment d'arôme (crèmerie et beurrerie)	0,05 – 0,10
<i>Propionibacterium shermanii</i>		0,05 – 0,10

Les souches bactériennes mises en œuvre dans les processus technologiques sont particulièrement sensibles aux résidus de médicaments vétérinaires, et plus spécifiquement aux

résidus des antibiotiques à noyau β -lactame (**Tableau 3-3**), ce qui expliquent les premiers développements des tests directement axés sur ce type de molécules.

L'impact de la présence de ces résidus se traduit généralement au niveau de la mortalité de la souche (bactéricidie) ou au niveau de la production d'acide (Keys J.E. *et al.*, 1979).

3.2.5.3. Risques environnementaux

Les risques environnementaux concernent indirectement d'autres risques. En effet, les résidus de substances pharmacologiquement actives peuvent être disséminés dans l'environnement selon différents voies (**Figure 3-7**). Ce schéma, adapté de Boxall A.B.A. *et al.* (2003) ne prend en compte que la dissémination des résidus de médicaments vétérinaires. En effet, il est indispensable de le compléter par l'apport des résidus issus de la médecine humaine (Halling-Sørensen B. *et al.*, 1998).

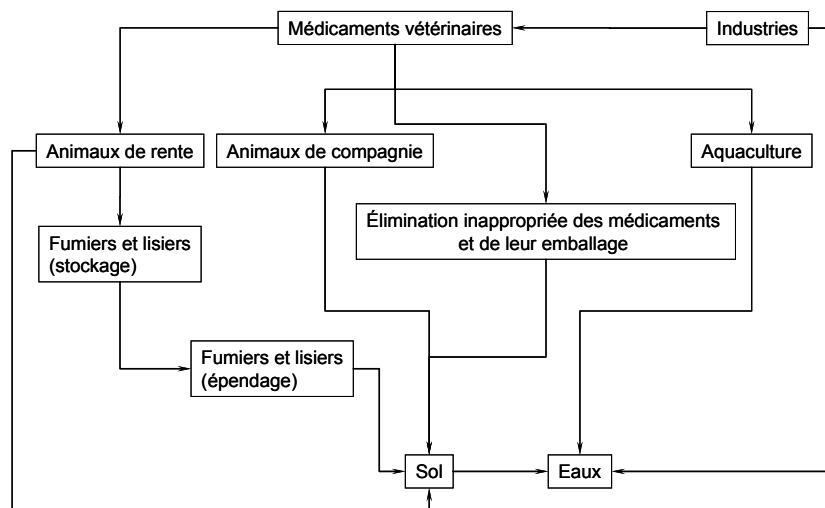


Figure 3-7. Voies de dissémination des résidus d'antibiotiques dans l'environnement

De nombreuses études ont montré que l'impact environnemental de ces résidus est loin d'être négligeable (Halling-Sørensen B., 2001 – Ingerslev F. *et al.*, 2001 – Halling-Sørensen B. *et al.*, 2002 – De Liguoro *et al.*, 2007 – Kemper N., 2008). Ainsi, l'oxytétracycline contamine fortement les sols par ses interactions notamment avec la matière organique (Jones A.D. *et al.*, 2005), conduisant notamment à l'apparition et au maintien de bactéries résistantes (Halling-Sørensen B. *et al.*, 2002 – Schmitt H. *et al.*, 2005).

La contamination environnementale peut prendre des voies particulières. Ainsi, Hamscher G. *et al.* (2003) ont montré que la poussière provenant d'élevages de porc pouvait contenir des résidus antibiotiques à des concentrations non-négligeables, entraînant ainsi une

contamination de l'environnement mais présentant aussi un risque supplémentaire pour le personnel employé dans ces élevages.

3.2.5.4. Conséquences financières

Pour le producteur laitier, la présence d'antibiotique dans le lait livré à l'industrie constitue un risque particulièrement important. La détection de résidus inhibiteurs se traduit directement par une pénalisation financière : une amende de 0,2975 € par litre de lait pour la livraison incriminée ainsi qu'une suspension de livraison, avec les conséquences que cela peut avoir sur la vie de l'exploitation (Dehareng F., 2007). Cette notion de pénalisation a évolué avec la législation relative au contrôle de la qualité du lait livré à l'industrie. En Belgique, à partir du 1^{er} octobre 1994, le contrôle du lait était effectué deux fois par mois, de manière aléatoire, pour le paramètre « Antibiotiques ». Le résultat positif à l'un de ces contrôles se traduisait par une pénalisation de 2,48 € par 100 litres de lait livré durant le mois au cours duquel la contamination était constatée (1 franc belge par litre de lait). En cas de récidive endéans les six mois, espacée de six jours de la première infraction, cette pénalisation était doublée. A partir du 1^{er} octobre 2000, la fréquence de contrôle est passée à toutes les livraisons, augmentant ainsi le risque d'un résultat positif lors d'une contamination consciente ou inconsciente. Le tarif de pénalisation a été adapté et est passé à 29,75 € par 100 litres de lait pour la livraison contaminée.

Pour le transformateur, la présence de résidus dans le lait entraîne la perte de matière première. Cette perte est liée à l'interdiction de manipuler et à fortiori d'utiliser un lait contenant des résidus de substances pharmacologiquement actives à des teneurs supérieures aux LMR : un camion dont le résultat de contrôle à l'entrée de l'usine est positif devrait être détruit. De plus, la présence de résidus inhibiteurs peut entraîner la perte d'une quantité importante de matière première mise à fermenter dans le but de produire fromage ou yaourt.

3.2.6. Aspects économiques

Les agents antimicrobiens utilisés pour traiter ou prévenir les infections bactériennes chez les animaux appartiennent aux mêmes classes que les antibiotiques utilisés en médecine humaine. La répartition des molécules utilisées en Europe, en médecine vétérinaire (usage thérapeutique), pour l'année 1997 (**Tableau 3-4**) montre que, sur un total de 3.494 tonnes d'agents antimicrobiens produits, près deux tiers sont représentés par les tétracyclines (2.294 tonnes).

Tableau 3-4 : Répartition des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire (usage thérapeutique) pour l'année 1997 en Europe, y compris la Suisse - FEDESA¹⁶

	Tonnes de molécule active à 100 % de pureté	Pourcentages
Pénicillines	322	9,21
Tétracyclines	2.294	65,65
Macrolides	424	12,14
Aminoglycosides	154	4,41
Fluoroquinolones	43	1,23
Triméthoprime – Sulfamides	75	2,15
Autres agents antibactériens	182	5,21
Total	3.494	100,00

Les 182 tonnes restantes comprennent les céphalosporines, les amphénicoles, les lincosamides, les polypeptides, les nitrofuranes, les stéroïdes à activité antibiotique, les antibiotiques polyènes et les peuromutilines.

Certaines molécules, interdites d'usage sur les animaux destinés à la consommation humaine (chloramphénicol, nitrofuranes), restent utilisables sur les animaux de compagnie. A côté de ces molécules, 1.599 tonnes de substance à activité antimicrobienne ont été utilisées comme promoteur de croissance. Parmi ces substances, on retrouve des macrolides, des streptogramines et des polypeptides. La synthèse des données de la FEDESA montre que les antimicrobiens produits pour la santé humaine ne représentaient, en 1997, que 52 % du total des antimicrobiens produits (**Tableau 3-5**).

Dans ce tableau ne sont pas inclus les coccidiostatiques. Certaines de ces molécules devraient cependant apparaître puisqu'elles sont reprises dans les classes d'antibiotiques. Par exemple, le S-Mez®, contenant un sulfamide, est repris comme coccidiostatique pour les volailles alors que la même molécule active apparaît dans les antibiotiques pour les autres animaux.

Les premières données économiques correspondent au chiffre d'affaires relatif au marché du médicament vétérinaire. Ce marché représentait, en 1999, un chiffre d'affaires de près de 87 millions d'euros. Pour la même année, le marché du médicament à usage humain (ventes via les pharmacies ouvertes au public, ventes via les pharmacies hospitalières) représentait quant à lui un chiffre d'affaires de 2,57 milliards d'euros.

¹⁶ <http://www.fedesa.be/Antibio/Kit/kit3.htm>

Tableau 3-5 : Utilisation estimée des antimicrobiens pour l'année 1997 en Europe, y compris la Suisse – FEDESA¹⁷

Tonnes de molécule active à 100 % de pureté	Pourcentages
Médecine humaine	322
Thérapeutique vétérinaire	2.294
Additifs alimentaires ^a	424
Total antimicrobiens	154

^a : coccidiostatiques exclus

3.2.7. Détection

La détection des antibiotiques dans le lait répond à une obligation légale qui découle des risques inhérents à ce type de résidus.

Filière	Opération	Volume de lait concerné
Lait individuel	<i>Contrôle après traitement</i>	<i>Quelques litres</i>
↓		
Lait de tank	<i>Contrôle dans les Organismes interprofessionnels</i> <i>Monitoring de l'AFSCA</i>	<i>Quelques centaines de litres</i>
↓		
Lait de tournée	<i>Auto-contrôle de l'industrie</i> <i>Monitoring de l'AFSCA</i>	<i>Quelques milliers de litres</i>
↓		
Lait de silo de réception		<i>Quelques dizaines de milliers de litres</i>
↓		
Lait de silo de transformation		<i>Quelques centaines de milliers de litres</i>
↓		
Lait de consommation	<i>Monitoring de l'AFSCA</i>	

Figure 3-8. Structure de la filière laitière et contrôle des résidus d'antibiotiques

L'absence de résidus d'antibiotiques dans le lait est un critère prépondérant dans la détermination de la qualité du lait. Le contrôle, réalisé dans des organismes agréés (laboratoires chargés de la détermination de la qualité du lait livré aux acheteurs), repose sur des techniques qui peuvent être différentes selon l'endroit de la filière contrôlé. En effet, la teneur en antibiotiques dans le lait d'une vache traitée ne correspond pas du tout à la teneur qu'il est possible de retrouver dans un lait de commerce.

¹⁷ <http://www.fedesa.be/Antibio/Kit/kit3.htm>

Ainsi, un lait de commerce contenant de la pénicilline G à une teneur de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ peut provenir de la traite d'une vache contaminée par la même molécule à une teneur de l'ordre de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La filière laitière (Figure 3-8) montre que les facteurs de dilutions sont particulièrement importants tout au long de la filière et qu'ils influencent les moyens de détection à mettre en œuvre à chaque étape. En effet, les concentrations rencontrées dans le lait d'une vache traitée sont de loin supérieures à celles pouvant exister dans un lait de commerce. Il va de soi que les sensibilités des moyens de mises en évidence ne seront pas identiques à la ferme et lors du contrôle du lait de consommation (Figure 3-9).

Les trois modes de détection (microbiologique, rapides et physico-chimique) se retrouvent tout au long de la filière (Figure 3-9).

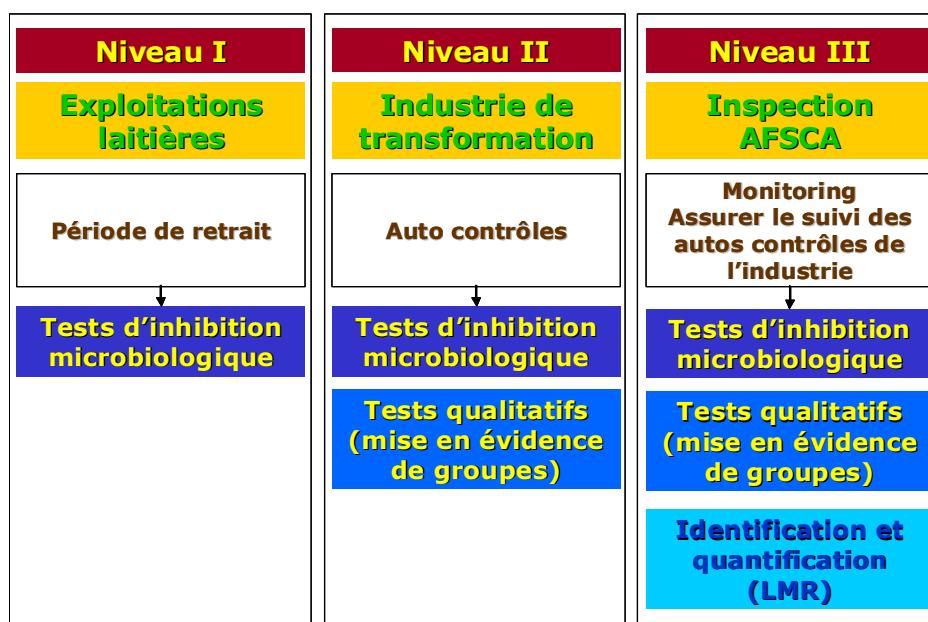


Figure 3-9. Moyens de contrôle mis en place aux différents niveaux de la filière

3.2.7.1. Méthodes microbiologiques

A une époque où la notion de résidus et de risques sanitaires n'était pas une priorité, les laiteries proposant des produits fermentés se devaient de contrôler la présence des agents perturbant la fermentation, soit en la retardant soit en l'inhibant totalement. Les premiers tests de mise en évidence reposaient donc sur une bactérie, *Streptococcus thermophilus*, utilisée pour la fabrication de yoghourt et particulièrement sensible à la présence de pénicilline dans le lait. D'autres tests, basés sur les propriétés mêmes de molécules à déceler, ont ainsi vu le jour. L'évolution de la détection des antibiotiques est illustrée de quelques dates importantes

(Tableau 3-6). Il est intéressant de constater que la sensibilisation à la présence de résidus reste relativement proche du début de l'utilisation des antibiotiques.

Basée sur l'inhibition de la souche bactérienne test, la présence de résidus inhibiteurs peut être mise en évidence au moyen de différents paramètres (Figure 3-10) : zone d'inhibition autour d'un disque de papier filtre, production d'acide lactique (révélée par la variation de coloration d'un indicateur de pH ou par la coagulation du milieu de culture contenant le lait) (Katz S.E. & Siewierski M., 1995).

Tableau 3-6. Evolution dans la détection des antibiotiques au début de leur utilisation (Romnee J.M., 2007)

Année	Événement
1929	Découverte de la pénicilline G
1935	Découverte de la sulfanilamide
1938	Utilisation de la sulfanilamide pour le traitement des mammites
1948	Utilisation de la pénicilline G pour le traitement des mammites
1951	Utilisation des antibiotiques comme additifs dans l'alimentation animale
1952	Développement d'un test de recherche des inhibiteurs dans le lait : <i>Bacillus subtilis</i>
1961	Développement du Br Test utilisant <i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>
1975	Développement du Delvotest P® utilisant <i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>
1978	Développement du Penzym® – test enzymatique
1981	Textes européens sur la pharmacie vétérinaire (Directives 81/851 et 81/852)
1990	Règlement européen sur les LMR (Règlement 2377/90)
1991	Proposition d'une méthode de détection utilisant <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> (Décision 91/180/CEE)

Les méthodes microbiologiques présentent quelques avantages qui leur permet d'être fréquemment utilisées comme méthodes de screening. En effet, simples et facilement automatisables, elles ne nécessitent qu'un équipement réduit.

Elles présentent aussi l'avantage non négligeables d'être peu onéreuses. Leur sensibilité permet la détection d'un nombre élevé de molécules sans toutefois avoir d'information sur la nature et la concentration de l'inhibiteur présent. La forme de la souche test utilisée conditionne aussi la sensibilité d'un test parfois totalement insensible à certains antibiotiques.

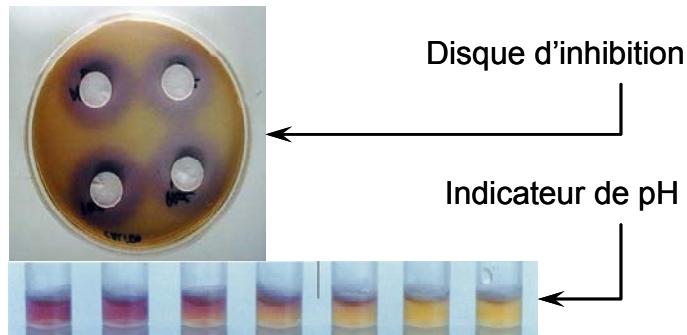


Figure 3-10. Révélation de l'inhibition bactérienne : zone d'inhibition et indicateur de pH

La nature biologique de la méthode conduit à rencontrer d'autres produits inhibiteurs potentiellement présents dans le lait (désinfectant ou inhibiteurs naturels présents dans le lait [Andrew S.M. *et al.*, 1997]). L'interprétation du résultat (une coloration, une coagulation) reste subjective si des moyens de lecture ne sont pas mis au point. C'est ainsi que, par souci d'objectivation de la lecture, le législateur belge a demandé à ce que les tests microbiologiques de routine utilisés dans un contexte légiféré soient accompagnés d'un système de lecture réflectométrique.

Ces différents tests microbiologiques font souvent l'objet d'études les mettant en comparaison (Seymour H.E. *et al.*, 1988^a – Van Eenennaam A.L. *et al.*, 1993 – Romnee J.M., 1995 – Contreras A. *et al.*, 1997 – Suhren G. & Beukers R., 1998 - Schlegelová J. & Ryšánek D., 2000 – Romnee J.M., 2007). Des études complémentaires permettent d'obtenir des informations supplémentaires quant à la nature des antibiotiques présents (ajout de pénicillinase ou de PABA) (Cullor J.S. *et al.*, 1994 – Gilberston T.J. *et al.*, 1995 – Medina M.B. *et al.*, 1998)

3.2.7.2. Détection rapide

La détection rapide des résidus est basée sur une réaction spécifique entre l'analyte à déceler et un récepteur. Ce dernier peut prendre la forme d'un anticorps, d'un « récepteur » ou la présence du complexe « analyte – récepteur » peut être révélée par une réaction de type enzymatique.

Ces kits de détection présentent l'avantage non négligeable de donner un résultat fiable en très peu de temps (de l'ordre de quelques minutes). Ils sont donc adaptés pour être utilisés lors du transfert des camions de collecte, à l'entrée d'usine ou directement à la ferme (Musser J.M.B. & Anderson K.L., 1999). De plus, ils sont spécifiques et sensibles, et ils permettent d'obtenir des résultats semi-quantitatifs.

Par contre, la manipulation de ces tests est plus lourde que pour les tests microbiologiques. Ils nécessitent donc un personnel plus qualifié. Leur coût est un frein à une utilisation à grande échelle. En effet, il faut autant de tests que de molécules à rechercher, ce qui engendrent des coûts de plus en plus élevés lors du contrôle. La révélation colorimétrique du complexe (Beta-Star, ROSA SMZ) ou par mesure d'émission radioactive (Charm Test II) permet d'obtenir une estimation précise de la contamination.

Avant leur utilisation ou leur commercialisation, des études sont consacrées à ce type de tests, permettant d'évaluer leurs performances par rapport aux tests officiels (Bell C. & Scanella D., 1994 – Bell C. *et al.*, 1995 – Scannella D. *et al.*, 1997 – Romnee J.M., 2008).

La concordance du résultat d'un test rapide, en l'occurrence le BetaStar, avec le résultat d'un test microbiologique (Delvotest MCS) peut confirmer l'information reçue lors de l'analyse de l'échantillon en l'absence et en la présence de pénicillinase (**Figure 3-11**).

Figure 3-11. Confirmation d'un résultat microbiologique par un test rapide (BetaStar)

Ces méthodes présentent un intérêt certain et il suffit pour s'en convaincre, de voir le nombre de présentations faites lors de séminaires tels que « *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk* » (FIL-IDF, 1995, Kiel Germany) ou « *EuroResidues VI* » (2008, Egmond aan Zee, The Netherlands).

3.2.7.3. Méthodes analytiques

Les résultats obtenus par les méthodes microbiologiques (non spécifiques, effet cumulé des antibiotiques présents, ...) ou par les méthodes rapides (trop spécifiques, coûteuses, ...) ont conduit les laboratoires à développer des méthodes analytiques de type chromatographique. De plus, le contrôle du respect des LMR impose l'identification du résidu et son dosage.

Dans le cadre des contrôles sur les résidus de médicaments vétérinaires effectués en application de la directive 96/23, un lait est impropre à la consommation dans trois cas :

- Lorsque la concentration mesurée est supérieure à la LMR, pour une substance ayant une limite maximale de résidus dans le lait;
- Lorsque des substances n'ayant pas de LMR fixées dans le lait sont mises en évidence, ce qui signifie l'utilisation de médicaments en dehors du résumé des caractéristiques du produit;
- Lorsque des substances listées en annexe IV du règlement 2377/90 sont mises en évidence, ce qui signifie l'utilisation de substances interdites chez l'animal.

L'application de cette directive est un défi pour les analystes chargés de vérifier la présence des résidus. Le contrôle de ces résidus sera parallèle à l'évolution des technologies. Dès les années 80, l'apparition de systèmes HPLC de plus en plus performants, couplés à des détecteurs efficaces (UV-DAD, Fluorescence, ...) va permettre l'explosion de méthodes mono-analyte (Bayo J. *et al.*, 1993 – Gerhardt G.C. *et al.*, 1994) ou dédiées à une famille de molécules (Carlqvist J. & Westerlund D., 1985 – Agarwal V.K., 1992 – Moats W.A. & Harik-Khan R., 1995 – Laloux J. *et al.*, 1996). Afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité de la détection, diverses dérivatisations ont été envisagées pour différents groupes : les sulfamides (Takeda N. & Ykiyama Y., 1992 – Edder P. *et al.*, 1997), les tétracyclines (Pena A.L.S *et al.*, 1999) et les antibiotiques du groupes des b-lactames (Lal J. *et al.*, 1994 – Kubalec *et al.*, 1997).

La philosophie mise en œuvre dans ces déterminations restait proche de la celle des tests rapides : une molécule (ou une famille), une méthode. Cela limitait sensiblement l'utilisation de l'analytique dans le contrôle. De plus, les critères nécessaires à la confirmation des molécules faisaient souvent défaut.

Le couplage de la spectrométrie de masse au chromatographe liquide a permis de résoudre, dès les années 90, ce défi. Ces développements ont vu un nombre croissant de méthodes visant à déterminer une ou plusieurs molécules de familles différentes (Dubois M. *et al.*, 2001 – Riediker S. *et al.*, 2001). Les méthodes ainsi développées ont conduit à valider les méthodes rapides ou microbiologiques (Ang C.Y.W. *et al.*, 1997 – Sachetelli S. *et al.*, 1997 – De Wash K. *et al.*, 1998 – Moats W.A., 1999 – Musser J.M.B. *et al.*, 2001).

3.2.7.4. Evolutions actuelles

Les nombreuses méthodes analytiques développées jusqu'à ces dernières années tendaient à détecter une substance ou plusieurs substances d'un même groupe de résidus. Cependant, ce

type de méthode diminue d'année en année et est remplacé progressivement par des méthodes de type « multi-composants ».

En effet, trois axes sont considérés dans la recherche de résidus : échantillons, méthodes analytiques et traitement des résultats.

En ce qui concerne les échantillons, les matrices se diversifient : initialement, la recherche des composés vétérinaires se limitaient à l'urine, au lait, à la viande, au foie et au rein. Actuellement, les matrices animales s'étendent aux œufs, aux poils et au miel. De plus, la pertinence de rechercher ce type de composés dans d'autres matrices susceptibles d'interférer dans la filière alimentaire se fait sentir.

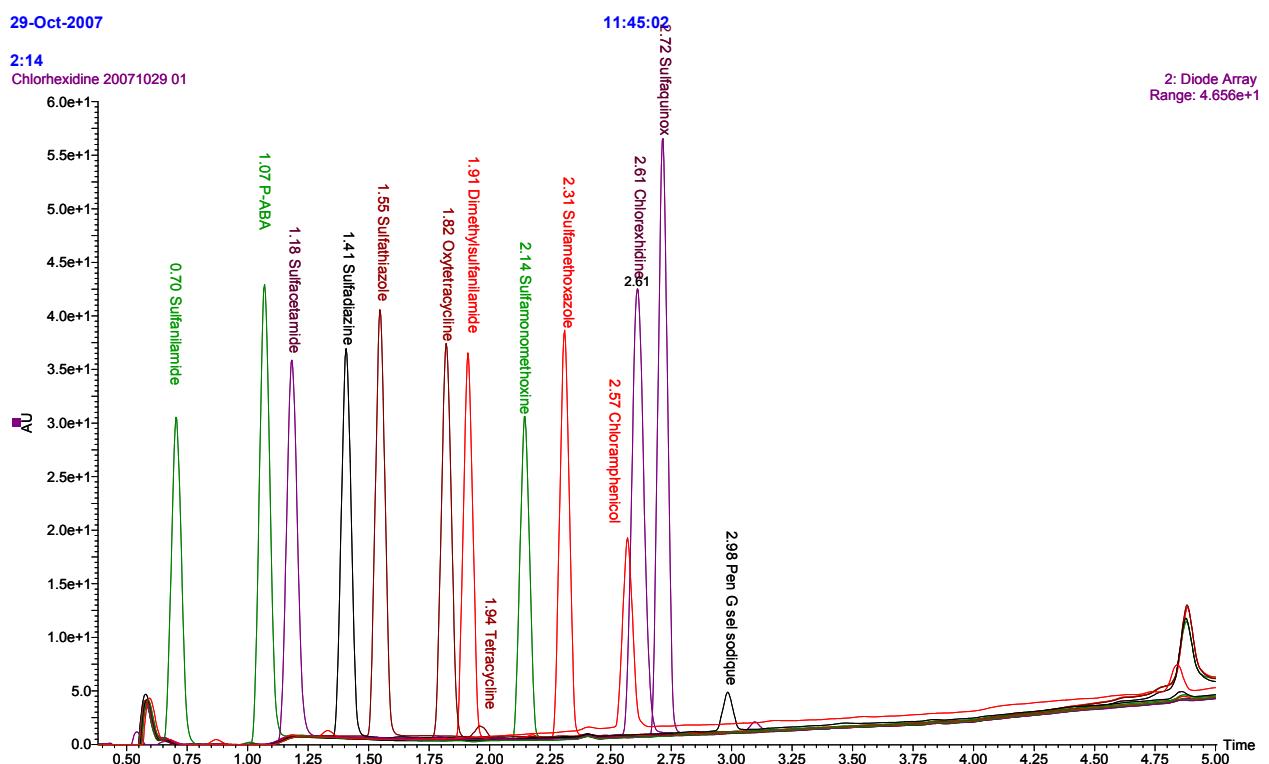


Figure 3-12. Séparation de résidus de médicaments vétérinaires (antibiotiques, antiparasitaires, désinfectants) par UPLCTM-détection détecteur à barettes de diodes (Romnee J.M., 2007, résultats non publiés)

De plus, pour toutes ces matrices, le nombre d'analytes recherchés est de plus en plus élevé : il est important de rechercher un maximum de résidus ou de leurs métabolites. Ce nombre croissant de déterminations va de pair avec le potentiel des méthodes analytiques développées. En effet, les méthodes quittent leur statut « mono-analyte » pour devenir des méthodes « multi-composants » (Van Rhijn H., 2004 – Kaufmann A. *et al.*, 2008). Ce type de développement n'a été possible qu'avec l'évolution des techniques analytiques : le passage, en

chromatographie liquide, à des particules de diamètre inférieur à 2 µm a permis d'augmenter la sensibilité des méthodes existantes, en réduisant considérablement les temps d'analyse. Le couplage à cette nouvelle chromatographie liquide de détecteurs performants (détecteur à barrettes de diodes, spectromètre de masse à haute résolution, ...) a permis de reculer les limites des méthodes multi-composants (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

De plus, l'utilisation d'un spectromètre de masse de type « Temps de vol » permet l'enregistrement de l'ensemble des masses présentes dans un échantillon et donc, des résidus contaminants, avec pour conséquence, la possibilité de « revoir » l'échantillon à posteriori, en recherchant un nouveau composé. L'utilisation du spectromètre en tandem ne permet pas cette nouvelle analyse, les résultats obtenus ne correspondant qu'à la recherche effectuée.

Le nombre de données générées par ces nouveaux détecteurs conduit à la mise en place de logiciels informatiques performants, digérant l'ensemble de ces informations par le biais de la chimiométrie (Viv'o-Truyols G., 2005).

Les méthodes rapides évoluent elles aussi, mettant en jeu d'autres types de récepteurs (Gaudin V. *et al.*, 2007).

CHAPITRE 4 : LES ASPECTS LÉGISLATIFS ET LE CONTRÔLE OFFICIEL EN BELGIQUE

4.1. En Europe

Le marché du médicament vétérinaire est notamment régi, dans l’Union Européenne, par deux directives adoptées par le Conseil en 1981 et par un règlement adopté en 1993 :

- Directive 81/851/CEE du Conseil, du 28 septembre 1981, concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux médicaments vétérinaires¹⁸
- Directive 81/852/CEE du Conseil, du 28 septembre 1981, relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les normes et protocoles analytiques, toxicopharmacologiques et cliniques en matière d’essais de médicaments vétérinaires¹⁹
- Règlement (CEE) n°2309/93 du Conseil, du 22 juillet 1993, établissant des procédures communautaires pour l’autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire et instituant une agence européenne pour l’évaluation des médicaments²⁰.

Ces différents documents ont depuis lors été amendés à de nombreuses reprises.

La problématique des résidus ne se limite cependant pas à la gestion simple des médicaments à usage vétérinaire. En effet, le législateur prévoit de protéger la santé du consommateur par le biais de LMR implantées sur les aliments d’origine animale. Ainsi, les aliments obtenus à partir d’animaux traités avec des médicaments vétérinaires ne peuvent contenir des résidus qui représentent un danger pour la santé publique. Pour permettre une application uniforme de ce principe et s’assurer que les différences entre les évaluations nationales des résidus soient minimes, le Conseil a adopté en 1990, le règlement CEE 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d’origine animale²¹.

Ce règlement définit quatre groupes de composés.

Le premier de ces groupes reprend la liste des substances pharmacologiquement actives pour lesquelles des LMR ont été fixées de manière définitive. Cela signifie que les données

¹⁸ J.O. N° L317, 06.11.1981, p.1

¹⁹ J.O. N° L317, 06.11.1981, p.16

²⁰ J.O. N° L214, 24.08.1993, p.1

²¹ J.O. N° L224, 18.08.1990, p.1

relatives au danger et aux risques sont suffisantes pour permettre à la Commission de prendre une décision définitive quant à la définition de la LMR (**Tableau 4-1**).

Tableau 4-1. Règlement CEE 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale – Annexe I – Exemple

Substances pharmacologiquement actives	Résidu marqueur	Espèces animales	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Denrées cibles	Autres dispositions
Toutes les substances du groupe des sulfamides	Substance parent	Toutes les espèces productrices d'aliments Bovins, ovins, caprins	100 100 100 100 100	Muscle Graisse Foie Reins Lait	Le total des résidus de toutes les substances ne doit pas dépasser 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Le second groupe correspond aux substances pour lesquelles il n'apparaît pas nécessaire de fixer une LMR. Pour ces composés, le danger est maîtrisé et il n'y a pas de risque lié à une utilisation respectant les prescriptions d'usage.

Le troisième groupe reprend les molécules pour lesquelles une LMR provisoire a été fixée, avec pour obligation de fixer la LMR définitive endéans les 5 ans. Cette LMR provisoire ne peut être prolongée qu'une seule fois pour une période de 2 ans maximum.

Les molécules reprises dans le quatrième groupe sont des substances pour lesquelles il est impossible de définir une LMR en raison des risques qu'elles engendrent pour la santé du consommateur (**Tableau 4-2.**). Ces molécules sont alors interdites d'utilisation sur les animaux produisant à destination de la consommation humaine.

Le document initial ne contient que peu d'informations quant à la répartition des molécules dans les différents groupes. De nombreuses modifications sont parues depuis la publication de ce règlement.

Tableau 4-2. Règlement CEE 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale – Annexe IV – Exemple

Substances pharmacologiquement actives	Résidu marqueur	Espèces animales	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Denrées cibles	Autres dispositions
Chloramphénicol	Substance parent	Toutes les espèces productrices d'aliments Bovins, ovins, caprins		Muscle Graisse Foie Reins Lait	Interdit

La mise en application de la Directive 81/851/CEE du Conseil au 1^{er} janvier 1992 a eu d'importantes conséquences sur le marché du médicament vétérinaire. En effet, depuis cette date, un État membre ne peut autoriser la mise sur le marché d'une nouvelle molécule n'appartenant pas à l'une des trois premières annexes du Règlement CEE 2377/90. Afin de permettre l'évaluation des substances pharmacologiquement actives autorisées dans les différents États membres à la date d'entrée en application du Règlement CEE 2377/90, une période transitoire a été mise en place jusqu'au 1^{er} janvier 1997. Cette période a ensuite été prolongée jusqu'au 31 décembre 1999 pour toutes les substances en cours de révision (Règlement UE 434/97 du Conseil), hormis certaines molécules clairement identifiées dans la législation pour lesquelles la date ultime a été fixée au 1^{er} janvier 1998. Cela s'est donc traduit concrètement par une interdiction, à partir du 1^{er} janvier 2000, d'utiliser des molécules non reprises dans les Annexes I, II ou III du Règlement CEE 2377/90.

L'Agence européenne pour l'évaluation des médicaments vétérinaires (EMEA), créée en 1995, a été chargée par le Conseil (Règlement UE 1308/99 du Conseil) des procédures de mise en application de la réglementation relative aux LMR. Cela se traduit par la gestion des ressources scientifiques disponibles et par l'énoncé d'avis circonstanciés sur les dossiers relatifs à de nouvelles molécules ou à la mise à jour d'anciennes.

Dans le Règlement CEE 2377/90, la limite maximale d'un résidu est définie comme étant « la quantité maximale d'un résidu résultant de l'usage d'un composé pharmacologiquement actif (composé parent ou métabolites particuliers) qu'il est permis de rencontrer dans ou sur l'aliment. Cette quantité est exprimée en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de matière fraîche (ppm) ou en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de matière fraîche (ppb) ».

Il est à noter que cette définition rejoint celle adoptée par le Comité du Codex alimentarius (FAO/WHO) pour les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments : l'approche mise en œuvre en Europe pour l'évaluation sanitaire des résidus de médicaments vétérinaires est très proche de celle adoptée par le JEFCA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – Codex Alimentarius*).

L'approche que le CVMP (*Committee for Veterinary Medicinal Products*) privilégie repose sur les mêmes principes que ceux adoptés par d'autres comités chargés d'évaluer les additifs et les contaminants alimentaires : la détermination d'une dose sans effet (DSE) et le calcul d'une dose journallement admissible (DJA) sur laquelle est basée la LMR (**Figure 4-1**).

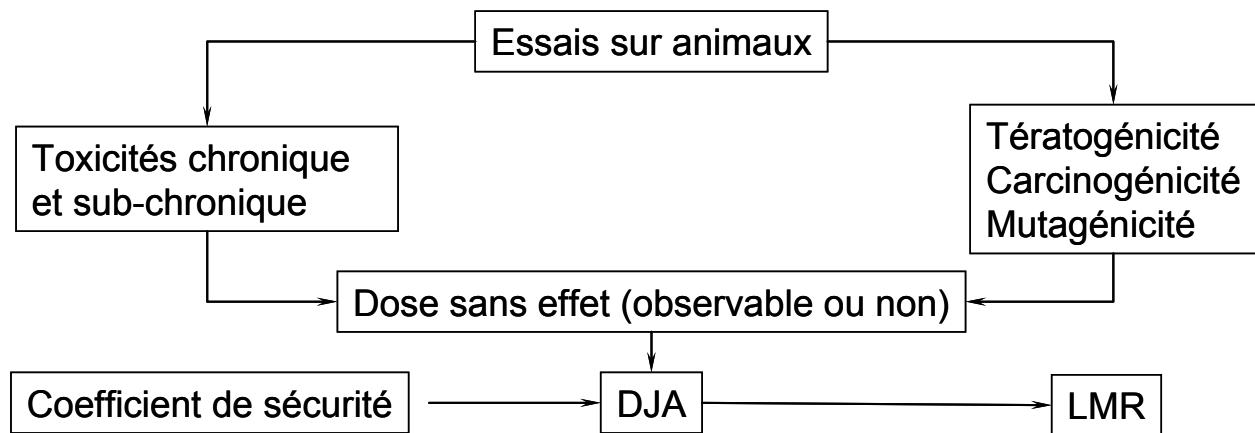


Figure 4-1. Principes de l'évaluation toxicologique des antibiotiques

Cependant, certains aspects spécifiques aux substances actives de médicaments sont à prendre en compte. En effet, la toxicité ne se limite pas pour ces substances aux effets tératogènes, mutagènes ou carcinogènes. Il faut envisager les propriétés pharmacologiques de la substance et les conséquences immunotoxiques potentielles. Pour les antibiotiques et les molécules similaires ou associées, l'évaluation du risque microbiologique doit inclure l'apparition éventuelle d'une flore résistantes (au niveau de l'animal ou de la flore intestinale humaine). De plus, les résidus retrouvés dans les productions animales ne présentent pas nécessairement la même toxicité que la molécule parent, suite à la métabolisation de celle-ci.

Exprimée en μg ou mg par kilogramme de poids, la DJA (dose journallement admissible) représente la quantité d'un composé qui peut être ingérée quotidiennement par un être humain durant toute sa vie sans pour autant avoir des conséquences pour sa santé.

Elle est déterminée par la dose sans effet observable (DSEO – *no observable effect level NOEL*) (Équation 1) (Mitchell J.M. *et al.* 1998).

$$\text{DJA mg/kg/jour} = \frac{\text{DSEO}}{\text{CS}}$$

Équation 1

Cette dose correspond à la quantité de substance pour laquelle aucun effet (tératogènes, mutagènes, carcinogènes ou immuno-pathologiques) n'a été décelé chez les espèces animales les plus sensibles au moyen des techniques les plus performantes. La DJA est obtenue en divisant la DSEO par un coefficient de sécurité (CS) allant de 100 à 1.000 suivant la molécule (usage, toxicité, ...). A partir de la DJA, il est possible de calculer la concentration maximale admissible (CMA) dans un produit pour un composé particulier. Il suffit pour cela de multiplier la DJA par

le poids moyen du consommateur (60 kg ou 70 kg selon les régions) qui consommerait 500 g de viande par jour (Équation 2) (Mitchell J.M. *et al.* 1998)..

$$CMA_{\text{mg/kg}} = DJA \times 60 \times 2 = \frac{DSEO}{CS} \times 60 \times 2$$

Équation 2

Pour les autres aliments, CMA calculée pour la viande est adaptée par un facteur de correction (**Tableau 4-3**).

L'équation 2 devient dès lors pour les autres produits que la viande (Équation 3) :

$$CMA_{\text{mg/kg}} = \frac{DSEO}{CS} \times 60 \times 2 \times FC$$

Équation 3

dans laquelle :

- DSEO : dose sans effet observable (mg/kg)
- CS : coefficient de sécurité (100 à 1.000)
- 60 : 60 kg (poids du corps humain)
- 2 : 1/0,5 kg de muscle consommé
- FC : facteur de correction pour les autres aliments que les muscles

Tableau 4-3. Facteurs de correction (par rapport au muscle) utilisés pour le calcul des CMA pour les résidus de médicaments vétérinaires au Canada (Mitchell J.M. *et al.*, 1998).

Matrice	Bœuf	Porc	Ovins	Volaille	Bœuf
Muscle	1	1	1	1	Muscle
Foie	2	3	5	3	Foie
Rein	3	4	5	5	Rein
Peau	NA ^a	4	NA	2	Peau
Graisse	4	4	5	2	Graisse
Lait	0.333	NA	0.333	NA	Lait
Œufs	NA	NA	NA	1	Œufs

^a NA : non applicable

A ce stade, il ne faut pas confondre CMA et LMR. En effet, la CMA se rapporte à la concentration totale tolérable en résidus. La LMR, par contre, se rapporte à un résidu marqueur, représentatif de cette CMA. La détermination de la LMR permet ensuite de définir la période de retrait de la production agricole : il s'agit de la période pendant laquelle la teneur en résidu est

supérieure à la LMR. Pendant cette période, le tissu animal destiné à la consommation humaine (viande, lait, ...) ne peut donc être mis sur le marché.

Tableau 4-4. Limites maximales de résidus (LMR) ou tolérance pour différents antibiotiques dans le lait, au Canada, dans l'Union Européenne et aux Etats-Unis^{22 - 23 - 24}.

Molécule	LMR ou tolérance ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou ppb)		
	Canada	Union Européenne	Etats-Unis
Ampicilline	10	4	10
Ceftiofur	1.000 (A) ^a	100	50 (S) ^b
Céphapirine	20	-	20
Cloxacilline	30 (A)	30	10
Dihydrostreptomycine	125	200	125 (S)
Erythromycine	50	40	50 (S)
Néomycine	250 (A)	500	150
Novobiocine	125 (A)	-	100
Oxytétracycline	150 (A)	100	30 (S)
Pénicilline G	6	4	5 (S)
Streptomycine	125	125	125 (S)
Sulfadiméthoxine	110 (A)	100 ^c	10
Sulfadoxine	10 (A)	100 ^c	-
Sulfaméthazine		100 ^c	10 (S)

A : LMR administrative (non publiée dans *Canada's Food and Drug Act and Regulations* mais pouvant être utilisée dans un cadre légal) – S : niveau “sain” (données non publiées dans *U.S. Food, Drugs and Cosmetics Act* mais pouvant être utilisée dans un cadre légal)

^a : molécule parent et métabolites – ^b : molécule parent – ^c : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour le groupe des sulfamides

Un exemple, extrait de Mitchell *et al.* (1998) permet de préciser ces notions. La tilmicosine, un macrolide préparé à partir de la tylosine, est autorisée au Canada depuis 1990 pour le traitement d'infections respiratoires dans le cheptel bovin, mais elle n'est pas autorisée sur les vaches en lactation. Une étude de 1 an sur chiens a permis de fixer la DSEO à $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Un coefficient de sécurité de 100 a été appliqué à cette dose et une DJA de $0,04 \text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{jour})^{-1}$

²² Code of Federal Regulations, 1994. 21 CFR 1, part 556 (1 April). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration – cité par Mitchell J.M. *et al.*, 1998

²³ EU-Regulation 2377/90. 1990. Off. J. Eur. Communities L 224:1-8 – cité par Mitchell J.M. *et al.*, 1998

²⁴ Government of Canada. 1994. Food and Drugs Act and Regulations, Supply and Services Canada – cité par Mitchell J.M. *et al.*, 1998

(équation 1) a été obtenue. Une QMA (Quantité maximale admissible) a été calculée à partir de cette DJA : $4,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pour le muscle et $9,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pour le foie (équations 2 et 3). Le foie a été choisi comme organe cible de contrôle et la molécule parent comme résidu marqueur. Sur base de ces données, une LMR a été fixée à $1,6 \text{ mg tilmicosine} \cdot \text{kg}^{-1}$ foie de bovin.

Un autre exemple, tiré de Romnee *et al.* (1997), montre l'importance d'utiliser les techniques les plus sensibles pour réaliser l'évaluation de ces molécules et l'importance de mettre à jour ces évaluations en fonction de l'évolution des techniques. Le suivi de vaches laitières traitées au Sulfaphénicol® (contenant un sulfamide et du chloramphénicol) montre, après injection du médicament par voie utérine, des quantités particulièrement importantes de sulfamide (jusqu'à 16 fois la LMR lors de la première traite) alors que le médicament ne prévoit pas de période de retrait.

Le **Tableau 4-4** présente une comparaison des LMR de différents antibiotiques dans le lait au Canada, aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne.

La définition d'une LMR pour chaque antibiotique utilisé ou pour chaque nouvel agent chimiothérapeutique ne permet pas de garantir la qualité du produit (lait ou viande). Il est en effet impératif d'instaurer une série de mesures de contrôle visant à vérifier le respect de ces valeurs.

La directive 92/46/CEE du Conseil du 16 juin 1992 a traduit dans un acte officiel les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché du lait cru, du lait traité thermiquement et des produits à base de lait²⁵.

Dans l'annexe A de cette directive, il est précisé (*Chapitre premier, Prescriptions de santé animale relatives au lait cru*) que le lait doit provenir d'animaux (bovins, caprins, ovins) qui n'ont pas été traités avec des substances dangereuses ou pouvant devenir dangereuses pour la santé de l'homme, susceptibles de se transmettre au lait, à moins que le lait n'ait fait l'objet du délai d'attente officiel prévu par les dispositions communautaires ou, si tel n'était pas le cas, par les dispositions nationales. Dans ce même point, il est spécifié que le lait cru doit être exclus du traitement, de la transformation, de la vente et de la consommation lorsqu'il contient des résidus de substances visées à l'article 15 de la présente directive (résidus du groupe III, à savoir antibiotiques, sulfamides et substances antimicrobiennes similaires) qui dépassent le niveau de tolérance admis.

²⁵ J.O. N° L268, 14.09.1992, p. 1

Dans le troisième chapitre de cette même annexe, il est spécifié que le lait dont la teneur en résidus de substances pharmacologiquement actives dépasse les niveaux autorisés pour l'une des substances visées aux annexes I et III du règlement (CEE) 2377/90²⁶, le total combiné des résidus de toutes les substances ne pouvant pas dépasser une valeur à fixer selon la procédure prévue à l'article 31 de la présente directive, ne peut être destiné à la consommation humaine. Il est à noter que, si les annexes I et III du règlement (CEE) 2377/90 sont périodiquement complétées, une valeur maximale n'a jamais été définie pour le total combiné de toutes les substances.

Il est d'ailleurs possible de s'interroger sur la signification d'une valeur maximale pour le total combiné des résidus de toutes les substances. En effet, si certaines associations de substances actives sont inconcevables au niveau d'un seul animal, ces mêmes associations peuvent se rencontrer au niveau du lait de tank, dans une exploitation (plusieurs animaux traités dans l'étable avec des principes actifs incompatibles) et à fortiori, dans du lait de grand mélange, bien qu'à ce niveau, le facteur dilution rend indécelable bon nombre de contaminations. Il faudrait dès lors envisager de nombreux cas possibles pour définir une valeur maximale « totale ».

Les mêmes critères sont applicables au lait de consommation.

Cette directive a été transcrit en droit belge dans deux arrêtés, le premier relatif à la production du lait et à l'instauration d'un contrôle officiel du lait fourni aux acheteurs²⁷ et le second relatif à la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs²⁸.

Afin d'uniformiser le contrôle au sein de l'Union Européenne, la Commission a arrêté une liste de méthodes d'analyse et de test permettant de juger de la qualité du lait fourni aux acheteurs (décision 91/180/CEE du 14 février 1991 arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait cru et du lait traité thermiquement²⁹). Cette décision a été transcrit en droit belge dans l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994 fixant les méthodes d'analyse pour la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs³⁰. Une différence, en

²⁶ J.O. N° L224, 18.08.1990, p. 1 et les modifications ultérieures

²⁷ ANONYME (1994)^a. Arrêté royal du 17 mars 1994 – M.B. 06.05.1994

²⁸ ANONYME (1994)^b. Arrêté ministériel du 17 mars 1994 – M.B. 06.05.1994

²⁹ ANONYME (1991). J.O. N° L93, 13.04.1991, p. 1

³⁰ ANONYME (1994)^c. Arrêté ministériel du 14 octobre 1994 – M.B. 0.12.1994, p. 29854

apparence insignifiante, est apparue dans le texte légal belge où la notion d'« antibiotiques et de sulfamides » a été remplacée par une notion plus large de « substances inhibitrices ».

4.2. En Belgique

4.2.1. A la ferme

La législation belge prévoit une série de critères destinés à assurer la qualité du lait livré à un acheteur, qu'il s'agisse d'un transformateur (laiterie) ou d'un particulier (vente à la ferme). Ces critères, au nombre de six (Dehareng F., 2007), reprennent notamment les résidus inhibiteurs, la teneur en cellules somatiques, la teneur en germes, la propreté visible, etc Deux arrêtés définissent les critères à respecter pour définir un lait de qualité^{31 - 32}.

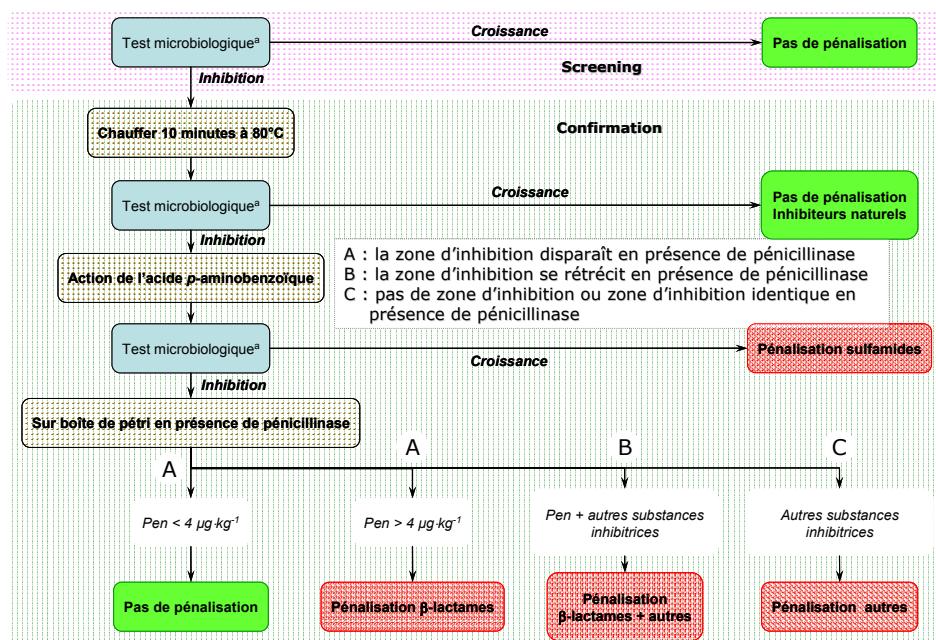


Figure 4-2. Détection des inhibiteurs dans le lait – Protocole au 1^{er} octobre 1994 –
^a : Delvotest[®] SP ou test de diffusion en tube préparé au laboratoire

En Belgique, le critère « Antibiotiques » est apparu pour la première fois dans la législation relative à la qualité du lait dans les années 60. Depuis, les usages ont évolué : les méthodes de détection successives ont été modifiées afin d'augmenter la sensibilité à un nombre sans cesse

³¹ ANONYME (2006). 21 DECEMBRE 2006. – Arrêté royal relatif au contrôle de la qualité du lait cru et à l'agrément des organismes interprofessionnels. MB 20070115. 1555-1560

³² ANONYME (2007). 1^{er} FEVRIER 2007. – Arrêté ministériel portant approbation du document établi par les organismes interprofessionnels agréés en ce qui concerne les modalités du contrôle de la qualité du lait cru de vache. MB 20070216. 7679-7683

croissant de molécules. Cette évolution aboutit au 1^{er} janvier 2007, à l'introduction des tests dits « rapides ».

Initialement, la méthode était basée sur le pouvoir inhibiteur des antibiotiques vis à vis d'une souche particulièrement sensible, utilisée en industrie de transformation laitière, *Streptococcus thermophilus*. L'absence d'antibiotiques était mise en évidence lors de la coagulation de l'échantillon de lait, en présence de la souche de référence, après une période d'incubation déterminée. L'activité des antibiotiques éventuellement présents dans l'échantillon de lait se traduisait par une non croissance de la souche et par un maintien du pH du lait.

En 1994, la Belgique a choisi de modifier sa méthode pour élargir son spectre de sensibilité et se rapprocher de la méthode proposée par l'Union Européenne³³. Le principe est resté basé sur l'inhibition d'une autre souche bactérienne (*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), plus sensible à d'autres molécules que les seuls antibiotiques à noyau β -lactame (pénicilline et associés). Le protocole de cette méthode prévoyait en outre, une étape de confirmation (**Figure 4-2**). Dans cette étape de confirmation, le lait était chauffé pendant 10 minutes à 80°C afin de détruire les inhibiteurs naturels, éventuellement présents et responsables d'un résultat positif lors de l'étape de sélection (screening).

Cette première méthode, si elle fournissait des informations intéressantes quant à l'usage des molécules présentait cependant un inconvénient majeur : le temps nécessaire pour obtenir le résultat final en cas de screening positif positif.

Sur base d'un second résultat positif, l'identification de deux groupes de molécules était rendue possible par l'utilisation de l'acide *p*-aminobenzoïque (identification des sulfamides) d'une part et de la pénicillinase (groupe des antibiotiques à noyau β -lactame dérivés de la pénicilline G) d'autre part. Cette ultime analyse permettait une évaluation quantitative de la teneur en antibiotique (donnée en équivalent pénicilline·L⁻¹) puisque la zone d'inhibition observée pour l'échantillon sur la boîte de pétri était comparée à la zone obtenue pour un standard (lait dopé à la pénicilline G à une teneur de 6.7 UI·L⁻¹).

Le nombre de contrôles effectués sur un mois relativisait cet inconvénient. En 1994, seuls deux contrôles étaient réalisés sur le mois, les résultats positifs étant sancitonés par une pénalisation (**Tableau 4-5**).

³³ ANONYME (1991). Décision 91/180/CEE de la Commission arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait cru et du lait traité thermiquement

Afin d'éviter une discrimination en matière de contrôle, le législateur a décidé, en 2000, que le contrôle serait basé essentiellement sur le Delvotest® MCS, tout en appliquant un nouveau protocole (**Figure 4-3**). Le test microbiologique utilisé pour le screening a été changé en 2005, suite à une étude approfondie du Copan Milk Test® (Chapitre 9).

Tableau 4-5. Pénalisations encourues en cas de résultat positif lors de la détection des résidus inhibiteurs – protocoles 1994 et 2007 (Romnee J.M., 2007)

Substances inhibitrices 1994		
2 contrôles mensuels	Absence	Pas de pénalisation
	Présence	1 BEF par litre de lait pour le mois au cours duquel il y a pénalisation (2.5 € par 100 litres de lait)
En cas de récidive endéans les 6 mois (espacée d'au moins 8 jours) : doublement de la pénalisation		
Substances inhibitrices 2007		
Chaque collecte	Absence	Pas de pénalisation
	Présence	29.75 € par 100 litres de lait pour la production du jour

Cependant, les deux tests microbiologiques utilisables ne présentaient pas une sensibilité similaire. Ainsi, Romnee J.M. (1995) a montré que, pour des échantillons prélevés à la suite de traitements antibiotiques, le pourcentage de résultats positifs obtenus avec le Delvotest® SP était supérieur de 10 % par rapport aux résultats positifs obtenus par la méthode de diffusion en tube.

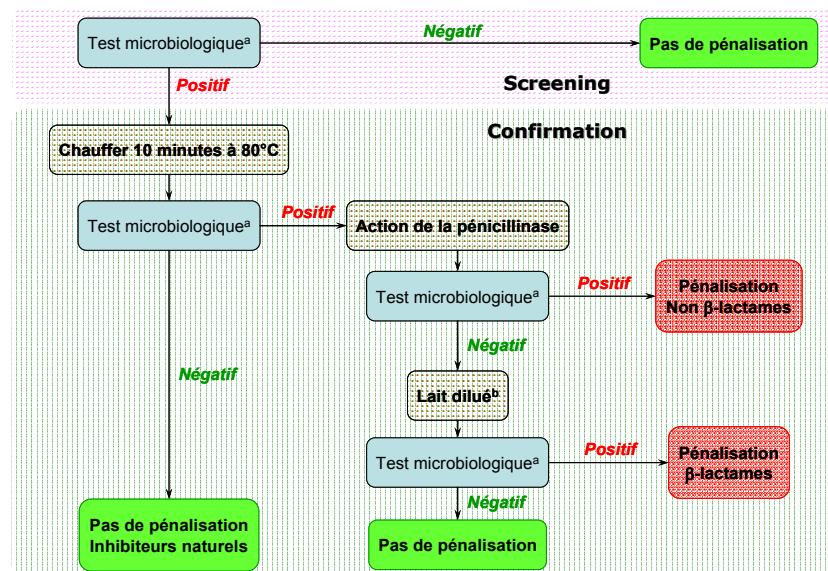


Figure 4-3. Protocole de détection des inhibiteurs dans le lait – ^a : Delvotest® MCS (2000) ou Copan Milk Test® (2005)

L'année 2000 a vu un autre changement important dans l'application de la législation. En effet, à partir de cette année, chaque livraison de lait a été soumise à la détection des inhibiteurs.

Cette augmentation dans la fréquence des contrôles a eu une conséquence sur les cas de récidives, qui ont augmenté.

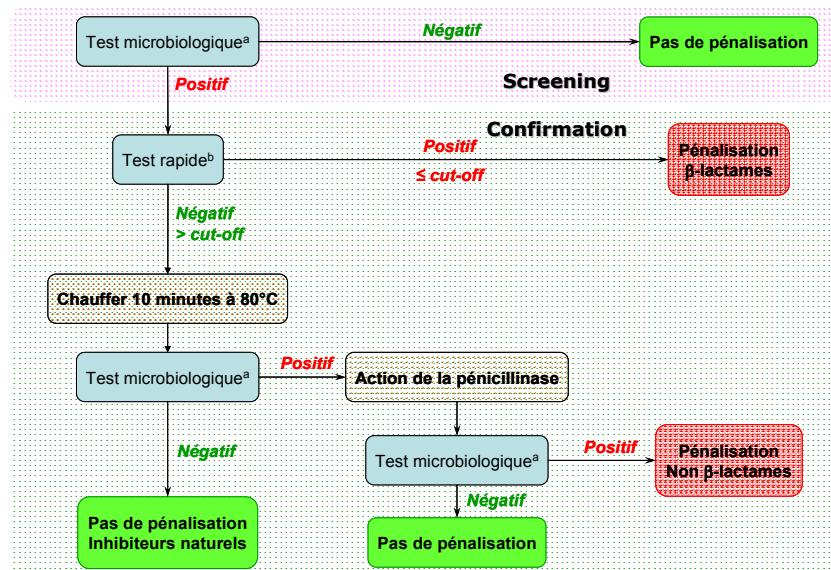


Figure 4-4. Protocole de détection des inhibiteurs dans le lait – Introduction des tests rapides (2007) – ^a : Copan Milk Test ou Delvotest MCS – ^b : β-s.t.a.r 25

Ainsi, le délai entre la réception du résultat concernant une livraison positive et la prise d'échantillon sur la livraison suivante n'était pas suffisant pour permettre à l'éleveur de prendre ses dispositions pour éviter une nouvelle contamination. Pour éviter ces situations, les tests rapides ont été introduits dans le protocole au 1^{er} janvier 2007 (**Figure 4-4**).

Dans ce schéma de détection, l'utilisation d'un test rapide comme première étape de confirmation permet de prévenir très rapidement le producteur et d'éviter ainsi une contamination récidiviste. Conserver l'étape de chauffage après un résultat Beta-star 25 négatif élimine les inhibiteurs naturels et conduit, après l'action de la pénicillinase, éventuellement à une pénalisation « Non β-lactames ». Les informations collectées dans le cadre du monitoring (5.2. Dans la filière) conduiront à adapter ce protocole si certaines molécules, passant à travers ce schéma, sont mises en évidence.

4.2.2. Dans la filière

Parallèlement au contrôle à la ferme, le législateur a mis en place dès 1997, le monitoring de la filière « Lait ». Ce monitoring complète les informations puisées dans un système de contrôle intégré (**Figure 4-5**) (Heeschen W.H. & Suhren G., 1995).

Le schéma intégré, tel que proposé, offre une réponse au suivi de la qualité du lait tout au

long de la filière. Ainsi, la détection dans les exploitations laitières se limite à une réponse microbiologique, mise en évidence par l'inhibition d'une souche test de référence. C'est cette approche qui est mise en place dans les organismes interprofessionnels chargés de la détermination de la qualité du lait fourni aux acheteurs. Ces organismes utilisent la méthode officielle telle que décrite au point 4.2.1. L'industrie de transformation a en charge les auto-contrôles, à commencer par la surveillance des camions.

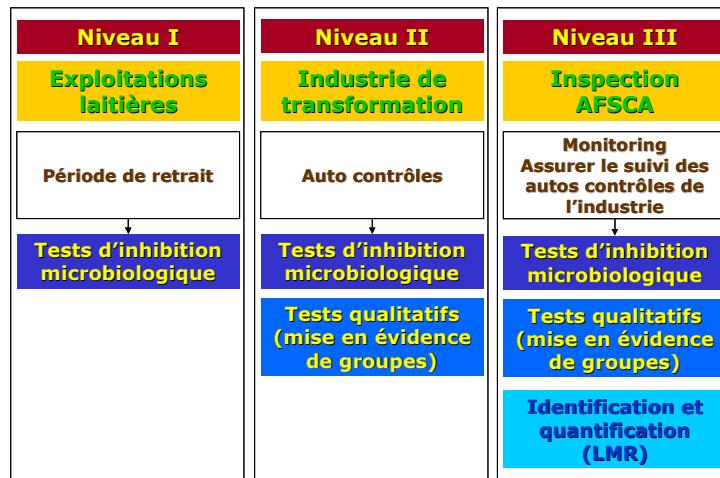


Figure 4-5. Schéma intégré de la détection des antibiotiques dans le lait – structure aux différents niveaux de la filière laitière (Heeschen W.H. & Suhren G., 1995)

Il va de soi que la présence de molécules inhibitrices dans un lait de camion est un risque particulièrement important pour l'industrie de transformation, qui peut voir des pertes colossales liées à la contamination d'un silo de stockage. Le suivi des résultats de ces auto-contrôles par l'autorité (3^{ème} niveau de détection) permet d'éviter la contamination de l'aval de la filière, puisqu'un camion déclaré positif doit être éliminé. Les analyses réalisées aux deux premiers niveaux de contrôle sont limitées par la sensibilité des souches bactériennes utilisées. Les tests microbiologiques présentent l'avantage non négligeable d'être peu coûteux, facilement mis en œuvre et applicables à de grandes séries d'échantillons. Cependant, de par leur nature même, certaines molécules ne seront pas détectées. C'est la fonction du monitoring de mettre ces molécules en évidence. Ce monitoring est d'autre part, une réponse à la législation européenne qui demande un suivi des productions à risque, en ce qui concerne la présence de résidus de molécules actives³⁴.

³⁴ ANONYME (1996). Directive 96/23/CE du Conseil, du 29 avril 1996, relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE - JO L 125 du 23.5.1996, p. 10-32

4.2.3. Quelques chiffres en Région Wallonne

L'évolution de la filière laitière au cours des dernières années montrent une diminution importante du nombre de producteurs (**Figure 4-6**).

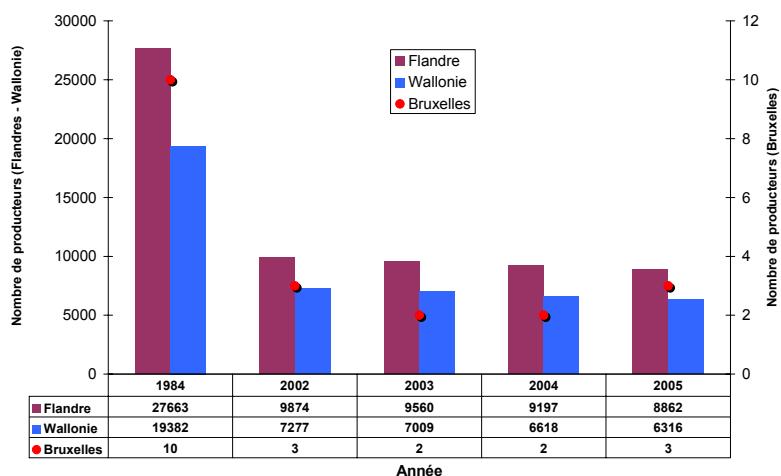


Figure 4-6. Evolution en Belgique du nombre de producteurs³⁵

Ainsi, sur une vingtaine d'années, près de 70 % des producteurs laitiers ont disparu, passant d'un total de 47055 à 15181 pour la Belgique. Cette évolution est comparable dans les trois régions de la Belgique (**Figure 4-6**).

Il est difficile d'établir le même graphe d'évolution pour les résultats de la mise en évidence des résidus inhibiteurs. En effet, depuis 1984, la méthode de détection a évolué (cfr point 4.2.1). Cependant, sur les dernières années (2004 à 2006), une diminution des échantillons détectés positifs (**Figure 4-7**) a été constatée.

³⁵ Rapport annuel « Comité du lait » - Organisme interprofessionnel de Battice – Année 2006, cité par ROMNEE J.M. (2007). Le contrôle des antibiotiques dans le lait de ferme : hier et aujourd’hui. Journée d'études « Laboratoire National de Référence » Lait et Produits laitiers – Bruxelles, 11 mai 2007 - http://www.favv-afscfa.fgov.be/labos/vorming/doc07/2007-05-11_controle_antibiotiques_lait_de_ferme_fr.pdf (2009-02-12)

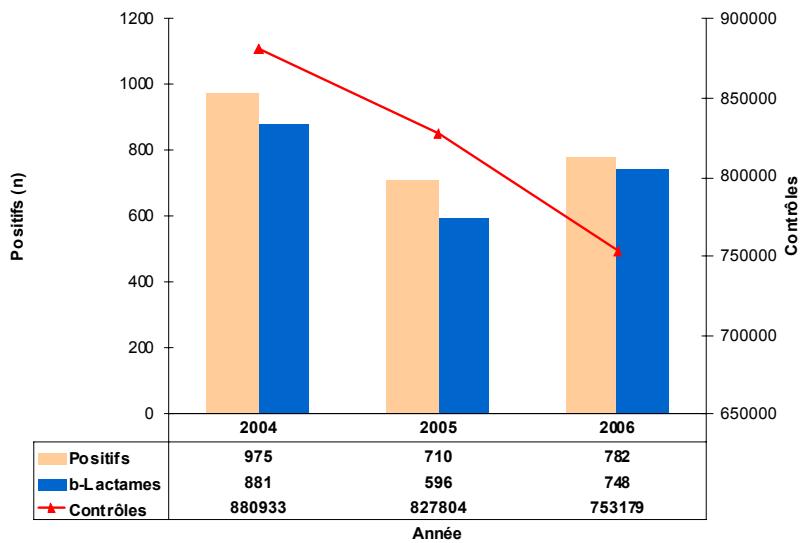


Figure 4-7. Evolution du nombre de contrôles et de résultats positifs (Comité du Lait, Battice) ³⁶

Mais, l'évolution du nombre de contrôles réalisés diminue aussi, maintenant le pourcentage de cas positifs constant (**Tableau 4-6**).

Le suivi mensuel des résultats (**Figure 4-8**) montre certaines périodes cruciales, notamment la période de décembre à mars, reprenant souvent le moment des vêlages : le nombre de résultats positifs est plus élevé en cette période. La tendance relevée pour la période en Wallonie se superpose bien aux résultats enregistrés en Belgique pour l'année 2006.

Tableau 4-6. Evolution du nombre de contrôles et de résultats positifs – Années 2004 à 2006 – Organisme interprofessionnel de Battice « Comité du lait » ³⁶

Années	Positifs		Antibiotiques à noyau β -lactame		Contrôles	
	Nombre	% (par rapport aux contrôles)	Nombre	% (par rapport aux contrôles)	% (par rapport aux positifs)	
2004	975	0,11	881	0,10	90,4	880933
2005	710	0,09	596	0,07	83,9	827804
2006	782	0,10	748	0,10	95,7	753179

Les deux politiques de contrôles (à la ferme lors du payement du lait à un acheteur et lors du monitoring de la filière laitière) sont non seulement compatibles, mais aussi complémentaires.

³⁶ Rapport annuel « Comité du lait » - Organisme interprofessionnel de Battice – Année 2006, cité par ROMNEE J.M. (2007). Le contrôle des antibiotiques dans le lait de ferme : hier et aujourd’hui. Journée d'études « Laboratoire National de Référence » Lait et Produits laitiers – Bruxelles, 11 mai 2007 - http://www.favv-afscfa.fgov.be/labos/vorming/doc07/2007-05-11_controle_antibiotiques_lait_de_ferme_fr.pdf (2009-02-12)

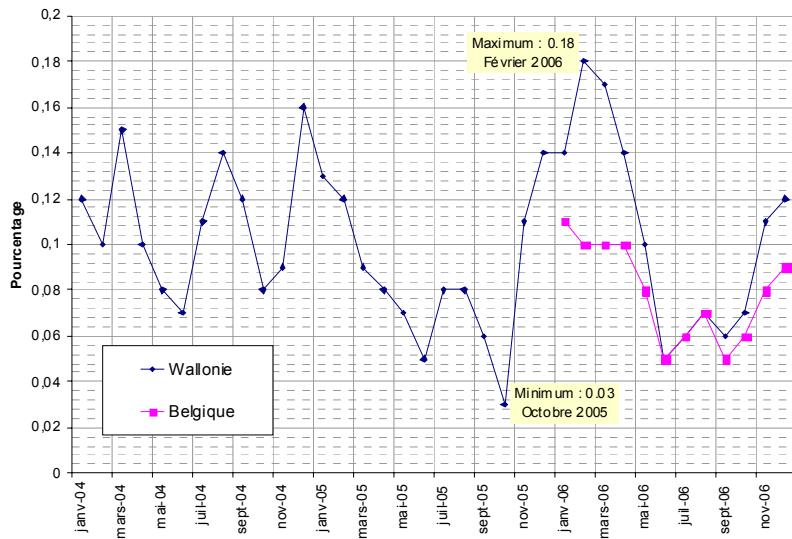


Figure 4-8. Evolution du pourcentage de résultats positifs de janvier 2004 à décembre 2006 – Wallonie et Belgique³⁶

Ainsi, les méthodes de screening mises en place dans le monitoring permettent de mettre en évidence des molécules présentant un pouvoir inhibiteur sur des souches microbiennes autre que *Gsc* (*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) ou sur la bactérie de référence, après modification du milieu pour augmenter sa sensibilité à un groupe particulier de molécules. Quant aux méthodes plus spécifiques, de type ELISA, elles donnent rapidement une information sur la présence de molécules particulières bien ciblées.

Le monitoring permet en outre, d'expliquer certains résultats obtenus lors des contrôles officiels et de relativiser certaines affirmations. En novembre 2006, 58215 analyses officielles ont été réalisées au « Comité du lait » de Battice. Parmi les échantillons, 63 (0.11 %) ont donné un résultat positif, avec une identification d'antibiotiques à noyau β -lactame dans 62 échantillons (0.11 %). Cette identification repose sur un résultat négatif après action de pénicillinase. Sur base des résultats obtenus durant ce mois de novembre, il est aisé de conclure que les antibiotiques à noyau β -lactame représentent la classe majoritaire des molécules utilisées.

Parallèlement à ces contrôles officiels, la détermination des tétracyclines dans 5948 échantillons (négatifs au screening) a conduit à 4 résultats positifs, soit 0.07 % des échantillons contrôlés. Le pourcentage des positifs reste similaire pour les deux groupes d'antibiotiques. Cependant, si une extrapolation est réalisée sur l'ensemble de la production du mois de novembre (58215 analyses), près de 40 échantillons donneraient un résultat positif.

Ces deux calculs relativisent l'interprétation qui peut être faite des résultats : 40 % d'échantillons déclassés le sont à cause des tétracyclines, et 60 % le sont à cause des molécules à

noyau β -lactames. De plus, ils montrent bien l'importance que représentent les molécules auxquelles le test officiel n'est pas sensible : le fait de retrouver plus de 90 % de résultats positifs dus aux pénicillines et associés est normal à partir du moment où le test de screening a été développé pour détecter ce groupe de molécules.

4.4. Conclusions

En matière de résidus de substances antibiotiques, la filière « Lait » dispose, en Belgique, de nombreux outils pour garantir la qualité de la matière première, le lait. Depuis le début de l'utilisation des antibiotiques en élevage laitier, la Belgique a cherché à maîtriser la qualité de la filière, pour aboutir aujourd'hui à un contrôle systématique de toutes les livraisons à l'industrie. Ce contrôle se fait de manière uniforme en Belgique par le biais de l'usage d'un seul protocole, commun aux organismes de contrôle.

Les informations collectées lors des contrôles sont complétées par les résultats du monitoring réalisé sur l'ensemble de la filière. Ce monitoring consiste à élargir le spectre de détection des tests utilisés ou à rechercher des molécules particulières, difficilement détectées par les tests microbiologiques.

De nouveaux outils analytiques (notamment les outils de spectrométrie de masse de type « temps de vol ») devraient permettre d'approfondir les résultats positifs en identifiant de manière formelle et en quantifiant les molécules responsables de ces résultats.

CHAPITRE 5 : LA SPECTROMÉTRIE INFRA-ROUGE

5.1. Fondements théoriques

5.1.1. Rappels historiques

La spectroscopie infra-rouge a pris son véritable essor au début des années soixante, avec le développement des applications analytiques menés par Karl Norris. Dès le début du vingtième siècle, l'histoire de la spectrométrie infra-rouge s'est pourtant dissociée de l'étude de la lumière. Cette dissociation s'est d'abord effectuée sur un plan fondamental (Bertrand D., 2000).

L'évolution des différentes théories relatives à la lumière aboutit en 1900, au concept du corps noir, élaboré par Planck. Celui-ci a émis l'hypothèse qu'un oscillateur de fréquence naturelle ν ne pouvait donner ou recevoir de l'énergie que par paquet d'amplitude $E = h \cdot \nu$ avec l'utilisation d'une nouvelle constante h égale à $6,6268 \cdot 10^{-34}$ joule. Cette hypothèse de quantification de l'énergie est confortée par l'étude de l'effet photoélectrique : l'énergie cinétique d'électrons émis à partir d'une surface métallique soumise à une lumière visible ou ultra-violette, est proportionnelle à la fréquence de la lumière et non à son intensité. Einstein a expliqué ce phénomène en 1905 en donnant à l'énergie d'un faisceau lumineux la forme de paquets dont l'énergie est égale à $h \cdot \nu$.

Parallèlement à ces développements relatifs à la lumière, des études concernant l'interaction entre une onde électromagnétique et la matière vont commencer. C'est le début de la spectroscopie. Ces études portent dans un premier temps sur l'émission et l'absorption atomique, avec en 1885, la caractérisation du spectre de l'atome d'hydrogène par J.J. Balmer. Ce dernier observe quatre raies lumineuses à 656, 486, 434 et 410 nm. Sur base d'observations de ce type, Niels Bohr suggère que les atomes gagnent ou perdent de l'énergie sous la forme de « quanta ». Louis de Broglie a permis, en associant une onde λ à une particule de masse m se déplaçant à une vitesse ν selon l'équation

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot \nu}$$

de calculer chaque orbite électronique. Ces dernières sont en fait des ondes stationnaires dont le rayon de l'orbite correspond à un nombre entier de longueurs d'onde

$$2\pi r = n\lambda \quad \text{avec } n = 1, 2, 3 \dots$$

Le calcul des niveaux énergétiques de chaque orbite est alors possible pour l'atome d'hydrogène et pour les ions à un seul électron. L'application du modèle de Bohr à des atomes

possédant plusieurs électrons n'étant pas satisfaisante, une nouvelle théorie, la mécanique quantique, a donc été nécessaire pour ces atomes.

Les premières observations de radiations infra-rouges remontent au début du 19^{ème} siècle lorsqu'un astronome, W. Herschel, observe les effets thermiques de la lumière à limite de la zone visible. En 1882, des relations sont établies entre des bandes d'absorption du spectre infra-rouge et fonctions chimiques par W. Abney et E.R. Festing qui ont photographiés 53 composés. Les difficultés rencontrées par les premiers spectroscopistes furent nombreuses : construire les instruments, acquérir des spectres pendant des temps très longs, ... Les développements de l'électronique ont permis d'accéder à des équipements nettement plus performants : amplification de signaux très faibles, utilisation d'autres types de détecteurs, développement de nouveaux modes de détection. Vers 1965, l'apparition des instruments équipés d'interféromètres et utilisant la transformée de Fourier va permettre l'acquisition de spectres de composés en solution aqueuse par le biais de cellules à très faible trajet optique. Quelques années après, les bonds de l'informatique (processeurs à semi-conducteur, micro-informatique) vont reculer les limites du traitement mathématique des spectres.

Le développement de cellules adaptées sur des appareils de plus en plus performants a permis l'analyse de produits en l'état, sans préparation préalable (Biston R. *et al.*, 1987³⁷ – Dardenne P. *et al.*, 1991³⁸ – Williams P. & Sobering D., 1992³⁹). De plus, le couplage de fibres optiques au spectromètre infra-rouge va déplacer l'outil de contrôle vers la production (mono-site ou multi-site de contrôle) et permettre ainsi une réactivité plus efficace en matière de correction de non conformité de production, tout en réduisant de manière significative les coûts des analyses.

³⁷ BISTON R., DARDENNE P., CWIKOWSKI M., WATHELET J.P. & SEVERIN M. (1987). Analysis of quality parameters of whole rapeseed by NIRS, C.E.C. meeting on glucosinolates, Gembloux (Belgium), 1-3rd october – cité par Sinnaeve G., 2001

³⁸ DARDENNE P., SINNAEVE G., BISTON R. & LECOMTE P. (1991). Evaluation of NIR for predicting fresh forage quality. In : Proceedings of the 4th ICNIRS, Aberdeen (Scotland), aug. 19-23, 277-283 – cité par Sinnaeve G., 2001

³⁹ WILLIAMS P. & SOBERING D. (1992). Whole seed again analysis by NIR and NIR : a comparison. In : Bridging the gap between data analysis and NIR applications, Ed. by K.I. Hilrum, T. Isaksson, T. Naes & A. Tandberg, Ellis Horwood, Chichester, 441-446 – cité par Sinnaeve G., 2001

5.1.2. Lois fondamentales

Pour un rayonnement se déplaçant le vide, une première formule permet de relier la vitesse de la lumière c , la longueur d'onde λ et la fréquence ν (correspondant au nombre de cycles par seconde, exprimée en Hertz Hz) :

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

Les unités utilisées en spectroscopie pour exprimer les longueurs d'onde sont variées. En effet, l'utilisation courante du micromètre ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$) dans la plage du moyen infra-rouge et du nanomètre ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) dans celle du proche infra-rouge permet d'éviter la manipulation de grands nombres (Dardenne P., 1990⁴⁰ – Bertrand D., 2000⁴¹) (**Figure 5-1**).

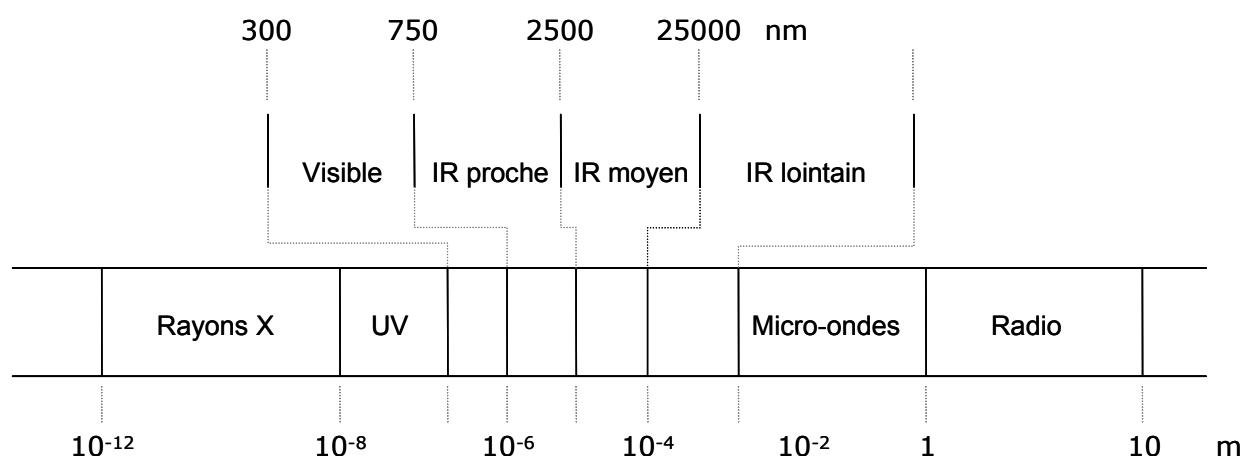


Figure 5-1. Spectre électromagnétique (Sinnaeve G., 2001)

L'analyse d'un échantillon par spectrométrie infra-rouge repose sur l'absorption d'une radiation électromagnétique par la matière. Cela se traduit par une absorption d'énergie au niveau des liaisons des différentes liaisons. L'intensité de la lumière transmise est régie par la loi de Lambert et Beer (Sinnaeve G., 2001) :

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = K \cdot P \cdot C \quad \text{avec} \quad T = \left(\frac{I}{I_0}\right)$$

A : absorbance ou densité optique

⁴⁰ DARRENNE P. (1990). Contribution à l'utilisation de la spectrométrie dans le proche infra-rouge pour l'étude de critères de qualité des céréales et des fourrages. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences agronomiques, 5030 Gembloux (Belgique), 173 p – cité par Sinnaeve G., 2001

⁴¹ BERTRAND D (2000). Les méthodes d'analyse rapide dans les industries agro-alimentaires. In : La spectroscopie inra-rouge et ses applications analytiques. Ed by Bertrand D. et DufourE., Technique & Documentation, Paris, 3-28 – cité par Sinnaeve G., 2001

T : transmittance

P : épaisseur ou trajet optique

K : constante fonction de l'analyte (extinction molaire)

C : concentration de la matière absorbante

Lors des analyses, dans les instruments utilisés, la mesure de I_0 se fait soit dans l'air soit dans une cellule contenant les constituants de la matrice, à l'exception de l'élément à doser. L'absorbance devient alors, dans ces conditions :

$$A = \log\left(\frac{1}{T_{\text{éch}}}\right) - \log\left(\frac{1}{T_{\text{std}}}\right) = \log\left(\frac{T_{\text{std}}}{T_{\text{éch}}}\right)$$

T_{std} : transmittance dans l'air ou le blanco (référence)

$T_{\text{éch}}$: transmittance dans l'échantillon

La mesure R_{std} correspond, pour une mesure en réflexion, à une céramique de référence.

Pour ce type de mesures, l'absorbance est le rapport des réflexions :

$$A = \log\left(\frac{R_{\text{std}}}{R_{\text{éch}}}\right)$$

5.1.3. Vibrations

Lorsqu'une molécule, présentant un ensemble d'états d'énergie, est soumise à une radiation, elle va absorber de l'énergie pour passer d'un état d'énergie inférieur à un état d'énergie supérieur. Lors de ce phénomène d'absorption, trois types de transitions peuvent être observées : une transition électronique (passage d'un électron à une orbite supérieure), une transition vibrationnelle (augmentation de l'amplitude de vibration entre les atomes) et une transition rotationnelle (modification de la vitesse de rotation des molécules sur elles-mêmes) (Davies T., 1998).

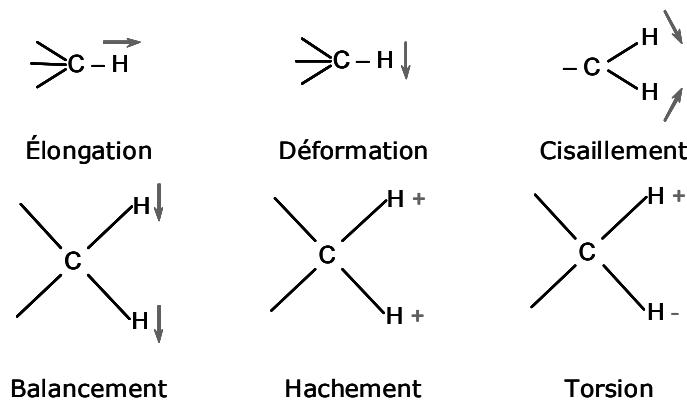


Figure 5-2. Modes de vibrations moléculaires (Wilmet A., 2000)

La lumière infra-rouge va être absorbée sous la forme de variations vibrationnelles et rotationnelles au sein de la molécule. Deux types de vibrations peuvent être identifiés : l'elongation dans laquelle deux atomes s'éloignent l'un de l'autre et la déformation qui entraîne une modification des angles de liaison et qui comprend le cisaillement, le balancement, le hochement et la torsion (**Figure 5-2**).

Parallèlement à ces modes de vibrations, trois types de bandes peuvent être trouvées. Les bandes fondamentales se retrouvent dans le moyen infra-rouge. Elles correspondent au passage d'un niveau fondamental E_0 à un premier état excité supérieur. Les bandes harmoniques sont présentes dans le proche infra-rouge. Elles proviennent du passage de l'état fondamental aux états énergétiques supérieurs (Workman J.J., 1992). Le troisième type de bandes, les bandes de combinaison, se trouvent dans le proche infra-rouge. Elles correspondent à la somme ou à la différence de deux vibrations fondamentales.

5.2. Mesures et échantillons

Il est possible de distinguer trois configurations optiques différentes : réflexion diffuse, transréflexion et transmission. A chacune de ces configurations sont associés un principe de mesure particulier et la présentation d'échantillons liquides ou solides (Particularités des différents modes de mesures en SPIR (Sinnaeve G., 2001).

Tableau 5-1. Particularités des différents modes de mesures en SPIR (Sinnaeve G., 2001)

Réflexion diffuse	Transréflexion	Transmission
Phénomène de surface	Le faisceau traverse l'échantillon, rencontre un miroir et retraverse l'échantillon	Le faisceau traverse l'échantillon
Epaisseur infinie	Epaisseur de la cellule importante (trajet optique) – à standardiser	Epaisseur de la cellule importante (trajet optique) – à standardiser
Liquides opaques	Liquides clairs	Liquides clairs
Grains entiers		
poudres		

5.3. La spectrométrie infra-rouge dans l'agro-alimentaire

5.3.1. Le moyen infra-rouge

Depuis la fin des années septantes, la spectrométrie dans le moyen infra-rouge est couramment utilisée pour les analyses de routine dans le monde laitier. Ainsi, les appareils

équipés de spectromètres MIR sont mis en œuvre pour le payement du lait au producteur. Dans ce cadre spécifique, la détermination en routine de la teneur en matière grasse, en protéine et en lactose. Deux autres composés ont été ajoutés à cette liste : l'urée et l'acide citrique ont été déterminés sur des équipements équipés de filtres et dédicacés à l'analyse du lait cru (Van Reusel A. *et al.*, 1996). Ces paramètres, s'ils sont importants dans le cadre du payement du lait, le sont aussi dans la gestion du troupeau laitier : les teneurs en protéines et en matière grasse sont des indicateurs non négligeables pour l'alimentation des vaches, la teneur en lactose est un indicateur de mammite (Tenskova R. *et al.*, 2000). Dans de récents développements, le placement de spectromètres directement sur l'unité de traite permet de suivre la qualité du lait de chaque vache au moment de la traite (Kawamura S. *et al.*, 2007).

Des constituants mineurs sont aussi recherchés par spectrométrie infra-rouge. Ainsi, la détection des tétracyclines a été évaluée par Smola N. & Urleb U. (2000). Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés (Romnee J.M. & Sinnaeve G., résultats non publiés).

L'application de la spectrométrie infra-rouge ne s'est pas limitée à la matière première. Elle a aussi pris progressivement sa place dans les systèmes de productions pour caractériser le produit ou pour en suivre sa production. La teneur en eau de la poudre de lait est mesurée dès la sortie de la tour de séchage, permettant ainsi de corriger les paramètres de séchage. La production de fromages de différents types est régulièrement suivie par spectrométrie infra-rouge, évitant les analyses de références particulièrement lourdes. Il en va de même pour la production industrielle de beurre. Van de Voort *et al.* ont utilisé en 1992, la spectrométrie MIR pour déterminer la teneur en eau de beurre, en arrivant à des valeurs semblables aux résultats obtenus par la chimie analytique.

Le processus de fermentation lactique mis en œuvre dans la production de yoghourt a été suivi par Van Reusel *et al.* (1996). Ce suivi a permis de mettre en relation différents acides organiques (lactique, orotique, butyrique, ...) produits par les souches utilisées dans la fermentation et les spectres infra-rouges mesurés en MIR. Ce type de monitoring rejoint l'application qualitative visant à faire de l'authentification de produits en mettant en évidence des différences spectrales attribuables soit à une origine particulière, soit à une adultération.

Les autres industries agroalimentaires sont elles aussi, concernées par l'utilisation de la spectroscopie MIR. Ainsi, différents constituants de liquides alimentaires ont été dosés par MIR (Sinnaeve G. *et al.*, 1996) : acide malique et extrait sec dans les jus de fruits, par exemple. Une application particulière repose sur la détection et l'identification de souches bactériennes (Naumann D., 1984 – Mariey L *et al.*, 2001 – Burgula Y. *et al.*, 2007).

5.3.2. Le proche infra-rouge

La spectrométrie dans le proche infra-rouge est particulièrement attractive pour l'industrie alimentaire. En effet, cette technique permet d'obtenir de manière simple, rapide et non destructive des résultats de dosage de constituants chimiques. C'est pourquoi de nombreuses industries l'ont adoptée pour analyser de manière rapide la teneur en protéine, en matière grasse, en humidité, en sucres ... Des applications plus spécifiques ont été développées. Ainsi, des identifications bactériennes ont été réalisées par Perkins K.L. *et al.* (2004 et 2005) et Rodriguez-Soana L.E. *et al.* (2001).

D'autres applications illustrent le potentiel de cette technique. Il suffit de retenir l'application courante de la SPIR lors des analyses réalisées sur céréales (Jespersen B.M. & Munck L., 2009). Une synthèse d'applications sur viandes et produits carnés a été rédigée par Gangidi R.R. & Proctor A. (2009). Les applications ainsi développées concernent tant la détermination de paramètres chimiques (constituants majeurs – protéines, matière grasse, matière sèche – constituants mineurs – minéraux, profils en acide gras) que des paramètres physico-chimiques (pH) ou technologiques (rhéologie). Elles se rapportent à différentes matrices (alimentation animale, produits de viand, produits laitiers, céréales, huiles, fruits, vins, bières, œufs et ovo produits ...) (Decruyenaere V. *et al.* 2009).

La microscopie infra-rouge et la caméra infra-rouge ont été appliquées à des problématiques de discrimination et de détection d'adultération. Ces techniques permettent de déceler la présence de farine animale dans des aliments pour animaux, en fournissant des informations intéressantes en appui d'autres techniques (Fumière O. *et al.*, 2009).

CHAPITRE 6 : EVALUATION DE KITS DE DÉTECTION D'ANTIBIOTIQUES DISPONIBLES POUR LES PRODUCTEURS – UNE UTILISATION À LA FERME

6.1. Introduction

Le nombre de producteurs laitiers diminue d'année en année et le volume de lait produit par unité ne cesse de croître. Ainsi, depuis 1984, le nombre global de producteurs en Belgique est passé de 47.055 à 15.181 (**Tableau 6-1**), ce qui représente une diminution de près de 70 %, répartie uniformément sur l'ensemble du territoire.

Tableau 6-1. Evolution du nombre de producteurs en Belgique entre 1984 et 2005 (Rapport annuel de la CBL 2006 – année 2005)⁴²

	Flandre	Wallonie	Bruxelles	Total
1984	27663	19382	10	47055
2002	9874	7277	3	17154
2003	9560	7009	2	16571
2004	9197	6618	2	15817
2005	8862	6316	3	15181

Les critères de qualité imposés étant de plus en plus stricts, le producteur laitier doit s'intéresser aux moindres détails (hygiène, santé, résidus, bactéries, ...) susceptibles d'affecter la qualité du lait qu'il fournit. Il peut ainsi contrôler différents paramètres parmi lesquels la présence de résidus d'antibiotiques. Pour cela, plusieurs firmes mettent à leur disposition des kits de détection destinés à un usage à la ferme.

6.2. Objectifs

Pour fournir au producteur un moyen efficace d'auto-contrôle, deux objectifs ont été poursuivis :

- associer les traitements à base d'antibiotiques (mis en œuvre dans la lutte d'infections courantes) aux temps d'élimination de résidus dans le lait (réponse positive lors de la détection)

⁴² Anonyme (2006) – Rapport annuel de la Confédération Belge de Laiteries (CBL), Activités 2005

- comparer les spécificités respectives de différents kits de détection disponibles pour une utilisation à la ferme

Pour parvenir à ces objectifs, la recherche d'antibiotiques a été effectuée selon la méthode de détection officielle, en vigueur depuis le 1^{er} octobre 1994, sur des échantillons de lait provenant de vaches ayant subi un traitement suite à une infection. Ces mêmes échantillons de lait ont ensuite été analysés au moyen de différents kits (Delvotest[®] SP, Valio T101[®] et Penzym[®] S) disponibles pour la ferme. Les réponses obtenues ont été comparées entre elles et à la méthode de détection officielle, basée sur l'inhibition de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Pour certains de ces échantillons, des protocoles d'analyse en chromatographie liquide ont été développées afin de mettre en rapport les résultats microbiologiques et des résultats analytiques.

6.3. Matériel et méthode

6.3.1. Méthode de diffusion en tube

Le principe de cette méthode repose sur la diffusion d'un échantillon de lait dans un milieu gélosé ensemencé de spores de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 ou C953. Ce milieu gélosé contient des substances nutritives, un indicateur de pH (pourpre ou rouge de bromocrésol – C₂₁H₁₆Br₂O₅S) et du triméthoprime. La croissance normale de la bactéries et la production d'acide qui en résulte fait virer l'indicateur de pH du violet (pH>6,8) au jaune (pH<5,2). La présence d'un agent inhibiteur se traduit par un maintien plus ou moins long de la coloration violette de la gélose. Le maintien de la coloration est dû à la nature de l'inhibiteur présent. En effet, une molécule bactériostatique n'inhibera la croissance que pendant un temps restreint, l'acidification étant simplement postposée. Un agent bactéricide détruira la souche, entraînant une non-acidification.

Cette coloration est évaluée par rapport à celle obtenue pour un échantillon témoin ne contenant pas de substances inhibitrices. La détection peut être effectuée en microplaques ou en tubes.

6.3.1.1. Milieux, solutions et micro-organisme test

Les différents composants utilisés doivent convenir pour des analyses microbiologiques. L'eau doit être de l'eau distillée ou déminéralisée ou de qualité équivalente. En outre, elle ne doit pas contenir de substances inhibitrices.

Gélose nutritive (*Plate count agar*)*Composition*

Extrait de levure : 2,5 g
Tryptone : 5,0 g
Glucose : 1,0 g
Agar : 15,0 g
Eau distillée : 1.000 mL

Préparation

Dissoudre les composants dans de l'eau en chauffant. Stériliser à 121°C +/- 1°C pendant 15 minutes. Le contrôle de la stérilisation est réalisé au moyen de ruban indicateur de stérilisation.

Solution de triméthoprime

Composition

Triméthoprime : 5 mg
Ethanol 96 % : 10 mL
Eau distillée : porter à 1.000 mL

Préparation

Dissoudre le triméthoprime dans l'éthanol et compléter avec de l'eau. Cette solution se conserve au maximum une semaine à l'obscurité et à une température de 0-5°C.

Solution de pourpre de bromocrésol (*BCP*)*Composition*

Pourpre de bromocrésol : 250 mg
Ethanol 96 % : 10 mL
Eau distillée : porter à 1.000 mL

Préparation

Dissoudre le pourpre de bromocrésol dans l'éthanol et compléter avec l'eau. La solution se conserve au maximum pendant 6 mois à l'obscurité et à une température de 0-5°C.

Suspension de spores de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

La suspension de spores (titre : environ 10^7 spores/mL) est achetée chez MCS Nederland (Melk Controle Station, Postbus 119, 7200 AC Zutphen). Le titre est contrôlé par comptage sur PCA lors de la réception.

6.3.1.2. Préparation des microplaques

Le milieu de base (PCA) est fondu et refroidi à 63°C. Par 100 mL de milieu, 2 mL de la solution de BCP et 2 mL de la solution de triméthoprime sont ajoutés stérilement. Le pH est ajusté à 8,00 +/- 0,02 par addition de NaOH 1 M (pHmètre avec correction de température). Une quantité de spores telle qu'un lait exempt de substances inhibitrices provoque un changement complet de la coloration de la gélose après 4 heures 30 d'incubation est ajoutée au milieu liquide.

Le milieu est mélangé de façon à le rendre homogène et il est réparti en microplaques (200 µL par puits). Les microplaques sont laissées à température ambiante pour que le milieu se solidifie.

6.3.1.3. Mode opératoire

Les échantillons de lait sont agités (homogénéisation) avant analyse. 100 µL de lait sont pipettés et transférés dans un puits de la microplaqué. Lors de chaque série d'analyse, deux puits de la microplaqué permettent l'analyse d'un lait témoin négatif (exempt de substances inhibitrices) et deux puits l'analyse d'un lait témoin positif (lait contenant de la Pénicilline G à une concentration de 4 µg·L⁻¹).

Les microplaques sont mises à incuber durant une heure à température ambiante.

Après cette première incubation, le lait est éliminé, les microplaques scellées et mises à incuber à 63°C +/- 1°C jusqu'à ce que le milieu test du lait exempt d'inhibiteurs soit de coloration jaune homogène.

6.3.1.4. Interprétation des résultats

La coloration jaune du milieu après incubation indique que l'échantillon de lait ne contient pas de substances inhibitrices à un niveau décelable. Le maintien de la coloration violette du milieu indique la présence de substances inhibitrices. La coloration partielle (partie de la gélose, coloration jaune-vert ou mauve-jaune) renseigne sur la présence d'agents retardant le métabolisme. Aucune information ne peut cependant être obtenue quant à la nature exacte de l'inhibiteur présent.

6.3.2. Mise en évidence de la présence de sulfamides

La mise en évidence des sulfamides repose sur le principe d'action de ces molécules : la similitude qui existe entre la structure des sulfamides et celle de l'acide *p*-aminobenzoïque (*p*-ABA), composé indispensable à la synthèse de l'acide folique est utilisée pour révéler la présence de sulfamides. L'ajout dans le milieu d'une quantité importante de *p*-ABA permet de contrecarrer l'action des sulfamides et ainsi, rétablir le métabolisme bactérien. Ce test se déroule dans des conditions similaires à la diffusion en tube.

6.3.2.1. Milieux, solutions et micro-organisme test

Aux milieux préparés pour la méthode diffusion en tube s'ajoute la préparation de la solution de *p*-ABA.

Acide *p*-aminobenzoïque (*p*-ABA)

Composition

Acide *p*-aminobenzoïque : 1,0 g

Préparation

Dissoudre l'acide dans l'eau en chauffant légèrement. Cette solution se conserve une

Eau distillée : 200 mL

semaine maximum à l'obscurité et à une température de 0-5°C.

6.3.2.2. Préparation des microplaques

Les microplaques sont préparées de la même manière que pour la méthode de diffusion en tube : avant l'ensemencement, lors de la constitution du milieu, 2 mL de la solution d'acide sont ajoutés.

6.3.2.3. Mode opératoire

Les échantillons sont analysés de la même façon pour la mise en évidence des sulfamides que lors de l'épreuve de diffusion en tube. Au lait témoin négatif et au lait contenant de la pénicilline est ajouté un lait témoin positif contenant de la sulfaméthazine ($250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dont le résultat doit être positif (inhibition de la croissance microbienne) en l'absence de *p*-ABA et négatif (croissance microbienne) en présence de *p*-ABA dans le milieu.

6.3.2.4. Interprétation des résultats

La coloration jaune du milieu après incubation indique que l'échantillon de lait ne contient pas de substances inhibitrices à un niveau décelable. Le maintien de la coloration violette du milieu indique la présence de substances inhibitrices dans le lait. La coloration partielle (partie de la gélose, coloration jaune-vert ou mauve-jaune) renseigne sur la présence d'agents retardant le métabolisme.

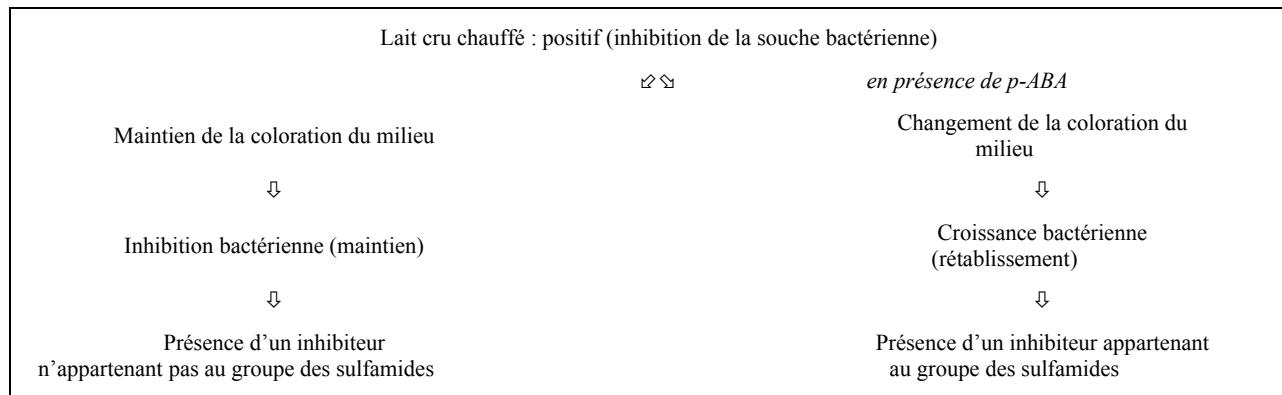


Figure 6-1. Interprétation du résultat de la mise en évidence des sulfamides

La confrontation des résultats obtenus en présence et en l'absence de *p*-ABA permet de tirer des conclusions quant à la présence éventuelle de sulfamides dans l'échantillon de lait : si le résultat devient négatif en présence de *p*-ABA, l'échantillon contient des sulfamides et éventuellement d'autres inhibiteurs à des teneurs indécelables. Par contre, si le résultat positif se

maintient, l'échantillon contient d'autres inhibiteurs et éventuellement des sulfamides (**Figure 6-1**).

6.3.3. Mise en évidence des pénicillines

Un disque de papier absorbant imprégné du lait à analyser est déposé sur la surface d'un milieu gélosé ensemencé avec *Gsc*. La croissance normale du micro-organisme provoque un virage de la coloration du milieu gélosé et rend le milieu trouble après incubation. La présence d'une zone parfaitement translucide autour de la pastille de papier indique la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon de lait. Le diamètre de la zone d'inhibition est fonction de la nature de l'inhibiteur et de sa concentration.

L'action d'une enzyme, la pénicillinase, détruit le noyau β -lactame des antibiotiques du groupe de la pénicilline. Le résultat de cette action se traduit par la disparition de la zone d'inhibition autour de la pastille.

6.3.3.1. Milieux, solutions et micro-organisme test

Le milieu d'essai correspond au milieu préparé pour la diffusion en tube (*6.3.1. Méthode de diffusion en tube*).

A ce milieu s'ajoutent la préparation de la solution de pénicillinase et la préparation de la suspension de *Gsc*.

Solution de pénicillinase

Une quantité de pénicillinase est diluée avec de l'eau osmosée stérile de manière à obtenir une concentration finale de 40.000 U.I. \cdot mL $^{-1}$.

Culture fraîche de *Geoacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

La culture fraîche est obtenue en repiquant, dans le milieu liquide, la souche au départ d'un tube incliné :

20 mL de milieu liquide sont prélevés stérilement et filtrés au moyen d'un Acrodisc[®] dans un erlenmeyer stérile. Le milieu liquide est ensemencé avec la souche prélevée sur le tube incliné au moyen d'une anse de platine. L'rlenmeyer est mis à incuber 16 à 18 heures à 55°C.

Milieu liquide

Composition

Extrait de levure : 1 g
Tryptone : 2 g
Glucose : 0,05 g
Eau distillée : 86 mL
NaOH N/9 : 14 mL

Préparation

Dissoudre les différents constituants dans l'eau et ajouter la soude. Stériliser par filtration.

6.3.3.2. Préparation des boîtes de pétri

Le milieu est fondu et refroidi à 55°C. A 90 mL de milieu d'essai, sont ajoutés stérilement 10 mL de la suspension de *Gsc* fraîchement obtenue. Le mélange ainsi obtenu est homogénéisé soigneusement et réparti en boîte de pétri (6 mL par boîte de 90 mm de diamètre). Les boîtes solidifiées sur une surface plane sont ensuite retournées.

6.3.3.3. Préparation des échantillons

A 9,75 mL de lait à tester sont ajoutés 0,25 mL de solution de pénicillinase (rapport échantillon/solution de pénicillinase : 39/1). L'échantillon ainsi préparé est mis à incuber à 37°C pendant 90 minutes.

6.3.3.4. Mode opératoire

L'échantillon de lait est mélangé avant analyse (homogénéisation et dispersion de la matière grasse). Un disque de papier est plongé dans l'échantillon jusqu'à être bien imprégné. Le surplus de lait est éliminé en pressant le disque contre la paroi du flacon. Le disque est alors placé bien à plat sur la gélose.

Pour chaque échantillon, un disque est imprégné de la solution obtenue après incubation en présence de pénicillinase (6.3.3.3. *Préparation des échantillons*).

Les boîtes de pétri sont mises à incuber à 55°C. Les zones claires obtenues autour des disques de papier sont mesurées après 3 et 24 heures d'incubation.

6.3.3.5. Interprétation des résultats

Les zones claires obtenues avant et après incubation en présence de pénicillinase sont comparées pour un même échantillon (**Figure 6-2**).

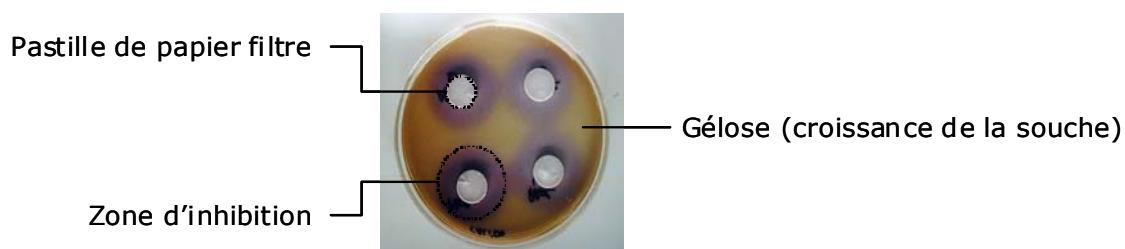


Figure 6-2. Exemple de résultats avec zone d'inhibition

Si aucune zone claire n'est présente pour l'échantillon non traité à la pénicillinase, les substances inhibitrices présentes dans le lait ne sont pas des antibiotiques à noyau β -lactame.

Il peut exister différents cas, reflétant l'activité des antibiotiques sur la souche test (**Schéma 6-1**). Pour un échantillon présentant une zone d'inhibition sur lait cru (A), la zone d'inhibition obtenue pour le même échantillon après incubation en présence de pénicillinase est comparée à la zone d'inhibition initiale. Trois situations peuvent alors se présenter : la zone est maintenue (B), la zone disparaît partiellement (C) ou la zone disparaît totalement (D).

Si la zone claire est maintenue (B) après action de la pénicillinase, l'échantillon contient des antibiotiques non sensibles à l'enzyme utilisée.

Si la zone claire disparaît partiellement après action de la pénicillinase (C), l'échantillon contient des antibiotiques à noyau β -lactame, sensibles à la pénicillinase employée et d'autres substances inhibitrices auxquelles la bactérie utilisée est sensible.

Si la zone claire présente pour l'échantillon non traité disparaît complètement après action de la pénicillinase (D), l'échantillon contient des antibiotiques à noyau β -lactame sensible à la pénicillinase employée et éventuellement, des antibiotiques non décelables par la bactérie utilisée.

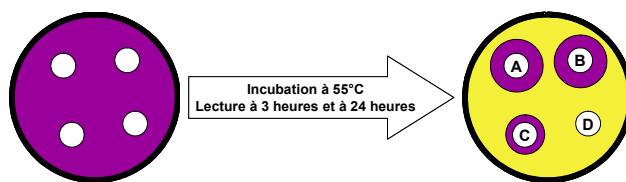


Schéma 6-1. Principe de détection sur boîte de pétri des antibiotiques à noyau β -lactame

L'estimation de la concentration peut se faire par rapport au diamètre d'inhibition obtenu pour la solution standard de pénicilline ($4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Les résultats sont alors exprimés en « équivalents pénicilline ».

6.3.4. Delvotest[®] SP (Gist-Brocades)

6.3.4.1. Principe du test

Le Delvotest[®] SP est un test microbiologique basé sur le principe de la diffusion en tube : un milieu gélosé est ensemencé au moyen de spores de *Gsc* C953, souche particulièrement sensible à de nombreux antibiotiques, notamment à la pénicilline et aux autres antibiotiques à noyau β -lactame. Après addition de nutriments et une incubation à 64°C , les spores germent et produisent l'acide lactique responsable du virage d'un indicateur de pH coloré (pourpre de bromocrésol). Lorsque le lait contient une substance inhibitrice, celle-ci va diffuser dans la

gélose et, si elle s'y trouve en quantité suffisante, inhiber la croissance de la souche et la production d'acide lactique. La coloration de la gélose après incubation renseigne donc sur la présence d'un inhibiteur dans le lait.

6.3.4.2. Interprétation des résultats

Lorsque aucun inhibiteur n'est présent dans l'échantillon de lait, la souche peut se multiplier normalement et produire l'acide lactique nécessaire au virage de l'indicateur coloré du violet au jaune endéans 2 h 45 à 3 h 00 (nécessité d'utiliser un lait témoin négatif).

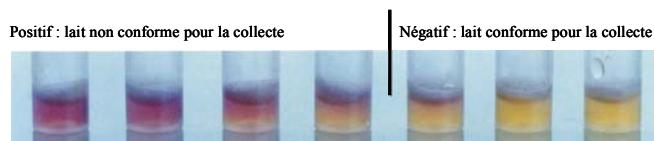


Figure 6-3. Interprétation des résultats du Delvotest® SP (Données DSM)

Si un inhibiteur empêche le développement de la souche et la production d'acide lactique, la gélose reste violette après ce même temps d'incubation (**Figure 6-3**).

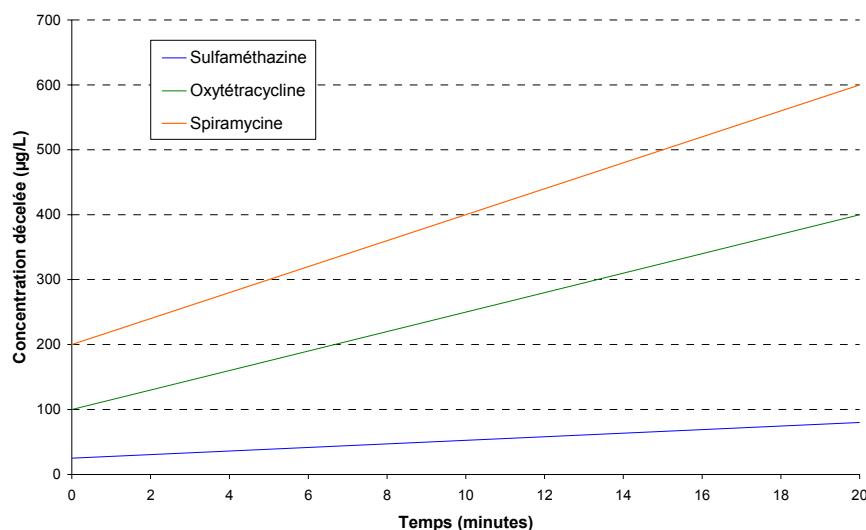


Figure 6-4. Effet d'une incubation prolongée sur la sensibilité du Delvotest® SP (le temps $t = 0$ correspond au moment où la sensibilité est maximale – virage de l'indicateur) (Données DSM)

Pour utiliser le Delvotest® SP à sa sensibilité maximale, il est impératif d'effectuer la lecture au moment où la gélose correspondant à un lait témoin négatif (lait exempt d'agents inhibiteurs) change de coloration (virage de violet à jaune). En effet, le Delvotest® SP perd de sa sensibilité pour les antibiotiques avec l'allongement de la durée d'incubation. L'effet « Temps

d'incubation » est variable en fonction des composés (**Figure 6-4**) : une augmentation de la durée d'incubation de 20 minutes fait passer la limite de détection de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour l'oxytétracycline, de 20 à 60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la sulfaméthazine et de 200 à 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la spiramycine. Pour conserver la sensibilité optimale, il est possible d'utiliser un lait de référence, exempt de substances inhibitrices, qui déterminera le moment optimum de la lecture. C'est à partir de ce moment que la perte de sensibilité se fera sentir.

6.3.5 Valio T101® (Sanofi Bio-Industries)

6.3.5.1. Principe du test

Tout comme le Delvotest®SP, le Valio T101® est un test microbiologique basé sur l'aptitude que présentent certaines bactéries à produire de l'acide lactique en l'absence d'agent inhibiteur. L'acidification du milieu est révélée par un indicateur de pH.

La bactérie présente dans ce test est une bactérie lactique utilisée dans la fabrication de fromage et de yoghourt. Il s'agit d'une souche de *Streptococcus thermophilus* particulièrement sensible aux antibiotiques injectés lors du traitement de mammites. La souche utilisée rapproche le Valio T101® du test officiel mis en oeuvre en Belgique avant le 1^{er} octobre 1994 (épreuve au STS).

6.3.5.2. Interprétation des résultats

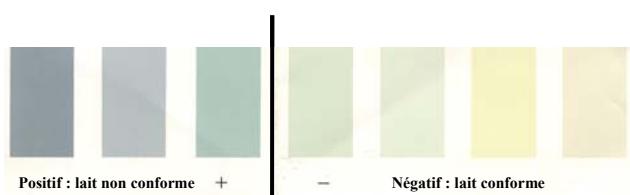


Figure 6-5. Valio T101® - test et interprétation des résultats

La coloration du milieu obtenue suite à l'acidification est comparée à une échelle de couleur fournie par le fabricant (**Figure 6-5**) : si le milieu devient jaune et précipite, le lait ne contient pas d'antibiotiques décelables, par contre, si le milieu reste liquide et violet, le lait contient des agents inhibiteurs. La lecture des résultats doit se faire à la fin de l'incubation (4h30).

6.3.6. Penzym®S (UCB BioProducts)

6.3.6.1. Principe du test

Le test Penzym®S appartient au groupe des tests dits rapides : sa réponse est obtenue après une vingtaine de minutes. La détection des antibiotiques à noyau β -lactame mise en œuvre dans ce test est basée sur une association d'enzymes (Figure 6-6) (Laloux J. *et al.*, 1982). La première enzyme intervenant dans le mécanisme de mise en évidence (DD-Carboxypeptidase) présente deux caractéristiques importantes : la première repose sur une activité spécifique de certains substrats (R-DAla-DAla) [DAla : DAlanine] et la seconde correspond à son inhibition par les antibiotiques à noyau β -lactame. Cette première réaction peut être mise en évidence par l'oxydation d'un indicateur coloré par l'eau oxygénée produite lors de la dégradation de DAla en pyruvate par la seconde enzyme (D-Amino-Oxydase).

Ces deux propriétés sont à la base même du test Penzym® : une DD-carboxypeptidase est mise en présence d'un échantillon de lait susceptible de contenir des antibiotiques à noyau β -lactame. L'absence d'antibiotiques permet la réaction enzymatique conduisant à la libération de DAla. La dégradation de DAla conduit alors à l'oxydation de l'indicateur coloré. Les antibiotiques à noyau β -lactame présents dans l'échantillon de lait vont former un complexe avec la DD-carboxypeptidase et inhiber ainsi la première étape de la réaction.

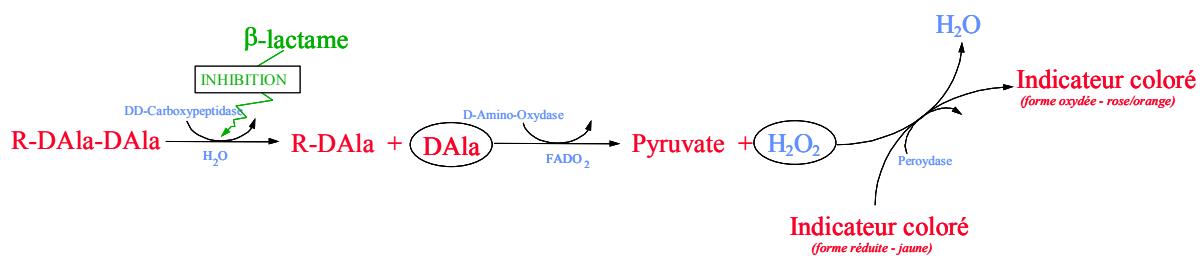


Figure 6-6. Principe du fonctionnement du Penzym®S

6.3.6.2. Interprétation des résultats

L'absence d'antibiotiques à noyau β -lactame se traduit par un changement de coloration évalué sur une échelle colorimétrique, dont les nuances définiront les zones de concentration : jaune correspond à une concentration en pénicilline G supérieure à $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, rose à une concentration inférieure à $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, une coloration intermédiaire correspondant à une concentration comprise entre ces deux valeurs.

6.3.7. Collecte des échantillons

Pour obtenir les échantillons de lait récoltés sur le terrain après traitement d'une pathologie, une structure pyramidale ayant CRAW-D7 (anciennement « *Station laitière* » du Ministère fédéral de l'Agriculture) comme pointe et les producteurs laitiers comme base a été mise en place (**Figure 6-7**). Afin d'optimaliser le fonctionnement de cette structure, deux intermédiaires ont été ajoutés : les centres provinciaux de la Fédération de Lutte contre les Maladies du Bétail (FLMB) et les vétérinaires praticiens. En effet, un suivi à la ferme n'est envisageable que si les différents acteurs de la filière collaborent étroitement.

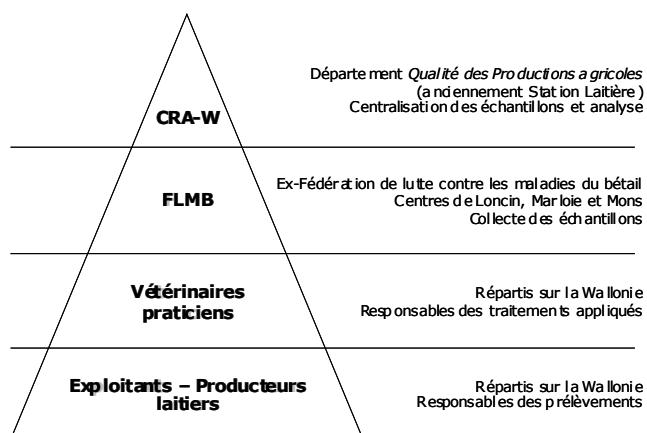


Figure 6-7. Structure de collecte des échantillons de lait

Les vétérinaires sont les mieux placés pour sélectionner les producteurs laitiers susceptibles de collaborer et pour connaître effectivement les traitements appliqués dans ces exploitations. Les centres provinciaux de la FLMB ont, quant à eux, une grande expérience du ramassage et du traitement de nombreux échantillons collectés directement à la ferme. De plus, la centralisation des échantillons au niveau de ces centres limitent fortement les déplacements à effectuer.

Lors de chaque traitement appliqué, le vétérinaire complète une fiche (annexe 1) reprenant les informations relatives au médicament utilisé et à la pathologie traitée.

Les échantillons récoltés par les producteurs sur les conseils des vétérinaires après un traitement aux antibiotiques ou sulfamides sont acheminés aux centres FLMB où ils sont récupérés par le *Département Qualité* qui se charge de leur analyse. Les échantillons de lait sont congelés sitôt leur prélèvement et ils sont maintenus dans cet état jusqu'à analyse.

6.4. Résultats

La structure mise en place pour la collecte des échantillons (**Figure 6-7**) a permis de suivre des animaux traités provenant de toute la Wallonie.

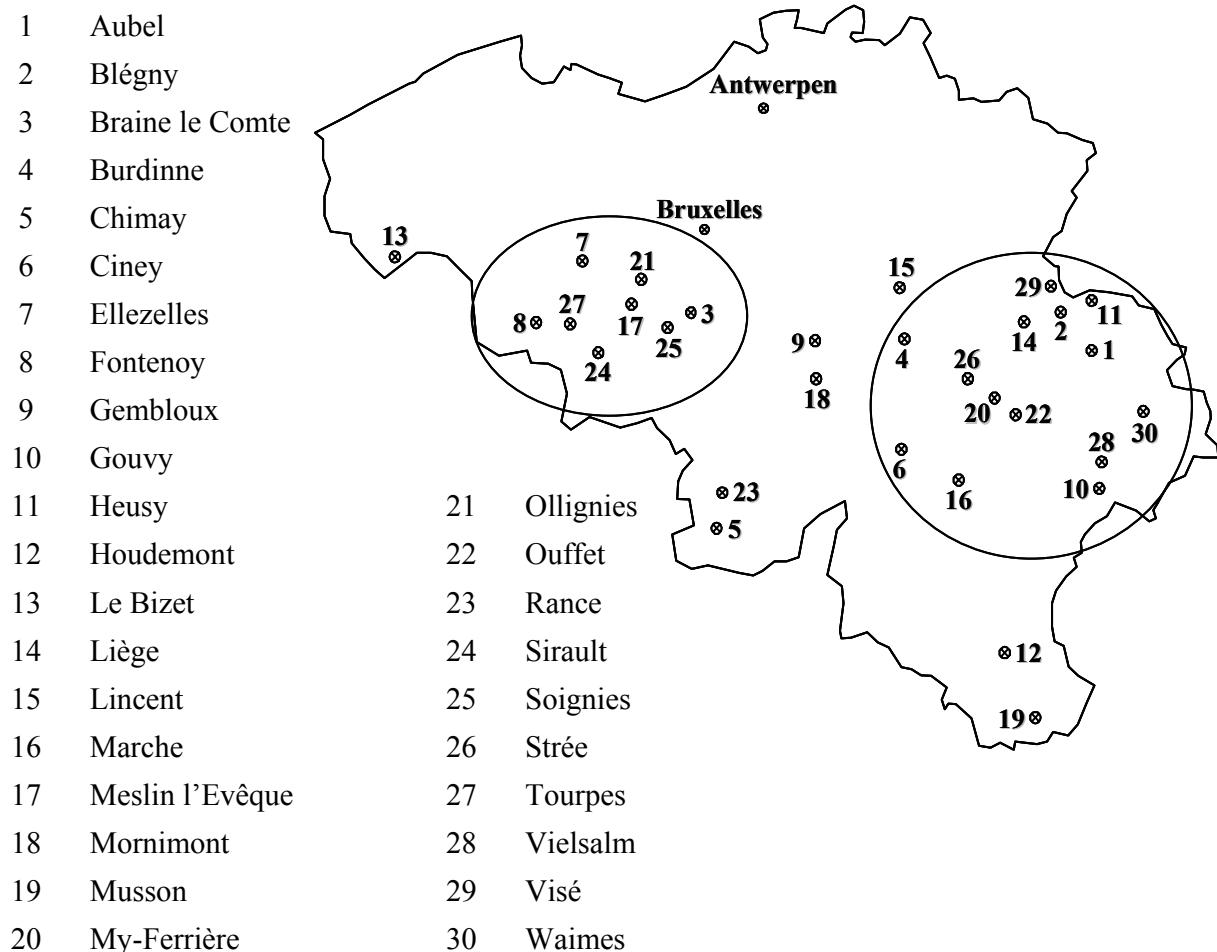


Figure 6-8. Répartition géographique des échantillons de lait prélevés et analysés

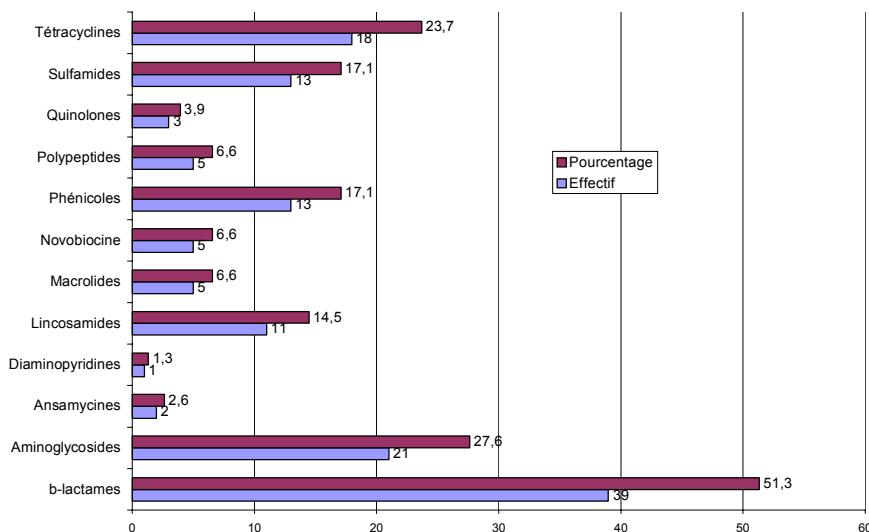
Le réseau de collecte d'échantillons mis en place a cependant été étendu aux fermes expérimentales de diverses institutions (Faculté de Médecine Vétérinaire – Université de Liège, CRAW-D6, Institut supérieur industriel – Huy, Institut Saint-Quentin – Ciney).

Le nuage de localités obtenu (**Figure 6-8**) montre que l'intérêt des producteurs et des vétérinaires est plus important dans les zones à vocation laitière (région hennuyère et région liégeoise) : les impacts financiers de la non-qualité du lait liée à la présence de résidus d'antibiotiques sur le fonctionnement d'une exploitation restent fonction de sa taille.

Tableau 6-2. Nature et nombre des infections suivies

Nature de l'infection	n	%	Nature de l'infection	n	%
Ballonnement du rumen	1	1,4	Mammite	22	29,7
Blessure au canal du trayon	1	1,4	Métrite	18	24,3
Bronchite	1	1,4	Pneumonie	1	1,4
Césarienne – Vêlage	4	5,4	Rétention d'arrière-faix	2	2,7
Endométrite	2	2,7	Réticulite traumatique	1	1,4
Furoncle inter digité	3	4,1	Tarissemant	7	9,5
Grippe	2	2,7	Virose	1	1,4
Laryngite	1	1,4	Sans indication	2	2,7
Lésion au pied	5	6,8			

Cependant, le manque d'incitants financiers et la crainte du renforcement d'une législation déjà particulièrement stricte découragent bon nombre de producteurs à collaborer à ce genre d'études. Cela se traduit directement par un nombre d'échantillons analysés relativement faible. Cette attitude de refus de collaboration change radicalement lors de la confrontation directe avec une contamination aux résidus antibiotiques.

**Figure 6-9.** Répartition des groupes d'antibiotiques dans le traitement des diverses pathologies rencontrées

La nature des pathologies suivies (**Tableau 6-2**) permet de mettre en évidence la prise de conscience du vétérinaire face aux traitements appliqués par voie intra-mammaire (mammites 29,7 %, traitement au tarissement 9,5 % et traitement d'autres pathologies des trayons 1,4 % – soit 40,7 % des échantillons).

Tableau 6-3. Répartition des différents antibiotiques rencontrés

Antibiotiques	Traitements	Médicaments	Antibiotiques	Traitements	Médicaments
Amoxicilline ^a	3	1	Oxacilline ^a	1	1
Ampicilline ^a	1	1	Oxytétracycline ^c	8	5
Céfalexine ^a	3	1	Pénicilline ^a	27	7
Céfuroxime ^a	1	1	Polymyxine ⁱ	5	1
Céphacétrile ^a	2	1	Rifamycine ^j	2	1
Céphalonium ^a	6	1	Spectinomycine ^d	2	1
Chloramphénicol ^b	13	4	Spiramycine ^h	3	2
Chlortétracycline ^c	2	1	Streptomycine ^d	4	1
Cloxacilline ^a	4	1	Sulfadiazine ^k	6	1
Dihydrostreptomycine ^d	10	3	Sulfadimidine ^k	10	2
Enrofloxacine ^e	1	1	Sulfamétoxydiazine ^k	1	1
Gentamicine ^d	3	1	Sulfamérazine ^k	5	1
Kanamycine ^d	5	2	Sulfatiazol ^k	5	1
Lincomycine ^f	11	2	Sulfatolamide ^k	2	1
Néomycine ^d	14	2	Tétracycline ^c	5	1
Novobiocine ^g	5	1	Triméthoprime ^l	1	1
Oléandomycine ^h	3	1			

^a : β-lactames – ^b : phénicols – ^c : tétracyclines – ^d : aminoglycosides – ^e : quinolones – ^f : lincosamides – ^g : novobiocine – ^h : macrolides – ⁱ : polypeptides – ^j : ansamycines – ^k : sulfamides – ^l : diaminopyrides

Traitements : nombre de traitements dans lesquels la molécule est utilisée

Médicaments : nombre de médicaments dans lesquels la molécule est utilisée

Bien que n'étant pas représentatives d'une situation réelle, elles renseignent aussi sur les questions posées sur les délais d'attente à respecter lors de l'application d'un traitement par une autre voie, notamment lors de traitements appliqués par voie intra-utérine (métrite 24,3 %, endométrite 2,7 %, rétention d'arrière-faix 2,7 % – soit 29,7 % des échantillons).

Afin d'évaluer la fréquence d'utilisation des antibiotiques, le relevé des molécules mises en œuvre dans les traitements a été réalisé (**Tableau 6-3**). La répartition des antibiotiques par groupe (**Figure 6-9**) montre que les antibiotiques à noyau β-lactame restent les plus utilisés : 51,3 % des pathologies traitées le sont avec au moins un antibiotique de ce groupe.

Ce pourcentage passe à 24,3 % si on répertorie les traitements pour lesquels seul le groupe des β-lactames est mis en œuvre.

Cette constatation permet d'orienter la recherche des résidus dans le lait vers cette famille de molécules. Cependant, il ne faut pas perdre de vue l'importance des amino-glycosides et des tétracyclines, utilisées pour respectivement 27,6 % et 22,4 % des pathologies.

Le groupe des phénicoles est quant à lui présent dans le traitement de 17,1 % des pathologies. Ce chiffre est particulièrement élevé puisqu'il ne correspond pratiquement qu'au seul chloramphénicol. En 1994, cette molécule a été interdite d'utilisation sur les animaux dont les produits (viande, lait, miel, ...) sont destinés à la consommation humaine⁴³. Signalons que la collecte des échantillons analysés était antérieure à l'interdiction d'utiliser le chloramphénicol.

6.5. Discussion

La première comparaison qui peut être effectuée sur les kits disponibles pour la ferme repose sur les limites de sensibilité annoncées par les firmes et sur la sélectivité des kits étudiés. Ces limites de sensibilité seront d'autre part comparées aux limites maximales de résidus (LMR) reprises dans la législation européenne⁴⁴.

Le tableau 6-4 fait état des limites de détection déterminées pour l'un ou l'autre des kits étudiés pour des antibiotiques repris dans la législation européenne au 1^{er} janvier 2001. Le tableau 6-5 complète cette liste avec les antibiotiques pour lesquelles une limite de détection n'était pas encore déterminée à cette date.

La législation européenne est particulièrement complexe en ce qui concerne les LMR des antibiotiques : pour la soixantaine de molécules répertoriées (**Tableau 6-4 – Tableau 6-5**), ces LMR varient de 0 (molécules interdites d'utilisation) à plusieurs centaines de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (néomycine : 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb). De plus, elle est évolutive. Ainsi, le règlement initial est régulièrement complété par de nouvelles modifications de ses annexes, augmentant le nombre de molécules dont il faut contrôler la présence. De plus, de nouveaux tests viennent régulièrement prendre place sur le marché de la détection des résidus, qu'il s'agisse de tests généraux de type microbiologique ou des test spécifiques de type ELISA ou « *receptor test* ».

⁴³ Anonyme – Règlement (CEE) de la Commission 1430/94 du 22 juin 1994 – JO L156-6 du 23 juin 1994

⁴⁴ Anonyme – Règlement (CEE) du Conseil 2377/90 du 26 juin 1990 – JO L224-1 du 18.08.1990

Tableau 6-4. Limites de détection ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) annoncées par les firmes productrices de kits de détection (1^{er} janvier 2001)

Antibiotiques		LMR (lait)	Statut	Delvotest® SP CT	Delvotest® SP 2h45 – 3h00	Penzym®	Valio T101®
Pénicillines	benzylpénicilline	4	définitif	2	2,5	2-4	5
	ampicilline	4	définitif	2-3	3-5	4-7	
	amoxicilline	4	définitif	2	3-5	3-4	
	oxacilline	30	définitif	5	10		
	cloxacilline	30	définitif	15	15-25	30-70	100-200
	dicloxacilline	30	définitif	10	10-15		
	nafcilline (intramammaire)	30	définitif	5	5-10		
Céphalosporines	ceftiofur (non intramammaire)	100	définitif	< 50	50-70		
	cefapirine	60	définitif	5	5-10	3-5	
	cefacetril (intramammaire)	125	définitif	20	20-40		
	cefaoperazone	50	définitif	40	60-100		
	cefalexine	100	définitif	40-60	60-100	15-25	
	cefalonium	20	définitif	5-10	10-25	4-8	
Tétracyclines	tétracycline	100	définitif	100	200-600		100-200
	oxytétracycline	100	définitif	100	200-500		
	chlortétracycline	100	définitif	100-150	200-600		
Aminoglycosides	(néo)spiramycine	200	définitif	200	350-ns		300-500
	tylosine	50	définitif	10-20	30-100		
	érythromycine	40	définitif	50	100-250		50
Macrolides	streptomycine	200	définitif				500-600
	dihydrostreptomycine	200	définitif	300-500	1500-10000		
	gentamicine	100	définitif	100-300	200-500		
	néomycine (+ framycétine)	1.500	définitif	100-200	100-200		
	kanamycine	150	01/01/20 04	2500	7500-ns		
Phénicols	chloramphénicol		usage interdit	2500	7500-10000		500-1000
Lincosamides	lincomycine	150	définitif	100	200-400		
Sulfamides	groupe	100	définitif				
	sulfadiazine			50	50-100		
	sulfaméthazine			25	50-200		500-1500
	sulfadiméthoxine			50	50-100		
	sulfathiazole			50	50-150		
Diaminopyridine	triméthoprime	50	définitif	50	100-500		
Autres	dapson		usage interdit	1	1-8		

CT : control time – moment de virage au jaune de la gélose correspondant à un échantillon blanc négatif

--- : ne pas appliquer sur bétail laitier

Tableau 6-5. Liste des antibiotiques repris dans le règlement 2377/90 du Conseil n'ayant pas de limite de détection pour l'un des kits étudiés, au 1^{er} janvier 2001

Antibiotiques		LMR	Statut
Pénicillines	pénéthamate	4	définitif
Tétracyclines	doxycycline	---	définitif
Macrolides	tilmicosine	50	définitif
	spectinomycine	200	définitif
Aminoglycosides	apramycine	---	définitif
	paromomycine	---	définitif
	marbofloxacine	75	définitif
	danofloxacine	30	définitif
Quinolones	Difloxacine	---	définitif
	enrofloxacine (+ciprofloxacine)	100	définitif
	fluméquine	50	définitif
Polymyxines	Colistine	50	définitif
Ansamycines	Rifaximine	60	définitif
Phénicoles	thiamphénicol	50	définitif
Lincosamides	pirlimycine	100	définitif
Inhibiteurs de β -lactamase	Acide clavulanique	200	définitif
Polypeptides	Bacitracine	100	définitif
Autres antibiotiques	novobiocine	50	définitif
Diaminopyrimidine	baquiloprime	30	définitif
Nitrofuranes	groupe (furazolidon, ...)		usage interdit
	Ronidazol		usage interdit
Nitro-imidazoles	dimetridazol		usage interdit
	metronidazol		usage interdit

--- : ne pas appliquer sur bétail laitier

En effet, depuis la parution du règlement 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale, de nombreuses modifications de ce règlement de base ont été publiées. Il est donc difficile pour un test, de suivre cette évolution. Tout au plus peut on l'évaluer à posteriori par rapport aux limites nouvellement définies.

L'importance de la durée d'incubation se traduit directement sur les limites de détection annoncées pour le Delvotest[®] SP : le passage de la lecture au « *Control Time* », généralement aux environs de 2 h 25 – 2 h 30 à une lecture après 2 h 45 d'incubation, diminue de manière

significative la sensibilité du test à certains antibiotiques (de 2.500 à 7.500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le chloramphénicol alors que la molécule est interdite !).

Tableau 6-6. Coût comparés des trois kits étudiés (cas d'une vache BBB, traitée avec 30 mL de Pénicilline 30.000.000[®] pour réticulite traumatique)

	Delvotest [®] SP	Penzym S [®]	Valio [®] T 101
Coût unitaire (test)	1,10	2,50	0,90
Nombre de tests utilisés	7	7	7
Nombre de traites éliminées	6	6	6
Volume d'une traite (litres)	6	6	6
Volume de lait éliminé (litres)	36	36	36
Coût des tests utilisés	7,70	17,50	6,30
Coût du lait éliminé	36 * 0,30 = 10,80	10,80	10,80
Total	€ 18,50	€ 28,30	€ 17,10
Investissement du kit (valisette)	€ 200	€ 200	€ 135

L'allongement du temps d'incubation à 3 h 00 (temps recommandé pour une utilisation à la ferme), augmente encore la différence par rapport au *control time* (pour tous les antibiotiques testés). Il est donc illusoire de comparer certains résultats obtenus à la ferme et lors d'un contrôle au laboratoire, les temps d'incubation mis en œuvre conduisant à des sensibilités différentes. Il est à noter qu'aucun de ces trois kits, disponibles pour le terrain, ne permet de répondre totalement aux exigences de la législation. Le kit microbiologique (Delvotest[®] ou Valio[®]) présente cependant l'intérêt de couvrir une gamme de molécules plus large par rapport au test enzymatique (Penzym[®]).

Une seconde comparaison se rapporte aux coûts comparés de l'utilisation de ces kits à la ferme (**Tableau 6-6**) : quel peut être le surcoût engendré par ces tests par rapport au risque de pénalisation encouru par le producteur ?

Depuis le 1^{er} janvier 2001, le contrôle de la qualité du lait a été renforcé en matière de résidus d'antibiotiques : chaque livraison de lait est dès lors contrôlée. Ce renforcement du rythme des contrôles a augmenté le risque de mettre en évidence un lait contaminé.

L'exemple utilisé donné dans le tableau 6-6 ne doit pas conduire à une pénalisation : volume de lait trait de l'ordre de 6 litres et des concentrations en pénicilline dans les traites positives qui ne sont pas suffisantes pour contaminer le tank (**Tableau 6-7**).

Tableau 6-7. Résultats des tests de détection obtenus pour le lait des dix traites recueillies après traitement (vache BBB, traitée avec 30 mL de Pénicilline 30.000.000[®] pour réticulite traumatique)

Traite	Delvotest [®] SP	Penzym [®] S	Valio T 101 [®]	Méthode en boîte de pétri (3 heures) – diamètre d'inhibition
1	+	+	+	30 mm
2	+	+	+	25 mm
3	+	+	+	23 mm
4	+	+	+	19 mm
5	+	+	+	17 mm
6	+	+	+	17 mm
7	-	-	-	16 mm
8	-	-	-	15 mm
9	-	-	-	non mesurable
10	-	-	-	non mesurable
Standard pénicilline 4 ppb	+	+	+	17 mm
Blanco	-	-	-	-

Cet exemple constitue le cas idéal : une seule molécule mise en œuvre dans le traitement, une concordance parfaite entre les résultats des différents tests et une évaluation de la concentration qui respecte les résultats des tests (la traite 7 présente un diamètre d'inhibition inférieur au diamètre de la référence de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LMR pour la pénicilline). Cependant, ces cas où une seule molécule est utilisée dans un traitement se rencontrent rarement dans la pratique.

Pour les situations suivies, 28 traitements (37,8 %) étaient basés sur une seule molécule active. Les autres résultats montrent plus de divergences entre les tests. Un autre cas illustre ces divergences (**Tableau 6-8**). Pour ce cas, les deux tests microbiologiques donnent des résultats différents (7 traites positives pour le Delvotest[®]SP contre 4 pour le Valio T101[®]). Il est de plus illusoire d'utiliser le Penzym[®]S sur ces échantillons : le Penzym[®] ne détecte que les antibiotiques à noyau β -lactame et le Sulfaphénicol[®] est composé de chloramphénicol et de sulfadimidine.

Les résultats globaux obtenus lors de la comparaison des différentes méthodes appliquées aux échantillons de lait collectés après traitement montrent de sensibles différences entre les tests (**Tableau 6-9**). Le Delvotest[®]SP est utilisé comme référence dans cette comparaison puisqu'il est repris comme méthode officielle de contrôle de la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait.

Tableau 6-8. Résultats des tests de détection obtenus pour le lait des dix traites recueillies après traitement (vache traitée avec 2 * 75 mL de Sulfaphénicol® en intra-utérin pour métrite)

Traite	Delvotest® SP	Penzym® S	Valio T 101®	Méthode en boîte de pétri (24 heures) – diamètre d'inhibition
1	+	n.d.	+	23 mm
2	+	n.d.	+	22 mm
3	+	n.d.	+	22 mm
4	+	n.d.	+	20 mm
5	+	n.d.	-	21 mm
6	+	n.d.	-	25 mm
7	+	n.d.	-	18 mm
8	+/-	n.d.	-	16 mm
9	-	n.d.	-	18 mm
10	-	n.d.	-	15 mm
Standard pénicilline 4 ppb	+	+	+	23 mm
Blanco	-	-	-	-

n.d. : non déterminé

La discordance observée entre la méthode de diffusion en tube et le Delvotest® SP (91 %) a conduit à la simplification de la méthode officielle : à partir de 2000, seul le Delvotest® MCS était utilisable comme méthode de détection des antibiotiques dans le lait, selon un schéma analytique bien défini.

L'origine de la discordance repose d'une part sur la difficulté d'obtenir des tests qui présentent les mêmes sensibilités alors qu'ils sont préparés dans des laboratoires différents et d'autre part sur la constance du test commercial (homogénéité dans le temps). La différence de sensibilité du test se vérifiait fréquemment lors de la mise en place d'analyses inter-laboratoires : les seuils de détection atteints étaient particulièrement variables lorsque les laboratoires devaient préparer le stock de spores et les tests les utilisant. L'intérêt du Delvotest® réside notamment dans la diminution du temps d'incubation nécessaire à l'obtention des résultats : les 4 h 30 nécessaires pour la diffusion en tube se réduisent à une incubation de 2 h 30 à 3 h 00 lors de l'usage d'un test commercial.

En ce qui concerne les échantillons analysés au moyen du Penzym® S, seuls les laits susceptibles de contenir des antibiotiques à noyau β -lactame ont été analysés. C'est pour cette raison que le nombre d'échantillons est nettement plus restreint. La discordance mise en

évidence entre le Penzym®S et le Delvotest®SP repose sur le fait que les β -lactames sont rarement utilisés seuls (17 traitements pour 19 contenant au moins un β -lactame).

Tableau 6-9. Comparaison des résultats obtenus pour les trois kits commerciaux et pour la méthode de diffusion en tube – le Delvotest®SP est pris comme référence

	Diffusion en tube	Valio T101®	Penzym®S
Effectif de comparaison	946	647	223
Concordance	861 (91,0 %)	524 (81,0 %)	188 (84,3 %)
Delvotest® SP positif – Test négatif	63 (6,7 %)	33 (5,1 %)	21 (9,4 %)
Delvotest® SP négatif – Test positif	4 (0,4 %)	23 (3,5 %)	0 (0,0 %)
Douteux	18 (1,9 %)	67 (10,4 %)	14 (6,3 %)

La concordance passe à 92,0 % lorsque l'on considère les échantillons provenant de ces 17 traitements. Les 8 % de discordance (essentiellement Delvotest® positif et Penzym® négatif) se retrouvent pour des traitements à base de procaïne benzylpénicilline injectée par voie intramusculaire. Il est difficile d'expliquer cette différence puisque les deux tests présentent une sensibilité semblable à la benzylpénicilline (**Tableau 6-4**). Aucune information n'est cependant disponible quant à la forme de la benzylpénicilline (procaïne utilisée dans des formulations à élimination rapide ou benzathine utilisée dans des formulations retard).

La comparaison Valio T101® – Delvotest®SP montre que la souche utilisée dans le Valio T101® est sensible à un nombre moins élevé d'antibiotiques que celle contenue dans le Delvotest®. L'utilisation du Valio T101® se limiterait donc à mettre en évidence les seuls antibiotiques présentant un inconvénient majeur en technologie laitière. A ce stade, il est important de préciser les notions de faux positifs et de faux négatifs qui pourraient être utilisées ultérieurement dans le texte. En effet, il existe au moins deux manières de considérer un résultat. Dans la première approche, le résultat obtenu est comparé à la sensibilité propre du test : un faux négatif est donc un résultat négatif alors que le résultat attendu est positif (la concentration d'inhibiteurs à détecter est effectivement supérieure à la limite de sensibilité du test mais le résultat est négatif). Le faux positif correspond à la situation inverse : le test donne un résultat positif alors que la quantité d'inhibiteurs à détecter est inférieure à la limite de sensibilité du test. Cette façon de définir faux positifs et faux négatifs sera utilisée lors de l'étude de résultats aberrants lors de la mise en œuvre du Delvotest®SP.

Dans la seconde approche, le résultat est comparé au résultat obtenu (pour le même échantillon) par un test dit « de référence ». Dans ce contexte, un faux positif est donc un résultat positif obtenu avec le test étudié alors que le test de référence donne un résultat négatif et inversement pour le faux négatif. La signification de la discordance entre les deux résultats n'est pas posée, le test de référence faisant office de limite.

Tableau 6-10. Résultats des tests de détection obtenus pour le lait des 7 premières traites recueillies après traitement (vache traitée avec 2 * 25 mL de Lincocin® en intra-musculaire pour virose)

Traite	Delvotest® SP	Penzym® S	Valio T 101®	Méthode en boîte de pétri ^a
1	+	n.d.	+	20 mm
2	+	n.d.	+	16 mm
3	-	n.d.	+	15 mm
4	-	n.d.	+	n.m.
5	-	n.d.	+/-	n.m.
6	-	n.d.	+/-	n.m.
7	-	n.d.	-	n.m.
Standard ^b	+	+	+	17 mm
Blanco	-	-	-	-

^a : incubation de 3 heures – diamètre d'inhibition – ^b : pénicilline 4 ppb

n.d. : non déterminé – n.m. : non mesurable

Une troisième manière de définir un résultat faux positif ou faux négatif consiste à utiliser les limites maximales de résidus comme critère : si le résultat obtenu reste positif pour une concentration donnée inférieure à la LMR, il est considéré comme faux positif. Par contre, si, pour une concentration supérieure à la LMR, le résultat reste négatif, il est considéré comme faux négatif.

Les essais effectués montrent aussi que la notion de délai d'attente est difficile à utiliser dans la pratique. En effet, ce délai est calculé dans des conditions particulières : médicament utilisé seul, dose et application définies et espèce animale donnée. L'application de cocktails de médicaments ou d'une dose plus importante ou de médicament non destiné aux bovins conduit invariablement à des délais non maîtrisés, quel que soit le mode d'injection et quelle que soit la pathologie traitée.

Certaines erreurs sont ainsi constatées dans le choix de certains médicaments : quatre traitements contenaient du *Lincocin® pro injectione* alors que la notice de ce médicament ne

prévoit son utilisation que sur chiens, chats et porcs. Elle précise en outre que le *Lincocin® pro injectione* est contre-indiqué pour les ruminants tout en spécifiant que la lincomycine, molécule active du produit, est excrétée par la bile et par le rein avec une élimination dans le lait. Les résultats obtenus lors de la détection ne sont donc pas surprenants (**Tableau 6-10**). La discordance observée entre le Delvotest® SP et le Valio T101® peut s'expliquer par la différence de sensibilité des deux souches utilisées par rapport à la lincomycine présente dans le lait : pour le Delvotest® SP, la limite de détection est de 100 ppb au *control time* et de 200 à 400 ppb à 2h45 – 3h00 d'incubation, pour le Valio T101®, cette limite est comprise entre 100 et 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

6.6. Conclusions

Cette étude a montré la difficulté d'établir un délai d'attente valable pour tous les cas possibles. En effet, l'association de médicaments (injection de cocktails d'antibiotiques), l'usage prolongé d'une molécule ou un traitement plus important que préconisé par la notice, allongent généralement la période de rémanence des résidus dans le lait, quel que soit le mode d'injection et quelle que soit l'infection traitée. Il est donc fondamental de tenir compte de l'intensité du traitement pour fixer une période de retrait, période durant laquelle le lait est susceptible de donner une réponse positive lors de la détection des résidus inhibiteurs.

Le suivi régulier du lait prélevé sur des vaches ayant subi un traitement à base d'antibiotiques révèle la présence de résidus inhibiteurs dans le lait dans 65 % des cas étudiés. Ces résultats ne signifient pour autant pas que le lait ne respecte pas la législation en matière de LMR. En effet, la sensibilité des tests microbiologiques aux différentes molécules peut conduire à des résultats positifs pour des concentrations inférieures aux LMR.

Pour répondre au second objectif de l'étude, différents kits de détection, susceptibles d'être utilisés à la ferme pour prévenir la contamination du lait de collecte, ont été comparés. Les performances de ces kits sont particulièrement intéressantes. Cependant, il leur est difficile de répondre à l'ensemble de la législation en vigueur (LMR). Le respect de ces limites impose la conception de tests spécifiques, au moins par groupe de molécules. Dès lors, l'utilisation de ce type de tests est conditionnée par la connaissance précise des molécules mises en œuvre, sans quoi l'analyse peut conduire à une réponse totalement erronée. De plus, les tests basés sur l'inhibition bactérienne d'une souche de référence sont difficilement évaluables lorsque plusieurs molécules entrent en ligne de compte. Les effets de la combinaison des antibiotiques présents peuvent s'additionner (effet additif ou synergique) ou s'inhiber (effet antagoniste).

Le producteur qui souhaite livrer un lait conforme à la législation est placé devant un choix :

- soit utiliser un test très sensible à large spectre et réduire ainsi le pourcentage de faux négatifs,
- soit utiliser un test moins sensible et réduire ainsi le risque de faux positifs.

Si l'aspect « Qualité du lait » est primordial, il est essentiel de réduire le risque de faux négatifs. Par contre, si l'aspect économique à court terme est pris en compte, le risque de faux positifs est privilégié.

Le producteur choisit souvent la seconde possibilité, préférant le risque d'être pénalisé !

Les rencontres mises en place pour valoriser l'aspect « Qualité » ont conduit à poser des questions sur certains résultats positifs rencontrés sur le terrain, résultats rarement pris en compte lors de l'évaluation des tests.

CHAPITRE 7 : DELVOTEST® SP : RÉSULTATS FAUX POSITIFS

7.1. Introduction

Certains résultats positifs obtenus lors de l'épreuve de tri (contrôle officiel de la qualité du lait livré aux acheteurs, paramètre « inhibiteurs ») laissent à penser que certains facteurs liés à l'alimentation du troupeau ont un effet sur la mise en évidence des antibiotiques par méthodes microbiologiques.

En effet, plusieurs exploitations se sont retrouvées confrontées à des résultats positifs alors que tout était mis en œuvre pour écarter le lait éventuellement contaminé après un traitement vétérinaire : vaches traitées marquées et mises à l'écart, une dizaine de traites provenant des vaches marquées destinées à l'alimentation des veaux, contrôle des laits individuels par la laiterie avant que le lait de la vache traitée ne soit remis dans le tank, ...

Malgré ces précautions, des résultats positifs pendant des périodes relativement longues (jusqu'à près de quatre mois dans un cas) ont été mis en évidence, avec des conséquences financières particulièrement lourdes pour l'exploitant.

La comparaison des exploitations a montré que ces résultats survenaient généralement en période hivernale, lors d'un changement d'alimentation associant des aliments fermentés de type ensilage et des compléments minéraux. Dans plusieurs exploitations, la qualité des aliments fermentés laissait à désirer, ces derniers présentant de nombreuses poches de moisissures.

7.2. Objectifs

Cet essai vise à montrer l'influence du facteur alimentaire dans la détection des résidus d'antibiotiques par méthode d'inhibition microbiologique et l'incidence que peut avoir l'association « ensilage – minéraux » sur le résultat microbien, sans pour autant remettre en cause la mise en œuvre de ces tests d'inhibition microbienne dans leur fonction de tri.

7.3. Matériel et méthode

7.3.1. Essai préliminaire

Au cours de l'essai préliminaire, mené en collaboration avec le département CRAW-D6, cinq vaches ont été suivies : la détection des substances inhibitrices a été effectuée au moyen du Delvotest®SP sur le lait collecté à chaque traite.

7.3.2. Essai

Cet essai, mené en collaboration avec le Service de nutrition de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'ULg disposant d'une ferme expérimentale et d'un nombre d'animaux plus important, a été décomposé en trois phases (**Tableau 7-1**).

Pour chacune de ces phases, deux échantillons de lait ont été prélevés sur chaque animal à chaque traite durant cinq jours : le premier échantillon était destiné à la détermination du nombre de cellules somatiques, des teneurs en protéine, en matière grasse et en urée (analyses effectuées au laboratoire interprofessionnel chargé de la détermination de la qualité du lait cru livré aux acheteurs – Battice) et le second échantillon était destiné à la détection des substances inhibitrices (Delvotest®SP).

Tableau 7-1. Description des conditions expérimentales pour l'essai mené en collaboration avec la Faculté de Médecine vétérinaire de l'ULg (service de nutrition)

Phase 1		Mois de mars (début)	
		<i>Groupe témoin</i>	<i>Groupe traité</i>
Nombre de vaches	6		7
Complément (apport journalier)	-		100 g/j CMV
Alimentation	Ensilage herbe : 7 kg – ensilage maïs : 7 kg – pulpes séchées, luzerne, soja : 0,5 kg		
Phase 2		Mois de mars (fin)	
		<i>Groupe témoin</i>	<i>Groupe traité</i>
Nombre de vaches	6		7
Complément (apport journalier)	-		200 g/j CMV
Alimentation	Ensilage herbe : 7 kg – ensilage maïs : 7 kg – pulpes séchées, luzerne, soja : 0,5 kg		
Phase 3		Mois de juin	
		<i>Groupe témoin</i>	<i>Groupe traité</i>
Nombre de vaches	4		4
Complément (apport journalier)	-		200 g/j CMV
Alimentation	Herbe en pâture – orge : 1 kg		

Un test complémentaire a été réalisé sur les échantillons présentant un résultat positif après chauffage (10 minutes à 80°C) : 15 µl de pénicillinase (Bacto®Difco) à une concentration de 40.000 UI·mL⁻¹ ont été ajoutés aux 100 µl de lait testés par le Delvotest®SP. Deux échantillons donnant une réponse positive au Delvotest®SP ont été analysés au *Charm HVS-8100®* (DVK ILVO – Melle) permettant l'identification de cinq groupes d'antibiotiques (tétracyclines,

sulfamides, macrolides, aminoglycosides et antibiotiques à noyau β -lactame) et une évaluation de la concentration du groupe présent par rapport à la limite maximale de résidus.

Tableau 7-2. Composition du complément minéral vitaminé (CMV)

Oligo-éléments ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)					
Manganèse (oxyde)	5.000	Zinc (oxyde)	5.000	Sélénium (sélénite de Na)	10
Cobalt (sulfate)	50	Iode (iodate de Ca)	100		
Minéraux (%)					
Phosphore	9	Sodium	5	Magnésium	4
Vitamines ($\cdot\text{kg}^{-1}$)					
A	1.000.000 UI	PP (niacine)	155 mg	B ₃	100 mg
D ₃	200.000 UI	Choline (Cl)	10.000 mg	B ₆	15 mg
E	1.000 mg	B ₁	20 mg	B ₁₂	0,2 mg
K	3 mg	B ₂	75 mg		

Avant chaque phase de l'essai, toutes les vaches suivies ont été testées au Delvotest[®] SP afin de vérifier qu'aucune réponse positive n'était obtenue. Entre les différentes phases de l'essai, toutes les vaches recevaient une alimentation de base identique (**Tableau 7-1**).

La composition du complément minéral vitaminé (CMV) utilisé lors du second essai donne une combinaison minéraux-vitamines particulièrement complète (**Tableau 7-2**).

7.4. Résultats

Les résultats de l'essai préliminaire (**Tableau 7-3**) montrent une interférence : la réponse positive obtenue pour la vache 3 n'est pas liée à la présence d'antibiotiques. En effet, dans cet essai, un délai suffisamment long a été respecté entre la dernière application d'un traitement antibiotique et le début de l'expérimentation.

De plus, la vérification de l'absence d'inhibiteur a été réalisé avant de modifier le régime alimentaire. Les contrôles effectués sur les échantillons ont cependant montré que le lait de la vache 3 présentait une teneur en cellules somatiques relativement élevée : $600.000 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Le résultat positif enregistré serait dès lors une conséquence du lait mammiteux et non plus de la modification du régime alimentaire. En effet, les laits mammiteux présentent des teneurs en lysozyme supérieures à la normale (Carlsson A. & Björck L., 1989). Ainsi, pour le lysozyme

d'œuf, un pH alcalin (de l'ordre de 9) et une température de 65°C sont nécessaires pour conduire à la destruction de cette enzyme (Cunningham F.E. *et al.*, 1991). Un essai portant sur un plus grand nombre d'individus a été mis en place. Au cours de ce second essai, des paramètres complémentaires ont été enregistrés (cellules somatiques, lactation, volume de lait produit).

Tableau 7-3. Résultats obtenus lors de l'essai préliminaire réalisé en collaboration avec le Département *Productions et Nutrition animales* (CRAW) – Détection des antibiotiques dans le lait au moyen du Delvotest® SP après modification du régime alimentaire (ajout d'un complément minéral)

Vache 1	Vache 2	Vache 3	Vache 4	Vache 5
Quantité de complément minéral reçu par jour				
0 g - témoin	100 g	100 g	200 g	200 g
Résultats Delvotest SP avant la complémentation				
négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
Résultats Delvotest SP deux jours après le début de la complémentation				
négatif	négatif	positif	négatif	négatif
Résultats Delvotest SP après l'arrêt de la complémentation				
négatif	négatif	négatif	négatif	négatif

L'apparition de résultats positifs a été confirmée lors de ce second essai (**Tableau 7-4**). Lors de la première phase, toutes les vaches du lot témoin ont donné un lait dont la réponse était négative. Lors de la seconde phase, une vache du lot témoin a donné un lait dont la réponse était positive lors de la dernière traite. Lors de la troisième phase (troupeau en extérieur), tous les résultats observés étaient négatifs.

7.5. Discussion

Les résultats obtenus sur le lait chauffé 10 minutes à 80°C ne diffèrent pas des résultats obtenus sur lait cru : le pouvoir inhibiteur présent dans les échantillons donnant une réponse positive ou douteuse n'a pas été détruit ou simplement diminué par la pasteurisation. L'explication mise en avant lors du premier essai ne peut être utilisée pour ces résultats. En effet, aucune relation entre résultat positif ou douteux et le nombre de cellules somatiques ne peut être établie (**Tableau 7-5**). En effet, les vaches comptant plus de 300.000 cellules·mL⁻¹ ne se comportent pas différemment des autres vaches du groupe, tant pour le lot témoin que pour le lot traité.

Tableau 7-4. Détection des inhibiteurs par le Delvotest® SP sur le lot recevant le complément minéral vitaminé lors du second essai (phase 1 et phase 2)

Vache	Nombre de jours après le début de la phase											
	Phase 1					Phase 2						
	0 à 2	3	3	4	4	0	1	1	2	2	3	3
		M	S	M	S		M	S	M	S	M	S
4	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	d	d	-	d	d	d	d	d	d
11	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	d	d
28	-	-	d	d	d	-	-	-	-	-	-	d
40	-	-	+	+	+	-	d	d	d	d	d	d

+ : positif (gélose violette) ; - : négatif (gélose jaune) ; d : douteux (gélose présentant des reflets jaunes dans le violet - résultats considérés comme positifs) ; M : matin ; S : soir

Remarque : le concentré minéral vitaminé était distribué pour la première fois lors de la traite du jour 0 au matin

La vache 40 a donné une réponse franchement positive lors de la première phase d'essais. Cette vache ne présente pas de caractéristiques de vache malade : elle en est à sa première lactation, le nombre de cellules somatiques n'est pas anormal et la composition du lait ne présente pas d'anomalies. Le vêlage ayant eu lieu deux mois auparavant, la période colostrale ne peut pas être mise en cause dans ces résultats positifs. De plus, l'arrêt de la complémentation a entraîné la disparition de la réponse positive 4 jours plus tard (lors du début de la seconde phase).

Lors de la seconde phase, les réponses douteuses sont apparues plus rapidement après le début de la complémentation (dès le jour 1 pour certaines vaches) et pour plus de vaches, puisque 6 des 7 vaches suivies ont donné ce genre de réponses.

L'utilisation de pénicillinase Bacto® Difco sur les échantillons donnant une réponse positive n'a pas entraîné de diminution ou de disparition du pouvoir inhibiteur : l'agent inhibiteur n'appartient donc pas au groupe des antibiotiques à noyau β -lactame sensible à cette enzyme.

Les essais de confirmation effectués au moyen du Charm HVS-8100 sur deux échantillons positifs de la vache 40 (jour 4 au matin et jour 4 au soir) n'ont permis d'identifier aucun des cinq groupes d'antibiotiques suivants : aminoglycosides, tétracyclines, macrolides, sulfamides et antibiotiques à noyau β -lactame.

La première phase de l'essai a permis d'induire des réactions positives au Delvotest®SP alors qu'aucun antibiotique n'était utilisé sur le bétail. Seul, l'apport du complément minéral vitaminé différenciait les vaches du groupe traité de celles du groupe témoin.

Tableau 7-5. Caractéristiques des vaches suivies (nombre de vêlages, production et cellules somatiques)

Vache	Lactation	Production (kg·jour ⁻¹)	Cellules (nombre·mL ⁻¹)
Lot témoin			
18	5	22,3	347.000
24	4	26,7	56.000
26	6	23,2	68.000
41	1	21,7	29.000
42	1	22,6	32.000
45	2	13,0	
Lot traité			
4	4	21,3	23.000
7	8	8,0	297.000
11	3	24,4	8.000
13	4	21,7	336.000
23	2	20,3	100.000
28	6	26,8	43.000
40	1	22,4	84.000

Cependant, le fait qu'une vache du groupe témoin ait donné une réponse positive lors de la seconde phase de l'essai (conditions identiques pour ce groupe) indique que l'apport du complément n'est pas le seul agent responsable des réponses positives. Ce fait est confirmé par les résultats négatifs obtenus lors de la troisième phase. Ces résultats indiquent que la combinaison du complément minéral et d'un (ou de plusieurs) aliment(s) fermenté(s) de type ensilage est nécessaire pour conduire à une réponse positive.

7.6. Conclusions

Les résultats obtenus au cours de ces deux essais montrent la limite des tests microbiologiques utilisés dans la mise en évidence des substances inhibitrices (Raskin P. *et al.*, 1997). En effet, la modification de l'alimentation du troupeau (apport d'un complément minéral à une alimentation hivernale) a induit des réponses positives lors de l'application du Delvotest®SP (Romnee J.M. *et al.*, 1999).

Le complément minéral n'apparaît cependant pas comme le facteur directement responsable des réponses positives. Il semble plutôt jouer un rôle dans l'amplification d'un

phénomène déjà existant. Ce phénomène est lié à la ration alimentaire puisque la présence d'un aliment de type ensilage est nécessaire à l'induction des réponses positives.

Ces deux paramètres rejoignent les données observées sur le terrain : les problèmes surviennent dans les étables lors de la période hivernale lorsque les animaux sont à l'étable et reçoivent une alimentation à base d'ensilage.

Plusieurs paramètres devraient être étudiés afin de gérer ce problème. Il serait intéressant de varier la composition du complément minéral utilisé afin de cibler l'élément amplificateur. La même approche pourrait être appliquée aux autres parties de l'alimentation : ensilage de maïs, d'herbe, ... présentant différentes qualités. Le suivi de changements métaboliques induits par ces aliments pourrait être effectué sur le sang, le lait et au niveau du rumen. Pour effectuer ces suivis, il est cependant nécessaire d'établir une relation entre certains métabolites et les réponses positives.

Une dernière approche dans la limitation des problèmes engendrés par des réponses « faux-positifs » consiste à étudier le comportement du micro-organisme test utilisé dans la détection des antibiotiques (*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) lorsqu'il est mis en présence de laits particuliers (taux de cellules somatiques élevés, composition, début et fin de lactation, ...).

CHAPITRE 8 : AUTRE INTERFÉRENCE POTENTIELLE : LES DÉSINFECTANTS UTILISÉS LORS DE LA TRAITE

8.1. Introduction

L'utilisation de désinfectants en pré-trempe (appliqués juste avant la traite) peut conduire à la présence de résidus actifs dans le lait. La mise en évidence des résidus à activité antibactérienne repose sur le pouvoir inhibiteur de ces molécules et donc, la présence de résidus de désinfectants peut conduire à un résultat positif lors du test de détection d'antibiotiques. Il est donc important de disposer de données relatives à la contamination du lait par ces résidus lors de ce type d'application.

8.2. Objectifs

Le premier objectif de cet essai est de mettre en évidence la présence de résidus inhibiteurs dans le lait après l'application d'un désinfectant, en l'occurrence le *Mamelo-1*, juste avant la traite. Parallèlement à ce premier objectif, la limite de détection du Delvotest®MCS sera déterminée pour la chlorhexidine (sous forme gluconate) sur solution pure et sur *Mamelo-1*.

8.3. Matériel et méthodes

8.3.1. Chlorhexidine

La chlorhexidine (**Figure 8-1**) est un agent cationique qui réagit avec les groupements chargés négativement de la paroi bactérienne. Elle est ainsi directement adsorbée à la surface des bactéries. L'effet sur la cellule bactérienne dépend de la quantité de produit adsorbé et du type de microorganisme présent :

- pour des concentrations faiblement bactéricides, la paroi cellulaire est altérée avec fuite des éléments cytoplasmiques et inhibition de certaines enzymes cellulaires,
- pour des concentrations fortement bactéricides, la cellule paraît intacte. En fait, le cytoplasme apparaît coagulé, probablement par précipitation des protéines et de l'acide nucléique.

En médecine vétérinaire, la chlorhexidine est utilisée dans la désinfection des locaux, la préparation des champs opératoires, l'antisepsie des plaies, les pansements, les shampoings, les bains, les traitements des otites, l'antisepsie buccale, en reproduction équine et pour la désinfection de la mamelle chez la vache laitière.

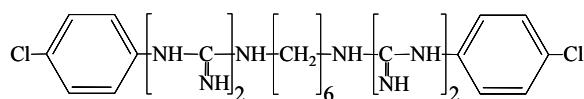


Figure 8-1. Formule chimique de la chlorhexidine – $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$

Pour évaluer la limite de sensibilité du Delvotest®MCS, le digluconate de chlorhexidine (Sigma C-9394), entrant également dans la formulation du *Mamelo-1*, a été utilisé. Sa formule chimique est la suivante : $C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$.

La chlorhexidine est reprise dans l'annexe II du règlement 2377/90 (CE) du Conseil du 26 juin 1990 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale⁴⁵. Cette annexe reprend les molécules pour lesquelles, après évaluation, il n'est pas apparu nécessaire de fixer une limite maximale de résidus pour la protection de la santé publique. Les modifications fréquentes des 4 annexes de ce règlement ont été globalisées dans le règlement (CE) 508/1999 de la commission du 4 mars 1999⁴⁶.

Aucune limite maximale de résidus n'apparaît nécessaire pour cette molécule pour toutes les espèces productrices d'aliments à condition qu'elle soit utilisée uniquement en usage topique. Un médicament à usage topique est un médicament qui agit à un endroit déterminé du corps. Cette expression est surtout utilisée pour les médicaments à usage externe.

8.3.2. Mamelo-1

Le « *Mamelo-1* » est un liquide antiseptique pour usage externe. Il est composé de digluconate de chlorhexidine 0,5 % (5.000 ppm ou $mg \cdot L^{-1}$), de glycérine pharmaceutique (8 %) et d'isopropanol.

Le *Mamelo-1* peut être considéré comme un produit à usage topique et la législation européenne (règlement 2377/90) s'applique donc à la substance active qu'il contient, la chlorhexidine.

Il s'agit d'un liquide légèrement opalescent à limpide de couleur bleue. Ce liquide présente l'odeur typique de l'isopropanol.

⁴⁵ : JO L 224/1-8; date de parution : 18.08.1990

⁴⁶ : JO L 60-16-52; date de parution : 09.09.1999

8.3.3. Animaux

Afin de réaliser cet essai, le choix s'est porté sur cinq vaches dont le taux en cellules somatiques était inférieur à $150.000 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$, dont la production était supérieure à 25 litres·jour $^{-1}$ et dont la période de lactation était comprise entre le 110^{ème} et le 160^{ème} jour, au début de l'essai. Ces animaux sont gérés par le département CRAW-D6. La production des différents animaux utilisés a été caractérisée avant le début de l'essai (**Tableau 8-1**).

Tableau 8-1. Caractéristiques des cinq vaches utilisées dans l'essai *Mamelo-1*

Identification	Production journalière (en litres)	Teneurs en cellules somatiques (cellules·mL $^{-1}$)	Jours de lactation
V 523	27	140.000	116
V 542	27	130.000	155
V 682	34	90.000	125
V 816	31	40.000	119
V 818	27	40.000	140

8.3.4. Traitements appliqués

Cinq modalités d'application de l'antiseptique ont été évaluées :

- Traitement T 1 : témoin (traite normale)
- Traitement T 2 : trempage en pot avec essuyage de la mamelle après application
- Traitement T 3 : trempage en pot sans essuyage de la mamelle après application
- Traitement T 4 : vaporisateur avec essuyage de la mamelle après application
- Traitement T 5 : vaporisateur sans essuyage de la mamelle après application

Tous les traitements ont été appliqués par une seule personne.

8.3.5. Schéma expérimental

Le prélèvement des échantillons a été défini dans le schéma expérimental d'application des traitements (**Tableau 8-2**).

L'ordre d'application des traitements a été défini de manière aléatoire : la disposition de l'essai permet à chaque animal de recevoir chacun des traitements de façon aléatoire (carré latin). De plus, les traitements ont été appliqués par une seule personne, de manière à uniformiser la façon d'appliquer le traitement. En effet, le mode d'application (durée de contact, positionnement du flacon, ...) ne doit pas interférer dans la détection des résidus.

Tableau 8-2. Application de l'antiseptique et prélèvement des échantillons

Vache	Mardi 01		Mercredi 01		Jeudi 01		Lundi 02		Mardi 02		Mercredi 02		Jeudi 02		Lundi 03		Mardi 03		Mercredi 03		Jeudi 03	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	
523	#	A	#	#	#	B	#	#	#	C	#	#	#	D	#	#	#	E	#	#	#	
542	#	B	#	#	#	A	#	#	#	E	#	#	#	C	#	#	#	D	#	#	#	
682	#	C	#	#	#	D	#	#	#	A	#	#	#	E	#	#	#	B	#	#	#	
816	#	D	#	#	#	E	#	#	#	B	#	#	#	A	#	#	#	C	#	#	#	
818	#	E	#	#	#	C	#	#	#	D	#	#	#	B	#	#	#	A	#	#	#	

M : traite du matin – S : traite du soir – # : prélèvement d'un échantillon
A : témoin (Traitement T 1)
B : trempage en pot avec essuyage de la mamelle après application (Traitement T 2)
C : trempage en pot sans essuyage de la mamelle après application (Traitement T 3)
D : vaporisateur avec essuyage de la mamelle après application (Traitement 4)
E : vaporisateur sans essuyage de la mamelle après application (Traitement T 5)

Le prélèvement d'un échantillon au cours des trois traites suivant l'application du traitement permet de mesurer, en cas de résultats positifs, le temps de persistance dans le lait.

Les échantillons de lait sont prélevés au moyen du système de prélèvement automatique de l'installation de traite (système « goutte à goutte »). Ils sont ensuite conservés dans un bain d'eau glacée jusqu'à analyse.

8.3.6. Analyses effectuées

Les échantillons de lait sont analysés pour la présence de résidus inhibiteurs au département CRAW-D7. Cette analyse est réalisée au moyen du Delvotest®MCS, test utilisé en routine dans le cadre de la détermination de la qualité du lait.

8.3.7. Limite de sensibilité du Delvotest®MCS au digluconate de chlorexidine

La sensibilité de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, souche test utilisée dans le Delvotest®MCS, a été évaluée par rapport au produit *Mamelo-1* et par rapport à une solution aqueuse de digluconate de chlorhexidine en réalisant une série de dilutions dans un lait de mélange, pasteurisé 10 minutes à 80°C.

8.3.7.1. Echantillons analysés

Différentes solutions, obtenues par dilutions successives, ont été préparées à partir du produit « *Mamelo-1* », contenant $5.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5.000 ppm) de digluconate de chlorhexidine et à partir de la solution pure de digluconate de chlorhexidine (**Tableau 8-3**).

Tableau 8-3. Concentrations de digluconate de chlorhexidine testées

Origine et matrice	Concentrations testées ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Mamelo-1 dans le lait	500 – 125 – 50 – 25 – 12,5 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,500 – 0,250 – 0,125 – 0,050 – 0,025 – 0,0125
Mamelo-1 dans le lait	500 – 450 – 400 – 350 – 300 – 250 – 200 – 150 – 100
Solution aqueuse de digluconate de chlorhexidine (20 %) dans le lait ^a	500 – 200 – 100 – 50 – 20

^a : une première dilution à $5.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a été préparée dans l'eau pour éviter la précipitation des protéines du lait.

8.4. Résultats et discussion

8.4.1. Limite de sensibilité du Delvotest[®]MCS au digluconate de chlorhexidine

8.4.1.1. Essai avec le produit « *Mamelo-1* »

Les résultats obtenus lors des tests effectués au moyen du Delvotest[®]MCS sur un lait contenant du produit « *Mamelo-1* » dilué ont permis de fixer une limite de sensibilité du test à la molécule active (**Tableau 8-4**).

Tableau 8-4. Sensibilité du Delvotest[®]MCS au désinfectant *Mamelo-1*, exprimée par rapport au digluconate de chlorhexidine, substance active contenue dans le produit

Concentration (digluconate de chlorhexidine) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppm)	Résultat Delvotest MCS	Concentration (digluconate de chlorhexidine) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppb)	Résultat Delvotest MCS
5.000 de 500 à 150	Positif	de 500 à 12,5	Négatif
125 de 100 à 1,25	Douteux		
	Négatif		

Lorsque le *Mamelo-1* est dilué dans le lait, le Delvotest[®]MCS est sensible à une concentration de chlorhexidine comprise entre 125 et $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

8.4.1.2. Essai avec la chlorhexidine pure

Une limite de sensibilité du Delvotest®MCS à la chlorhexidine a été déterminée en utilisant la substance pure (**Tableau 8-5**).

Tableau 8-5. Sensibilité du Delvotest®MCS au digluconate de chlorhexidine (solution aqueuse)

Concentration (digluconate de chlorhexidine) mg·L ⁻¹ (ppm)	Résultat Delvotest®MCS	Concentration (digluconate de chlorhexidine) mg·L ⁻¹ (ppm)	Résultat Delvotest®MCS
5.000	Positif	200	Positif
2.000	Positif	100	Négatif
1.000	Positif	50	Négatif
500	Positif	20	Négatif

Ces résultats, obtenus avec la solution de chlorhexidine pure, confirment ceux obtenus avec le *Mamelo-1* : la solution à 200 ppm donne un résultat positif et la solution à 100 ppm donne un résultat négatif. Des dilutions intermédiaires (125 et 150 mg·L⁻¹) n'ont cependant pas été effectuées pour cibler de manière plus précise le seuil de détection.

8.4.2. Résultats de la détection de substances inhibitrices dans le lait (Delvotest®MCS)

L'application du *Mamelo-1* avant la traite n'a conduit à aucun résultat positif lors de la détection des résidus inhibiteurs au moyen du Delvotest®MCS. La limite de détection de ce test étant fixée à 150 ppm (mg·L⁻¹) de chlorhexidine, on peut donc conclure qu'aucun échantillon de lait ne contenait cette concentration en chlorhexidine.

Il est cependant à noter que la quantité de produit nécessaire pour conduire à un résultat Delvotest®MCS positif est très importante. En effet, dans une traite de 10 litres, une concentration de 150 mg·L⁻¹ (ppm) conduit à une quantité absolue de chlorhexidine de 1.500 mg ou 1,5 g. Le *Mamelo-1* présente une concentration en chlorhexidine de 5 g par litre. Il faudrait donc déposer sur le pis de l'animal 350 mL de *Mamelo-1* pour atteindre ces concentrations ! Un tank de 1.000 litres de lait devrait, quant à lui, contenir 150 g de chlorhexidine, soit 30 litres de *Mamelo-1*, pour conduire à un déclassement sur la seule base de ce désinfectant.

8.5 Conclusions

La chlorhexidine, molécule présentant des propriétés antibactériennes, est reprise dans l'annexe II du règlement 2377/90 (CE) du Conseil. Cette annexe liste les molécules pour lesquelles la définition d'une limite maximale de résidus (LMR) n'est pas nécessaire.

L'utilisation de *Mamelo-1* pour désinfecter le pis de la vache laitière (usage topique du produit) permet d'appliquer la législation à la chlorhexidine qu'il contient.

La réalisation de dilutions successives dans du lait pasteurisé de *Mamelo-1* et d'une solution aqueuse de chlorhexidine a conduit à définir une limite de détection de $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppm) de chlorhexidine (sous forme digluconate) pour le Delvotest[®]MCS.

L'application de *Mamelo-1* en pré-traité n'a pas conduit à un résultat positif lors du test de mise en évidence de substances inhibitrices (Delvotest[®]MCS). Cette application a été effectuée au moyen d'un flacon de trempage et au moyen d'un pulvérisateur, avec et sans essuyage de la mamelle après application.

L'utilisation de *Mamelo-1* en pré-trempage ou en post-trempage n'interfère pas dans la détection des substances inhibitrices. Il ne présente donc aucun risque de mise en œuvre.

CHAPITRE 9 : EVALUATION D'UN KIT DE DÉTECTION SIMILAIRE AU DELVOTEST® MCS, LE COPAN MILK TEST

9.1. Introduction

Le schéma de détection mis en place en Belgique dans le cadre du contrôle de la qualité du lait (paramètre « Antibiotiques ») repose à plusieurs endroits, sur l'utilisation de tests d'inhibition microbienne. Une évaluation de ces tests doit être conduite avant leur possible utilisation dans un cadre légal : il est important de considérer leur sensibilité aux molécules rencontrées dans la pratique vétérinaire et de confronter cette sensibilité aux limites permises par la législation. De plus, il est primordial de vérifier la capacité du fournisseur à assurer une qualité constante dans ses produits : production homogène au sein d'un même lot ou entre lots, stabilité de la production dans le temps.

9.2. Objectifs

Ce chapitre a pour objet l'évaluation d'un test microbiologique répondant à la législation belge en matière de détection des antibiotiques dans le lait cru. L'évaluation porte d'une part sur différents paramètres importants lors de la mise en œuvre de ces tests (sensibilité, qualité du lait analysé, pasteurisation) et d'autre part sur la durée d'incubation du test.

9.3. Description et principe du test

Le test étudié est le **Copan Milk Test (CMT)**. Il est produit par la société *COPAN Italia S.P.A.* établie à Brescia (Italie). Il est disponible dans une configuration permettant son usage à la ferme ou dans les laiteries (test en ampoules) et dans une configuration permettant son utilisation à grande échelle, dans les laboratoires de contrôle par exemple (test sous forme de microplaques). Ce test peut être utilisé pour la mise en évidence des résidus inhibiteurs (dont les antibiotiques) dans le lait de vache, chèvre et brebis, qu'il s'agisse de lait cru, de lait traité thermiquement ou de poudre de lait.

Ce test est basé sur le même principe que le **Delvotest®MCS** : une gélose, contenant un sucre fermentescible (glucose), un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol), estensemencée avec des spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*. La présence de résidus d'antibiotiques inhibe la croissance de la souche et l'acidification qui en résulte. La coloration du milieu ne change pas. L'absence de résidus permet la croissance de la souche et l'acidification du milieu. Le milieu change de coloration (virage du mauve vers le jaune). Ces tests disposent d'un système de lecture de la coloration du milieu (scanner) leur permettant de satisfaire à la législation belge en matière de détection des résidus d'antibiotiques dans le lait.

Le CMT est prêt à l'emploi et ne nécessite pas l'ajout de nutriments. L'opérateur dépose à l'aide d'une pipette, 100 µl de lait directement sur la gélose et incube le test à 64°C dans un bain-marie, dans un incubateur ou dans un bloc chauffant prévu à cet effet pour une durée de 3 heures. Le lait diffuse dans la gélose. Si il n'y a pas de substances inhibitrices à des teneurs supérieures à la limite de détection, les spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* germent, croissent et métabolisent le glucose en produisant de l'acide lactique. La couleur du pourpre de bromocrésol, initialement mauve, vire au jaune. Dans le cas contraire, la germination et le métabolisme des spores sont inhibés si le lait contient des substances inhibitrices à des teneurs supérieures aux LOD des différents antibiotiques. Il n'y a donc pas de fermentation du glucose ni de production d'acide, la coloration de la gélose ne change pas.

La lecture des microplaques se fait au moyen d'un scanner et d'un logiciel fourni par la firme : à chaque puits des microplaques est affecté une valeur Z (calculée au départ de la coloration du puits). Confrontée à une valeur seuil, cette valeur Z va permettre de définir si l'échantillon est positif ou négatif.

Lors de l'utilisation en routine, la différence technique majeure entre les deux tests repose sur la durée d'incubation de la microplaque. La lecture du CMT se fait après trois heures d'incubation. Pour rappel, la durée d'incubation du Delvotest® est déterminée par la firme (« *control time* ») et est adaptée à chaque lot de microplaques afin d'augmenter la sensibilité du test.

9.4. Choix des échantillons utilisés

Deux types d'échantillons de lait ont été analysés. Des dilutions (lait cru) ont été réalisées pour différents antibiotiques choisis comme étant représentatifs des antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire dans la filière laitière. Des laits de tank (crus et après pasteurisation) ont aussi été analysés afin de se placer en conditions réelles.

9.5. Configuration d'analyse

La microplaque de 96 puits permet l'analyse de 90 échantillons, de 2 laits blancos (lait de mélange exempts de résidus inhibiteurs) et de 4 standards. Ceux-ci sont constitués de 4 laits dopés chacun par un antibiotique de référence : pénicilline, cloxacilline, sulfadiazine et oxytétracycline. La position de ces 6 puits est systématique sur les plaques.

9.6. Evaluations effectuées

9.6.1. Homogénéité au sein d'une même plaque

L'homogénéité au sein d'une même plaque a été évaluée par l'analyse d'un même lait réparti sur différentes plaques provenant d'un même lot. Les différents résultats obtenus permettront par ailleurs d'évaluer l'homogénéité au sein d'un même lot.

9.6.2. Homogénéité au sein d'un même lot

L'homogénéité au sein d'un même lot a été évaluée en analysant les mêmes échantillons sur différentes plaques provenant **du même lot**. Les échantillons sont constitués d'une part de dilutions d'antibiotiques et d'autre part de lait de tank. La répartition des puits se fait de manière aléatoire sur les plaques. Ce critère nécessite des essais complémentaires afin de déterminer l'origine des variations observées.

9.6.3. Homogénéité entre lots

L'homogénéité entre lots est évaluée en analysant les mêmes échantillons sur différentes plaques provenant **de lots différents**. Les échantillons sont constitués d'une part de dilutions d'antibiotiques et d'autre part de laits de tank. La répartition des puits se fait de manière aléatoire sur les plaques.

9.6.4. Limite de sensibilité

La détermination de la limite de sensibilité s'effectue pour 6 antibiotiques, choisis parmi les plus représentatifs des antibiotiques utilisés. L'analyse de 9 concentrations (10 puits par concentration), déterminées sur base d'études antérieures ou sur base des données fournies par la firme, a permis de définir la concentration pour laquelle 95 % des résultats sont positifs. La limite de sensibilité est définie comme étant cette concentration. La répartition des puits se fait de manière aléatoire sur les plaques.

9.6.5. Effet de la pasteurisation

La pasteurisation est préconisée dans le cadre du contrôle officiel de la présence de résidus d'antibiotiques. Cette étape est nécessaire pour éliminer les inhibiteurs naturels rencontrés dans le lait. L'effet d'une pasteurisation telle que demandée (10 minutes à 80°C) a été évalué sur les échantillons de laits de tank.

9.6.6. Effet de la durée d'incubation

La sensibilité a été déterminée après une incubation correspondant au temps nécessaire au virage de la coloration pour un échantillon exempt de substances inhibitrices (*Control Time CT* - déterminé par la firme pour chaque lot) et après une incubation de 3 heures. Chaque essai a été dédoublé de manière à obtenir l'information relative à la durée d'incubation : essai 1A après incubation *CT* et essai 1B après incubation de 3 heures.

9.7. Matériel et méthode

9.7.1. Essais 1 et 2 : homogénéité au sein d'une même plaque et entre plaques d'un même lot

9.7.1.1. Objectif

Ces essais visent à évaluer l'homogénéité des microplaques produites.

9.7.1.2. Echantillons analysés

A côté des références utilisées (2 laits exempts de substances inhibitrices et 4 laits dopés), un seul échantillon de lait de tank est analysé.

9.7.1.3. Répartition sur la plaque

L'échantillon analysé est réparti sur l'entièreté de la microplaque (90 trous). Plusieurs microplaques sont ainsi utilisées.

9.7.1.4. Paramètres étudiés et méthodes de traitement des résultats mises en oeuvre

Le traitement statistique des valeurs de Z obtenues, ainsi que l'interprétation qui en sera faite (positif ou négatif par rapport à un seuil limite égal à 4,5) va permettre d'évaluer l'homogénéité des microplaques.

La lecture des microplaques se fait après 3 heures d'incubation.

9.7.2. Essai 3 : homogénéité entre lots

9.7.2.1. Objectif

Cet essai vise à évaluer l'homogénéité du test entre plusieurs lots de microplaques. Par ailleurs, l'essai mis en place permet également de déterminer les limites de sensibilité du test pour 6 antibiotiques (pénicilline G, cloxacilline, sulfaméthazine, oxytétracycline, dihydrostreptomycine, tylosine). Le choix de ces antibiotiques repose sur les informations

relatives aux molécules les plus utilisées en élevage laitier (antibiotiques à noyau β -lactame, notamment).

9.7.2.2. Echantillons analysés

Des dilutions d'antibiotiques (**Tableau 9-1**) sont préparées et analysées dans deux conditions d'incubation (CT et 3 heures). L'ensemble des dilutions représente un total de 54 échantillons à analyser.

Tableau 9-1. Dilutions préparées pour les 6 antibiotiques

	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentrations testées (en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb)
Pénicilline (Na)	4	0,5 – 1,5 – 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5 – 4,0 – 4,5
Cloxacilline	30	5 – 10 – 15 – 20 – 25 – 30 – 35 – 40 – 45
Sulfaméthazine	100 ^a	25 – 50 – 75 – 100 – 125 – 150 – 175 – 200 – 225
Oxytétracycline	100	25 – 50 – 75 – 100 – 125 – 175 – 225 – 275 – 325
Dihydrostreptomycine	200	850 – 900 – 950 – 1.000 – 1.050 – 1.100 – 1.150 – 1.500 – 1.600
Tylosine	50	10 – 15 – 20 – 25 – 30 – 35 – 40 – 45 – 50

^a : 100 par sulfamide et pour le groupe

Les gammes de concentrations ont été choisies en fonction de résultats déjà obtenus sur le CMT et sur base de la sensibilité annoncée par la firme (**Tableau 9-2**).

Tableau 9-2. Limites de détection du CMT ⁴⁷

Antibiotique	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD
1. Pénicilline (Na)	4	1-2
2. Cloxacilline	30	10-15
3. Sulfaméthazine	100 ^a	100-200
4. Oxytétracycline	100	250-500
5. Dihydrostreptomycine	200	< 1000
6. Tylosine	50	50-75

^a : 100 par sulfamide et pour le groupe

⁴⁷ <http://www.copanusa.com/cmt/detection.html> (2005)

9.7.2.3. Répartition sur les plaques

Les antibiotiques 1, 2 et 3 (**Tableau 9-2**) vont constituer un premier groupe de 27 dilutions et les antibiotiques 4, 5 et 6 vont constituer un second groupe de 27 dilutions.

Chaque microplaque est divisée en blocs (**Figure 9-1**).

La zone de 6 puits est utilisée de manière systématique pour placer les standards (4 puits) et les blancos (2 puits). Chaque bloc de 10 puits représente une concentration pour un antibiotique donné, attribuée au bloc de manière aléatoire.

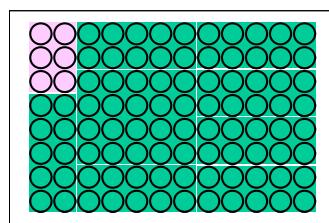


Figure 9-1. Répartition des blocs sur la microplaque

Six microplaques sont nécessaires pour analyser les 54 dilutions (10 puits par dilution, soit un total de 540 puits). La répartition des antibiotiques en deux groupes permet une manipulation plus aisée des échantillons.

Trois plaques sont donc nécessaires pour analyser les 27 dilutions de chaque groupe de 3 antibiotiques (**Figure 9-2**). Les 27 dilutions sont attribuées de manière aléatoire aux blocs. Cette répartition aléatoire est répétée pour trois séries de plaques au sein d'un même lot. Les trois lots analysés le sont selon le même principe.

<i>Plaque 1</i>	<i>Plaque 2</i>	<i>Plaque 3</i>

Figure 9-2. Répartition des 27 dilutions d'antibiotiques sur les trois plaques

Une répartition aléatoire des dilutions est réalisée pour chacune des conditions d'incubation (*CT* et 3 heures). Le tableau de répartition comprendra donc 36 séries aléatoires (3 lots de kits * 3 séries par lot * 2 groupes d'antibiotiques * 2 conditions d'incubation) de 27 nombres entiers variant de 1 à 27 (3 antibiotiques * 9 dilutions). Ces séries de nombres aléatoires sont générées au moyen de la fonction *RANDPERM* du logiciel MATLAB.

9.7.2.4. Paramètres étudiés et méthodes de traitement des résultats mises en oeuvre

Le traitement statistique des valeurs de Z obtenues, ainsi que l'interprétation qui en sera faite (positif ou négatif par rapport à un seuil limite égal à 4,5) permet d'étudier l'effet « lot » en ce qui concerne l'homogénéité (traitement des résultats effectué en collaboration avec le service de biométrie du CRA-W,).

La limite de sensibilité du test (95 % de réponse positive en intégrant les 9 plaques par dilution et par antibiotique, soit 90 valeurs par dilution) est calculée pour chacun des six antibiotiques. Ce calcul a été effectué au moyen de la procédure PROBIT du logiciel SAS.

9.7.3. Essai 4 : comportement du test vis à vis de laits crus

9.7.3.1. Objectif

Cet essai vise à évaluer le comportement du test vis à vis de laits crus, tant au sein d'un même lot de microplaques qu'entre lots différents.

9.7.3.2. Echantillons analysés

45 échantillons de laits crus de tank, choisis aléatoirement parmi les échantillons du Comité du lait, à Battice (organisme interprofessionnel chargé de la détermination de la qualité du lait en vue de son payement), ont été analysés. Ces échantillons ont été caractérisés d'un point de vue composition (matière grasse et protéine) ainsi que d'un point de vue qualité (germes, cellules).

9.7.3.3. Répartition sur les plaques

La zone de six puits utilisée pour les standards et blancos (A1 – B3) correspond à la même zone que celle définie pour l'essai 1. Il reste donc 90 puits pour les 45 laits à analyser.

Les 45 laits seront répartis de manière aléatoire en 9 séries de 5 laits. Ces séries sont numérotées de S1 à S9. Deux numéros de bloc par plaque sont attribués à chaque série de manière aléatoire (fonction RANDPERM du logiciel MATLAB) (**Figure 9-3**). Pour chaque lot, trois plaques sont ainsi analysées et les trois lots sont étudiés de cette manière.

L'analyse statistique des valeurs de Z obtenues, ainsi que l'interprétation qui en est faite (positif ou négatif en fonction du seuil égal à 4,5) permet d'évaluer le comportement du test vis à vis de laits crus de tank, en conditions réelles.

		3	11
		4	12
		5	13
		6	14
		7	15
		8	16
		9	17
		10	18

Figure 9-3. Répartition des échantillons de laits crus de tank sur la microplaquette (essai 4)

9.7.4. Essai 5 : comportement du test sur laits pasteurisés

9.7.4.1. Objectif

Cet essai vise à évaluer l'influence de la pasteurisation sur le comportement du test.

9.7.4.2. Echantillons analysés

Les 45 laits de l'essai 2 ont été analysés après pasteurisation.

9.7.4.3. Répartition sur les plaques

La zone de six puits utilisée pour les standards et blancos (A1 – B3) correspond à la même zone que celle définie pour l'essai 1. Il reste donc 90 puits pour les 45 laits à analyser.

		3	11
		4	12
		5	13
		6	14
		7	15
		8	16
		9	17
		10	18

Figure 9-4. Répartition des échantillons de laits de tank pasteurisés sur la microplaquette (essai 5)

Les 45 laits seront répartis de manière aléatoire en 9 séries de 5 laits. Ces séries sont numérotées de S1 à S9. Deux numéros de bloc par plaque sont attribués à chaque série de manière aléatoire (fonction RANDPERM du logiciel MATLAB). Les laits sont ainsi répartis de manière aléatoire sur les plaques (**Figure 9-4**). Pour chaque lot, trois plaques sont ainsi analysées et les trois lots sont étudiés de cette manière.

L'analyse statistique des valeurs de Z obtenues, ainsi que l'interprétation qui en est faite, permet d'évaluer le comportement du test vis à vis de laits de tank pasteurisés, en conditions réelles.

Les résultats obtenus pour cet essai sont mis en relation avec ceux obtenus pour l'essai 2, puisque ce dernier concerne les mêmes échantillons de lait, mais crus.

9.8. Résultats

Avant de réaliser la totalité des essais, les bains-marie utilisés ont été contrôlés, tant en terme d'homogénéité qu'au niveau de la justesse de la température. Ces contrôles ont été réalisés en enregistrant la température en différents endroits du bain-marie et en apportant, si nécessaire, les corrections adéquates par rapport à un thermomètre certifié.

Tableau 9-3. Homogénéité des 3 bains-marie – réduction des données

	<i>Bain-marie 1</i>	<i>Bain-marie 2</i>	<i>Bain-marie 3</i>
Maximum	64,50	64,50	64,30
Minimum	63,70	63,60	63,67
Amplitude	0,80	0,90	0,63
Moyenne	64,08	64,06	63,98

La réduction des données (**Tableau 9-3**), après ajustement par rapport au thermomètre certifié (bain-marie 3), montre que, pour les trois bains-marie, la température en tout point est comprise entre 63,0°C et 65,0°C, ce qui correspond à la variation de température tolérée lors de l'incubation du Copan Milk Test (64,0 °C+/- 1,0 °C).

9.8.1. Essai 1 : homogénéité au sein d'une même plaque

Tableau 9-4. Homogénéité au sein d'une même microplaquette (5 plaques analysées) – à partir des valeurs de Z observées

	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Max	Min	N	Positif^a	Négatif^a	% faux positifs
1	3,43	0,535	15,6	4,9	2,4	90	3	87	3,3
2	3,27	0,926	28,3	6,4	2,0	90	9	81	10,0
3	3,03	0,502	16,6	4,4	2,0	90	0	90	0,0
4	3,34	0,319	9,6	4,9	2,9	90	1	89	1,1
5	3,20	0,262	8,2	4,0	2,9	90	0	90	0,0
Global	3,26	0,574	17,6			450	13	437	2,9

^a : nombre de résultats interprétés comme positifs (faux positifs)

^b : nombre de résultats interprétés comme négatifs (faux négatifs)

Une première série de 5 microplaques provenant d'un même lot de production (lot n°3) a été analysée en vue de déterminer l'homogénéité au sein d'une même plaque. Les résultats relatifs à l'échantillon analysé sont réduits (**Tableau 9-4**).

Ces résultats montrent qu'une plaque présente une hétérogénéité plus importante que les autres (Plaque 2, CV = 28.3 %).

Des variations importantes de la valeur de Z sont observables au sein de la plaque 2 (**Figure 9-5**). Parmi les 5 plaques étudiées, trois présentent des puits dont la valeur de Z est supérieure à 4,5 et donc, conduisant à un résultat considéré comme positif.

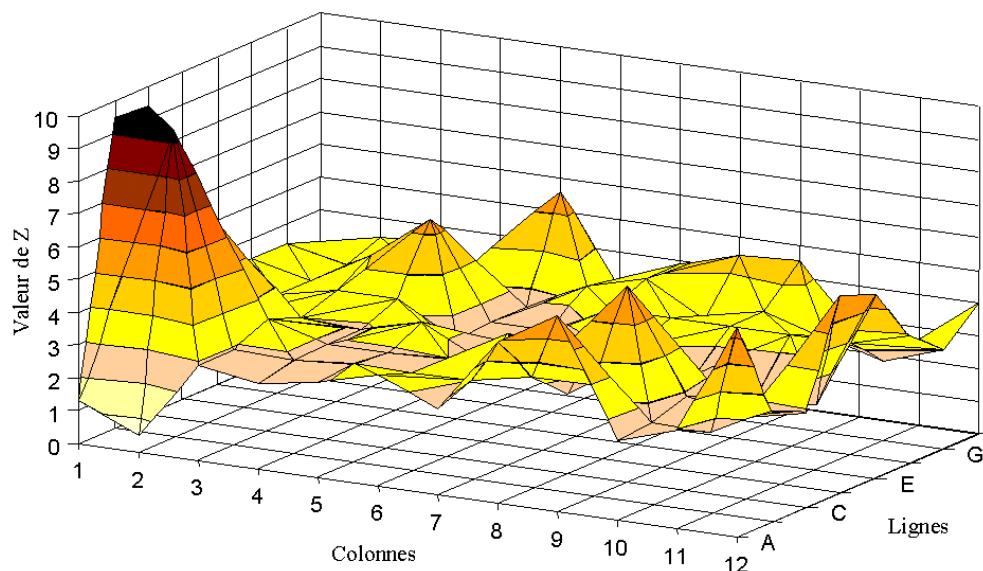


Figure 9-5. Répartition des échantillons de laits de tank pasteurisés sur la microplaque 2

9.8.2. Essai 2 : homogénéité au sein d'un même lot

Dans un premier temps, l'homogénéité au sein d'un lot a été étudiée en analysant le même lait sur 5 plaques du même lot.

9.8.3. Essai 3 : homogénéité entre lots

L'homogénéité du CMT entre lots a été évaluée par le biais de l'analyse de la variance appliquée aux résultats (valeur de Z d'une part, et interprétation qui en est faite, d'autre part) obtenus lors de l'essai 1. Ces résultats concernent l'analyse de 6 antibiotiques, pour lesquels 9 dilutions ont été préparées (**Tableau 9-1**). Ces 54 solutions ont été analysées sur 3 blocs de

microplaques (constitués chacun de 3 microplaques), pour 3 lots de test produits. Pour chacune des dilutions, 10 puits ont été utilisés par bloc.

Ce premier essai a généré 4.860 résultats (10 puits * 9 dilutions * 6 antibiotiques * 3 blocs * 3 lots) auxquels sont ajoutés les résultats obtenus pour les blancos et les standards mis systématiquement sur chaque microplaques, soit un total de 5.184 observations.

Les lectures ont été effectuées au moyen du lecteur fourni par la firme Copan SA et interprétée au moyen du logiciel dédié à cet effet (valeur seuil $Z = 4,5$). Un échantillon est déclaré positif si sa valeur de Z est supérieure ou égale à 4,5, dans le cas contraire, il est déclaré négatif. Une première lecture a été effectuée après un temps d'incubation défini comme étant le temps nécessaire au virage d'un échantillon blanco (*control time* – temps déterminé par la firme Copan SA) et une lecture a été effectuée après un temps d'incubation de 3 heures (temps préconisé par la firme Copan SA pour l'utilisation du test). Ces deux lectures ont été réalisées sur des blocs de plaques différents.

Tableau 9-5. Analyse de la variance réalisée sur les résultats de l'essai 1 (homogénéité entre lots)

Appliquée à la valeur de Z					
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotique	58	16958,91133	292,39502	3066,22	<0,0001
Lot	2	4,27406	2,13703	22,41	<0,0001
Antibio * Lot	116	1538,62778	13,26403	139,09	<0,0001
Bloc(Lot)	6	650,63233	108,43872	1137,15	<0,0001
Antibio * Bloc(lot)	335	3189,13415	9,51980	99,83	<0,0001
Appliquée à l'interprétation de la valeur de Z					
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotique	58	393,7206265	6,7882867	331,67	<0,0001
Lot	2	0,3224212	0,1612106	7,88	0,0004
Antibio * Lot	116	36,40955322	0,3138753	15,34	<0,0001
Bloc(Lot)	6	11,7079615	1,9513269	95,34	<0,0001
Antibio * Bloc(lot)	335	149,1219050	0,4421400	21,75	<0,0001

Pour effectuer l'analyse de la variance, trois classes ont été définies dans le modèle : antibiotiques ($n = 59$, soit 9 dilutions * 6 antibiotiques, 4 standards et 1 blanco), blocs ($n = 3$) et lots ($n = 3$).

Les différentes composantes définies (**Tableau 9-5**) correspondent au facteur « Antibiotiques », au facteur « Lot », aux interactions « Antibiotiques * Lot », au facteur

« Bloc » hiérarchisé par rapport aux lots, aux interactions « Antibiotiques * Bloc », la dernière composante (Error) pouvant être affectée à la variation observée entre puits.

Chacune des composantes définies, ainsi que les interactions entre elles, présentent des différences significatives entre lots (**Tableau 9-5**), que l'on réalise l'analyse sur la valeur de Z observée ou sur l'interprétation qui en est faite. La signification de l'effet « Lot » se réduit très légèrement lorsque l'on travaille sur les interprétations de la valeur Z ($< 4,5$ ou $> 4,5$). La différence reste cependant significative.

Les différentes composantes utilisées dans l'analyse de la variance peuvent être hiérarchisées (**Tableau 9-6**). Dans l'essai réalisé (lecture après 3 heures d'incubation), lorsque l'on analyse les valeurs de Z, les variations observées peuvent être attribuées majoritairement à la composante (Antibiotique*Bloc(Lot)), les trois autres composantes (Antibiotique*Lot), (Bloc(Lot)) et (Error) ayant une importance similaire (la composante « Antibiotique » est ignorée dans ce cas). L'effet « Lot » est quant à lui inexistant. L'effet (Bloc(Lot)) reste le plus important pour les composantes indépendantes de la composante « Antibiotique ».

Tableau 9-6. Estimation des composantes de la variance pour le CMT (3 heures d'incubation)

Variance Components Estimation Procedure – Maximum Likelihood Estimates					
Composantes de la variance	Calculs effectués par rapport à la valeur de Z		Calculs effectués par rapport à l'interprétation (+/-) de la valeur Z		
	Estimation	Importance relative (%)	Estimation	Importance relative (%)	
Antibiotique	3,16651	- ^a	71,0	0,07307	- ^a 54,5
Lot	0	0,0	0,0	0	0,0
Antibiotique*Lot	0,13283	10,3	3,0	0	0,0
Bloc (Lot)	0,12856	9,9	2,9	0,0020241	3,3 1,5
Antibiotique*Bloc (Lot)	0,93737	72,4	21,0	0,03842	63,1 28,7
Error	0,09536	7,4	2,1	0,02046	33,6 15,3

^a : la composante (Antibiotique) est ignorée pour calculer les importances relatives des autres composantes.

Par contre, lorsque l'analyse des résultats est réalisées sur l'interprétation qui est faite de la valeur de Z (positif ou négatif), la composante (Antibiotique*Lot) devient, elle aussi, nulle. La composante (Error) prend alors une importance relative plus élevée. La composante (Antibiotique*Bloc(Lot)) reste la plus importante.

Il est cependant difficile d'expliquer l'effet (Bloc(Lot)) et l'importance de la composante « Error ». Des essais complémentaires sont nécessaires pour vérifier si la variation observée est

entre blocs ou à l'intérieur d'un même bloc. En effet, un bloc est constitué de 3 microplaques, nécessaires à l'analyse de la série complète des dilutions.

Lorsque la lecture est effectuée après une incubation correspondant au « *control time* », la composante (Lot), nulle dans le cas d'une incubation de trois heures, devient la seconde composante en importance relative, derrière la composante (Antibiotique*Bloc(Lot)), lorsque la valeur de Z est prise en compte. Elle perd totalement de son importance quand l'interprétation du Z est utilisée. Pour les autres composantes, le même ordre dans les importances relatives est conservé.

La variabilité observée lorsque les microplaques sont lues après un temps d'incubation correspondant au « *control time* » est plus importante. Il est donc important d'incuber le test pendant trois heures afin de réduire cette variabilité.

De ce premier essai, la conclusion suivante peut être tirée : lorsque le Copan Milk Test est incubé pendant trois heures, des différences significatives sont mises en évidence pour la composante « Lot » de l'analyse de la variance, que l'analyse soit réalisée sur la valeur de Z observée ou sur son interprétation. Cette conclusion concerne bien entendu les lots analysés.

L'homogénéité au sein d'un lot [composante (Bloc.lot))] et l'homogénéité au sein de la plaque [composante (Error)] ne sont pas chiffrables, les résultats obtenus ne permettant pas de dissocier les deux composantes. Le bloc est constitué de 3 microplaques et les variabilités observées ne peuvent être attribuées à l'une ou l'autre des composantes. L'identification de l'origine de ces différences doit faire l'objet d'essais complémentaires.

9.8.4. Limite de sensibilité du Copan Milk Test

La limite de sensibilité du Copan Milk test a été déterminée pour 6 antibiotiques représentatifs des substances susceptibles d'être utilisées en élevage laitier. Le choix de ces antibiotiques repose sur des données publiées en France par l'AFSSA (**Figure 9-6**).

Ces données sont confortées par le rapport danois (DANMAP 2003) relatif à l'usage des substances antimicrobiennes en médecine vétérinaire. Ces deux rapports montrent que plusieurs familles sont importantes pour le traitement de pathologies en élevage laitier : les antibiotiques à noyau β -lactame comprenant les pénicillines, leurs dérivés et les céphalosporines, mais aussi les aminoglycosides, les tétracyclines et les macrolides.

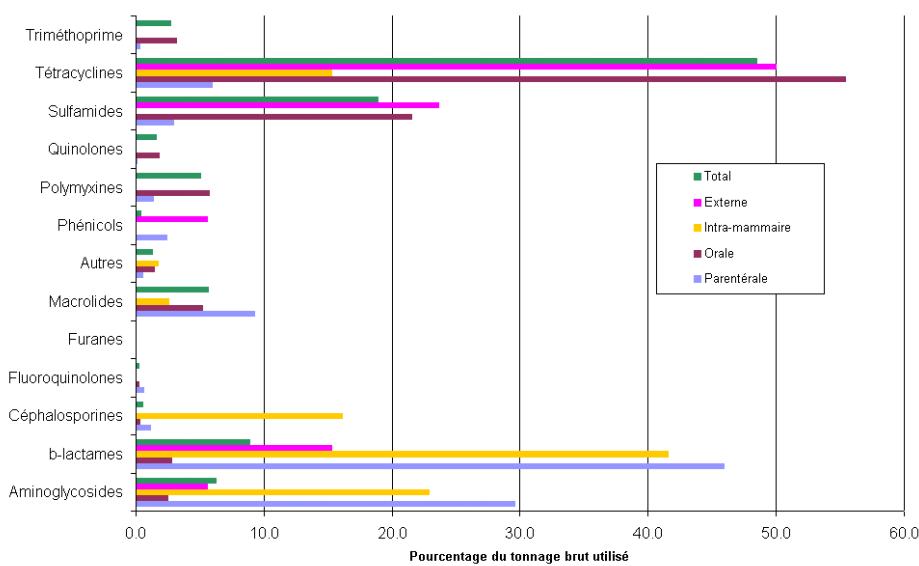


Figure 9-6. Marché français des antibiotiques – pourcentage occupé par chacune des classes dans les antibiotiques produits à destination de la médecine vétérinaire (pourcentage calculé sur le tonnage brut) en rapport avec la voie d'administration – AFSSA 1999

Trois lots du test Copan Milk Test ont été utilisés, et pour chacun de ces lots, trois séries d'analyses ont été réalisées. Dix puits de microplaques ont servi pour chacune de ces séries. Chaque dilution d'antibiotique a fourni ainsi 90 résultats.

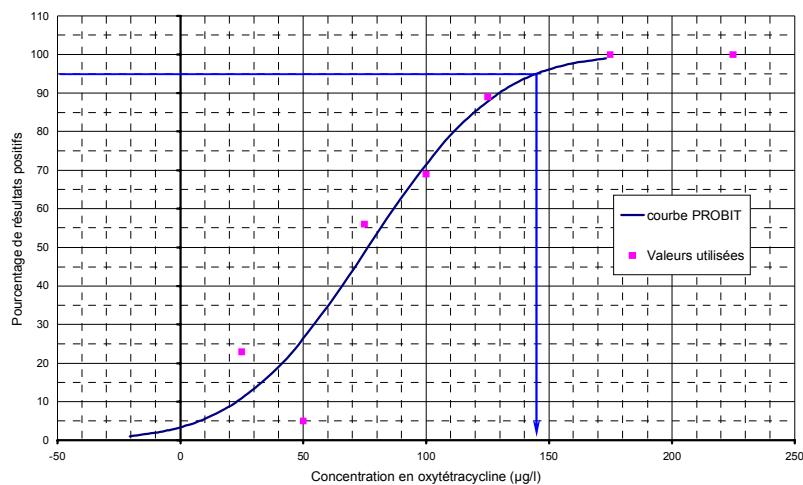


Figure 9-7. Détermination de la limite de détection pour l'oxytétracycline au moyen de la procédure *PROBIT* (logiciel SAS)

La limite de détection a été calculée au moyen de la procédure *PROBIT* du logiciel SAS, cette limite correspond à la concentration conduisant à 95 % de résultats positifs. La

détermination de la limite de détection pour l'oxytétracycline (incubation 3 h 00 – CMT) illustre ce calcul (**Figure 9-7**).

Les limites de détection ont été calculées selon la même procédure pour les six antibiotiques étudiés, dans les deux conditions d'incubation définies (« *control time* » et 3 heures) (**Tableau 9-7**).

En terme de sensibilité, les résultats obtenus montrent que le CMT détecte cinq des six antibiotiques étudiés à des concentrations proches de la LMR (**Tableau 9-8**).

Tableau 9-7. Limites de détection calculées pour les six antibiotiques étudiés ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD annoncée par la firme	CMT $CT - Z = 4,5$			CMT $3H - Z = 4,5$		
			LOD	Min	Max	LOD	Min	Max
Cloxacilline	30	10-15	4,82 ^a	ND ^b	ND	21,6	20,1	23,5
Dihydrostreptomycine	200	< 1000	< 850 ^c	ND	ND	< 850	ND	ND
Oxytétracycline	100	250-500	166	153	194	144	135	157
Pénicilline	4	1-2	0,47	ND	ND	2,86	2,64	3,13
Sulfaméthazine	100 ^d	100-200	< 25	ND	ND	97,6	90,6	100,6
Tylosine	50	50-75	33,0	31,2	35,2	26,6	25,1	28,7

^a : une valeur en italique indique que la fonction *PROBIT* a calculé une LOD mais que cette limite n'est pas statistiquement significative.

^b : ND signifie que l'intervalle [min : max] n'a pas pu être calculé

^c : « < 850 » signifie que pour le test, au moment de la lecture, toutes les concentrations donnent 100 % de résultats positifs. La LOD est donc inférieure à la plus basse des concentrations.

^d : 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ par sulfamide et pour l'ensemble du groupe

Min – Max : limite de l'intervalle de confiance (prob : 95 %)

Aucune limite de détection n'a pu être définie pour la dihydrostreptomycine, les concentrations initiales étant déjà trop élevées.

Une différence apparaît entre les résultats provenant de l'incubation « *control time* » et ceux résultant de l'incubation de 3 heures. En effet, les limites observées pour l'oxytétracycline et la tylosine sont légèrement supérieures après une incubation de 3 heures.

Par contre, après l'incubation « *Control time* », la limite de détection est nettement inférieure pour la cloxacilline, la pénicilline et la sulfaméthazine. Pour les deux antibiotiques à noyau β -lactame, cette limite n'est plus statistiquement interprétable. Un temps d'incubation « *Control time* », si il augmente la sensibilité du test, conduit à une variabilité plus importante des résultats enregistrés.

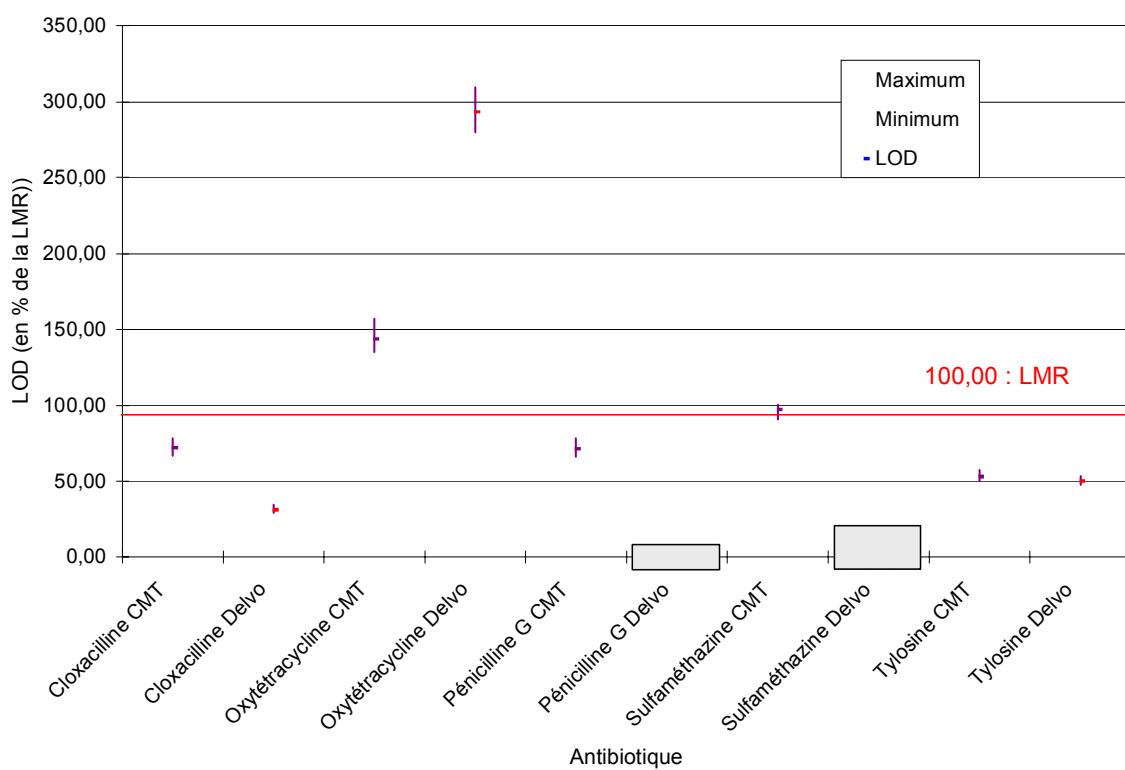


Figure 9-8. Représentation graphique des limites obtenues avec le CMT pour 5 antibiotiques (en comparaison avec les LMR respectives)

Les résultats du CMT ont été comparés avec les résultats du Delvotest® MCS (test officiel utilisé en Belgique lors de cette étude) (**Tableau 9-8**).

Tableau 9-8. Comparaison de la sensibilité « Copan Milk Test – Delvotest® MCS » (mêmes échantillons – respects des prescriptions de la firme) - $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

	LMR	CMT - Incubation : 3 heures				Delvotest MCS - Incubation : “Control time”		
		Z = 4,5				Z = -3		
		$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LOD	Min	Max	LOD	Min	Max
Cloxacilline	30	21,6	20,1	23,5	9,4	8,7	10,4	
Dihydrostreptomycine	200	< 850	ND	ND	1208	1078	1324	
Oxytétracycline	100	144	135	157	293	280	310	
Pénicilline	4	2,9	2,6	3,1	0,66	ND	ND	
Sulfaméthazine	100	97,6	90,6	100,6	< 25	ND	ND	
Tylosine	50	26,6	25,1	28,7	25,1	23,8	26,7	

Min – Max : limite de l'intervalle de confiance (prob : 95 %)

A noter, une sensibilité moindre du CMT envers les antibiotiques à noyau β -lactame (pénicilline et cloxacilline) et sulfamides (sulfaméthazine) étudiés, une sensibilité équivalente envers la tylosine et une sensibilité accrue envers la dihydrostreptomycine et l'oxytétracycline.

Les résultats obtenus pour les standards utilisés concordent avec les limites ainsi calculées (**Tableau 9-9**).

Tableau 9-9. Pourcentage de résultats positifs obtenus pour les standards

		CMT CT – Z = 4,5			
		Global	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Blanco	-	59,7	70,8	50,0	58,3
Standard cloxacilline	60	100,0	100,0	100,0	100,0
Standard oxytétracycline	250	100,0	100,0	100,0	100,0
Standard pénicilline	3	100,0	100,0	100,0	100,0
Standard sulfadiazine	100	100,0	100,0	100,0	100,0
		CMT 3 heures – Z = 4,5			
		Global	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Blanco	-	20,8	20,8	10,4	31,3
Standard cloxacilline	60	100,0	100,0	100,0	100,0
Standard oxytétracycline	250	100,0	100,0	100,0	100,0
Standard pénicilline	3	100,0	100,0	100,0	100,0
Standard sulfadiazine	100	100,0	100,0	100,0	100,0

Il est important de constater que globalement, 20,8 % des échantillons « blancos » (144 analyses effectuées) donnent une réponse positive après une incubation de 3 heures. La répartition des échantillons donnant un résultat « faux positif » (**Figure 9-9**), en fonction de la valeur de Z, ne permet pas d'expliquer ces données.

Chacun des lots présente cependant des pourcentages différents de faux positifs (de 10,4 % à 31,3 %).

Dans ces conditions d'utilisation, le Delvotest® MCS ne conduit qu'à 2,8 % de faux positifs pour les blancos, alors que tous les standards utilisés ont été déclarés positifs.

Il faut cependant noter que seuls deux laits ont été utilisés comme « blancos » dans le cadre de cet essai. La variabilité obtenue si un même échantillon de lait est analysé à plusieurs reprises sur plusieurs plaques provenant de plusieurs lots est ainsi observée.

De plus, l'analyse des résultats en fonction des lots étudiés permet d'obtenir une autre explication à ce nombre élevé de faux positifs. En effet, la répartition montre que les valeurs de Z obtenues pour la série 2 sont anormalement élevées (**Figure 9-10**). Les résultats « faux-positifs » (valeur de Z supérieure à 4,5) proviennent exclusivement de cette série. En effet, aucune des trois autres séries ne présente des résultats supérieurs à 4,5, valeur limite (**Tableau 9-10**). Il semble que le blanco utilisé présentait des caractéristiques propres qui ont conduit à des valeurs de Z élevées.

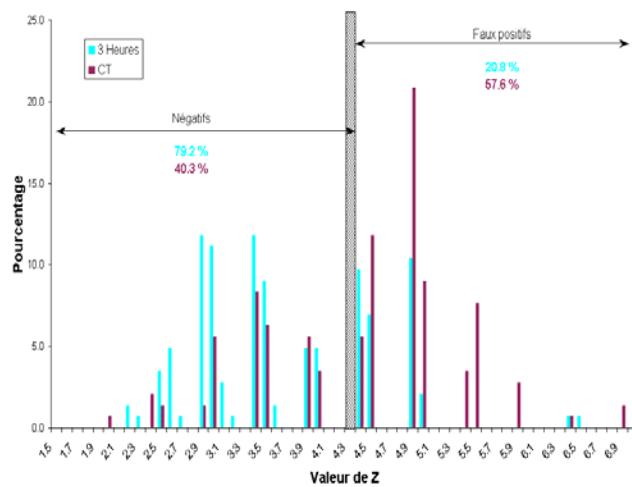


Figure 9-9. Diagramme de répartition des valeurs de Z obtenues pour les Blancos (n = 144)

Une répartition des données par lot montre que le lot 3 présente une dispersion plus importante que les deux autres lots (**Tableau 9-10**).

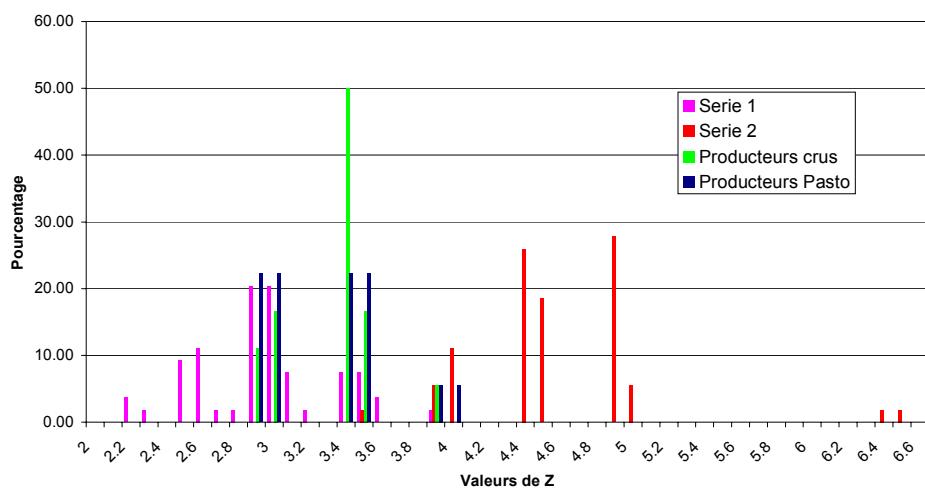


Figure 9-10. Répartition des valeurs de Z obtenues pour les différents blancos dans les séries d'analyses

Ces différences sont à mettre en rapport avec les conclusions déjà données pour l'homogénéité entre lots : le lot 3 se démarque des lots 1 et 2 étudiés. Le temps d'incubation nécessaire à ce lot pour obtenir le même résultat que les deux autres est supérieur à 3h00, durée préconisée par la firme. Les résultats obtenus sur les blancos montrent l'importance du choix de cet échantillon. De plus, il est judicieux de se poser la question sur la valeur limite déterminée au départ : 4,5 apparaît comme une valeur un peu basse. Une valeur de 4,7 – 4,8 semble plus adéquate. La France utilise d'ailleurs une valeur limite de 4,7 (Gaudin V., communication personnelle).

Tableau 9-10. Réduction des données relatives aux blancos analysés

<i>Par série</i>	Série 1	Série 2	P. crus	P. pasteurisés
Moyenne	2,95	4,58	3,32	3,28
Ecart-type	0,37	0,52	0,26	0,35
CV	12,61	11,29	7,83	10,56
Max	3,9	6,5	3,9	4
Min	2,2	3,5	2,9	2,9
Médiane	2,95	4,5	3,4	3,4
N	54	54	18	18
<i>Par lot</i>	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
Moyenne	3,48	3,74	3,73	
Ecart-type	0,84	0,67	0,98	
CV	24,05	17,95	26,40	
Max	5	5	6,5	
Min	2,2	2,6	2,2	
Médiane	3,05	3,5	3,5	
N	48	48	48	

9.8.5. Essai 4 : Comportement du CMT par rapport aux laits de tank (lait crus)

Pour évaluer le comportement du CMT par rapport aux laits de mélange, 45 laits de tank ont été analysés en double, ces derniers étant répartis aléatoirement sur les différentes plaques utilisées (fonction *RANDPERM* du logiciel MATLAB) (**Figure 9-11**). Trois plaques au sein de chacun des lots ont été utilisées pour réaliser cet essai.

Une lecture a été effectuée après un temps d'incubation correspondant au « control time » et une lecture a été effectuée après une incubation de 3 heures.

Pour chaque lot, un seul producteur (P29) est identifié comme positif lors des deux mesures (résultat obtenu pour chaque plaque). On remarque aussi des résultats globalement plus élevés pour le lot 3. Ceci explique notamment le nombre plus élevé (7 sur 45) d'échantillons pour lesquels l'interprétation du résultat diffère entre les deux mesures. Pour les lots 1 et 2, un seul échantillon présentait une interprétation différente entre les deux mesures.

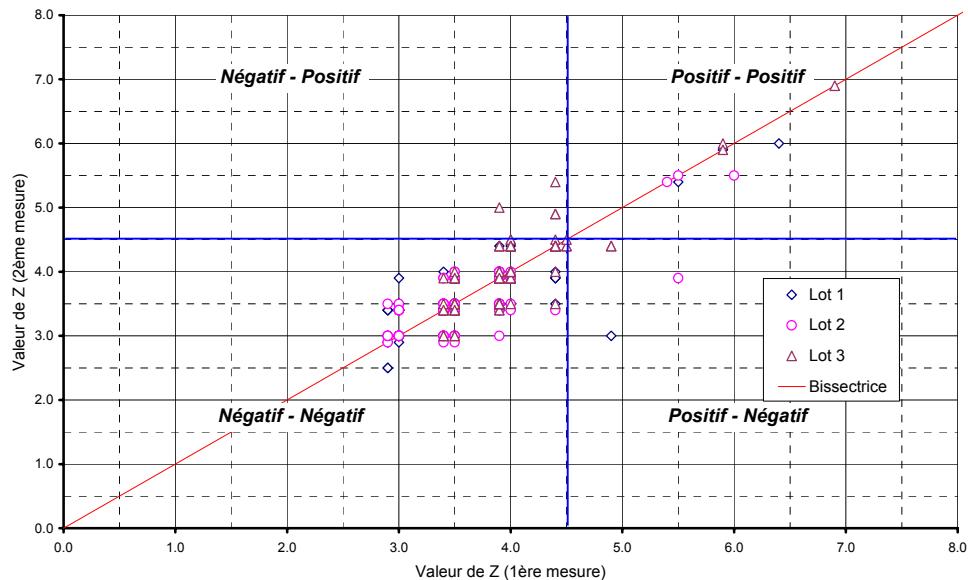


Figure 9-11. Résultats obtenus pour les trois lots de CMT sur les 45 laits crus de tank, analysés en double (lecture après 3 heures d'incubation) – blancos inclus dans les résultats

L'analyse statistique des résultats des 45 laits (analyse de la variance à un critère) montre que les trois lots sont significativement différents (**Tableau 9-11**). Les différences significatives observées entre les résultats de producteurs montrent qu'un échantillon « blanco » n'est pas l'autre.

Tableau 9-11. Analyse de la variance relative aux 45 laits de producteurs (laits crus) – valeurs de Z

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F_{obs}	$Pr > F$
Différence entre lots	2	31.534	15,7671	153,09	< 0,0001
Différence entre producteurs	45	120.351	2,6745	25,97	< 0,0001
Interaction	90	6.865	0,0763	0,74	0,9625
Erreur	690	71.067	0,103		
Totaux	827	229.817			

L'étude des trois séries de résultats montre d'autre part, que les moyennes des lots 1 et 2 peuvent être considérées comme égales, alors qu'elles diffèrent toutes les deux de la moyenne du lot 3 (**Tableau 9-12**).

L'hypothèse d'égalité des moyennes est rejetée si la valeur de t_{obs} est supérieure à la valeur de $t_{\text{théo}}$, ce qui est le cas entre le lot 1 et le lot 3 et entre le lot 2 et le lot 3. Cette différence apparaissait déjà dans la figure 9-11, où l'on remarque que les résultats obtenus pour le lot 3 sont plus élevés que les résultats obtenus pour le lot 1 et le lot 2 (échantillons identiques analysés en double).

Tableau 9-12. Comparaison des moyennes 2 à 2 (résultats obtenus pour les lots 1, 2 et 3)

$t_{1-\alpha/2}$ ^a			t_{obs}		
0,975	0,99	0,995	Lot 1 – Lot 2	Lot 1 – Lot 3	Lot 2 – Lot 3
1,97956	2,3576	2,61675	1,24515	17,09433	18,12101
Egalité des moyennes					
0,975			Oui	Non	Non
0,99			Oui	Non	Non
0,995			Oui	Non	Non

^a : pour 137 degrés de liberté

La même analyse, effectuée sur l'interprétation du résultat (négatif si $Z < 4,5$) montre que la différence observée entre lots reste perceptible lorsque l'analyse de la variance est effectuée sur l'interprétation de la valeur de Z (**Tableau 9-13**). Pour réaliser cette analyse, une valeur de 0 a été attribuée à un résultat négatif et une valeur de 1 à un résultat positif.

Au terme de ce deuxième essai, il est possible d'identifier la différence entre lots déjà mise en évidence dans l'essai 1. En effet, le lot 3 se démarque des lots 1 et 2, que l'on observe la valeur de Z ou l'interprétation qui en est faite.

Tableau 9-13. Analyse de la variance relative aux 45 laits de producteurs (laits crus) – interprétation des valeurs de Z

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F_{obs}	$Pr > F$
Différence entre lots	2	0,3478	0,17391	9,86	0,0001
Différence entre producteurs	45	17,9626	0,39917	22,64	< 0,0001
Interaction	90	1,2077	0,1342	0,76	0,9475
Erreur	690	12,1667	0,1763		
Totaux	827	31,6848			

Les interprétations des données ne concernent que l'incubation de 3 heures, conditions préconisées par la firme Copan SA. Les lectures au « control time », réalisées lors de l'essai 1 montrent clairement qu'il est difficile et même non souhaitable, de définir de nouvelles conditions d'utilisation de ce test.

Dans cet essai 2, les valeurs observées pour les échantillons « Blancos » sont toutes inférieures à 4,5. La valeur moyenne ($n = 18$) est égale à 3,3 (min : 2,9 et max : 3,9) et le coefficient de variation (%) est égal à 7,8 %. Pour cet essai, un seul lait a été utilisé comme « Blanco ».

9.8.6. Essai 5 : Comportement du CMT par rapport à la pasteurisation de laits de tank

Les 45 laits de tanks ont été analysés, en double après pasteurisation afin d'évaluer une éventuelle influence de la pasteurisation. Les laits ont été répartis aléatoirement sur les différentes plaques utilisées (fonction *RANDPERM* du logiciel MATLAB). Trois plaques au sein de chacun des lots ont été utilisées pour réaliser cet essai.

Une lecture a été effectuée après un temps d'incubation correspondant au « *control time* » et une lecture a été effectuée après une incubation de 3 heures.

Les analyses, réalisées en double, ont permis de visualiser la relation existant entre les résultats des doubles (incubation : 3 heures) (**Figure 9-12**).

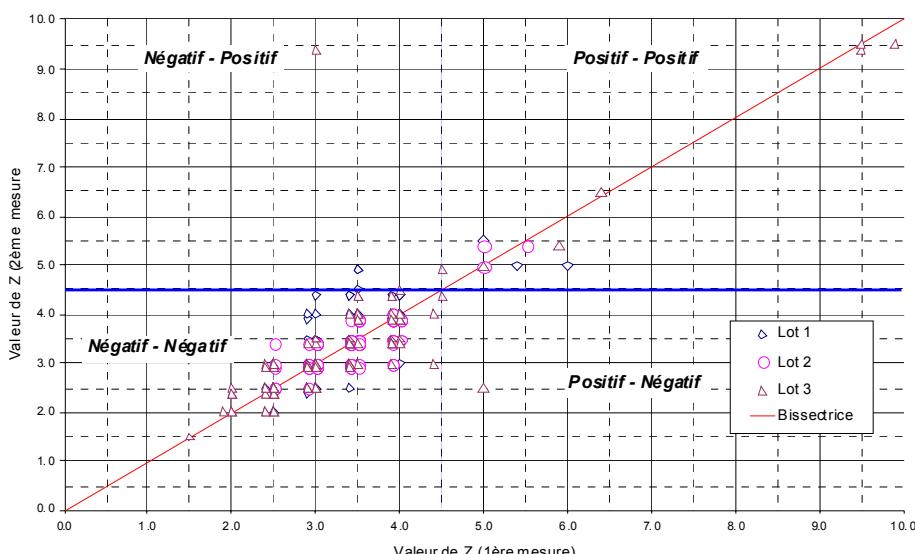


Figure 9-12. Résultats obtenus pour les trois lots de CMT sur les 45 laits de tank, après pasteurisation, analysés en double (lecture après 3 heures d'incubation) – blancos inclus dans les résultats

Le lot 3 présente une plus grande dispersion des résultats que les lots 1 et 2. De plus, un échantillon de lait (producteur P 32) donne un résultat similaire sur les trois plaques du lot 3 mais contradictoire par rapport aux lots 1 et 2, et par rapport aux résultats enregistrés sur les laits crus.

L'analyse de la variance à deux critères effectuée sur les résultats obtenus pour les laits pasteurisés (**Tableau 9-14**) montre que l'effet « lot » est moindre que pour les laits crus (**Tableau 9-11**). La Prob>F est égale à 0,0019 dans ce cas alors qu'elle était inférieure à 0,0001 dans le cas des laits crus. La différence reste cependant bien significative.

Tableau 9-14. Analyse de la variance relative aux 45 laits de producteurs (lait pasteurisé)

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F_{obs}	Pr > F
Différence entre lots	2	3,02	1,50994	6,31	0,0019
Différence entre producteurs	45	225,271	5,00825	20,96	< 0,0001
Interaction	90	184,292	2,04769	8,57	< 0,0001
Erreur	690	164,872	0,23894		
Totaux	827	577,555			

En ce qui concerne la composante « Producteurs », les différences observées se maintiennent. La pasteurisation ne gomme donc pas les différences inhérentes à la composante « Producteurs ». Des études complémentaires, mettant en relation la composition des échantillons de lait, les modifications consécutives à la pasteurisation et les résultats obtenus, seraient sans aucun doute nécessaires pour expliquer ces différences.

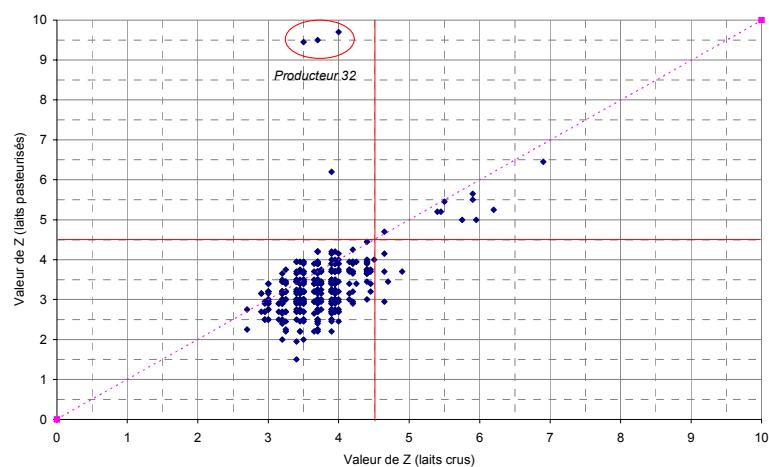


Figure 9-13. Correspondance entre les résultats obtenus sur laits crus et sur laits pasteurisés (moyenne calculée sur les doublets) – 3 heures d'incubation

Les données relatives à l'analyse de la variance ont été calculées au moyen du logiciel MATLAB.

La nature du lait (cru ou pasteurisé) semble influencer le résultat du test. En effet, les résultats obtenus (valeurs de Z) pour les laits pasteurisés sont, dans l'ensemble, inférieurs à ceux obtenus pour les laits crus, dans les mêmes conditions d'incubation (**Figure 9-13**).

L'analyse de la variance multicritère permet d'évaluer l'effet de la pasteurisation sur les résultats.

La pasteurisation des échantillons apparaît comme ayant une influence sur les résultats lorsque les valeurs de Z sont considérées (**Tableau 9-15**). Cet effet disparaît par contre lorsque l'analyse est effectuée non plus sur les valeurs de Z mais bien sur leur interprétation (positif ou négatif) en affectant une valeur de 0 à un résultat négatif et une valeur de 1 à un résultat positif.

L'étude de la cinétique d'acidification de laits ayant subi un traitement thermique différent illustre bien ce phénomène. Un lait UHT acidifie plus rapidement le milieu qu'un lait cru (**Figure 9-14**).

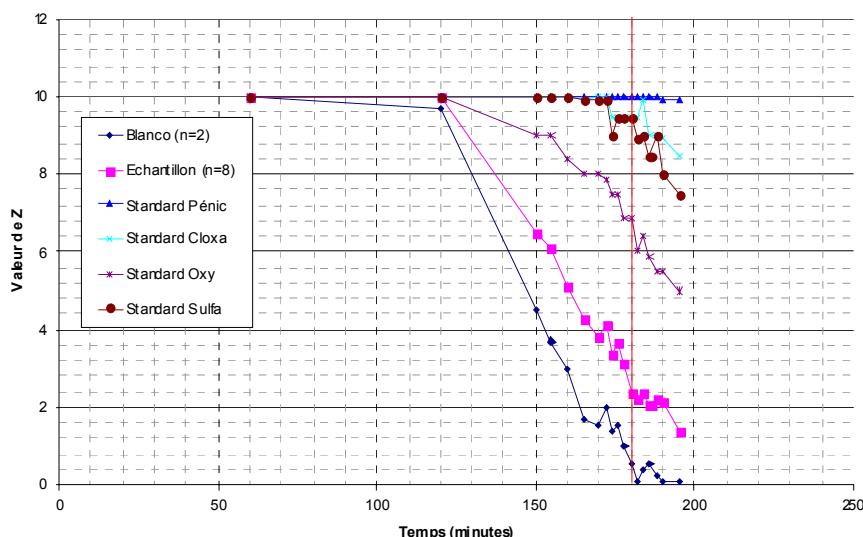


Figure 9-14. Cinétique d'acidification d'un lait cru (échantillon), d'un lait UHT (blancos), d'un lait dopé à la pénicilline, d'un lait dopé à la cloxacilline, d'un lait dopé à l'oxytétracycline et d'un lait dopé à la sulfaméthazine

La courbe de cinétique a été obtenue en incubant des barettes de microplaques contenant chacune les 4 standards de référence (laits dopés), 2 puits « blancos » (lait UHT) et 10 puits « échantillon » (lait cru). Les lectures des différentes barettes ont été effectuées après des durées d'incubation de 60, 120, 150, 155, 160, 165, 170, 172, 174, 176, 180, 182, 184, 186, 188, 190 et 195 minutes.

Après les 3 heures d'incubation préconisées, la valeur de Z obtenue pour le lait UHT est proche de 0 (moyenne de 2 valeurs pour chaque point) alors que la valeur observée pour le lait cru est supérieure à 2 (moyennes de 8 valeurs pour chaque point).

Cette cinétique permet de visualiser le comportement bactériostatique de l'oxytétracycline, de la sulfaméthazine et de la cloxacilline. L'activité de la pénicilline G reste pratiquement constante au cours de la durée de l'incubation (3h15 au total).

Tableau 9-15. Analyse de la variance multicritère

Analyse des valeurs de Z					
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Producteurs	45	285,5864312	6,3463651	64,69	<0,0001
Pasteurisation	1	55,8434843	55,8434843	569,26	<0,0001
Producteurs * Pasteurisation	45	60,1362379	1,3363608	13,62	<0,0001
Lot	2	12,9916304	6,4958152	66,22	<0,0001
Producteurs * Lot	90	93,5950362	1,0399448	10,60	<0,0001
Pasteurisation * Lot	2	21,5624758	10,7812379	109,90	<0,0001
Prod. * Pasteur. * Lot	90	97,5619686	1,0840219	11,05	<0,0001
Bloc (lot)	6	101,1516304	16,8586051	171,85	<0,0001
Analyse des interprétations "Positif – Négatif"					
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Producteurs	45	35,59178744	0,79092861	58,79	<0,0001
Pasteurisation	1	0,00000000	0,00000000	0,00	1,0000
Producteurs * Pasteurisation	45	1,66666667	0,03703704	2,75	<0,0001
Lot	2	0,61956522	0,3978261	23,03	<0,0001
Producteurs * Lot	90	3,32487923	0,3694310	2,75	<0,0001
Pasteurisation * Lot	2	0,01086957	0,00543478	0,40	0,6678
Prod. * Pasteur. * Lot	90	2,82246377	0,03136071	2,33	<0,0001
Bloc (lot)	6	0,84782609	0,14130435	10,50	<0,0001

Parmi les autres composantes de l'analyse de la variance, les différences mises en évidence sont explicables d'une part par le producteur 32 et par l'effet « Lot », clairement identifié dans les autres essais.

Dans le cadre d'une analyse basée sur le protocole de détection actuel (analyse du lait cru, pasteurisé, en présence de pénicillinase et après dilution), il peut paraître important de vérifier la cohérence de la valeur seuil, à partir du moment où la pasteurisation conduit à des différences significatives.

Pour une valeur de Z égale à 4,5, la correspondance entre les résultats obtenus sur laits crus et sur laits pasteurisés peut être chiffrée (**Tableau 9-16**). La valeur utilisée correspond à la moyenne calculée sur les doublets.

L'analyse montre que 9 des 10 résultats pour lesquels l'interprétation est contradictoire sont à attribuer au lot 3. Ces 10 résultats concernent en fait 6 échantillons, dont l'échantillon P32, déjà signalé à la figure 9-13.

Tableau 9-16. Correspondance entre les résultats obtenus sur laits crus et sur laits pasteurisés (moyenne des doublets analysés)

		Lait pasteurisé	
		Positifs (%)	Négatifs (%)
Lait crus	Positifs (%)	10 (2,42)	6 (1,45)
	Négatifs (%)	4 (0,97)	394 (95,17)

Dans ce dernier essai, l'analyse des résultats obtenus pour les « Blancos » montrent 100 % de réponses négatives ($n = 18$, moyenne = 3,3 ; coefficient de variation = 10,56 % ; max : 4,0 ; min : 2,9). Il s'agit ici du même échantillon de lait que celui utilisé dans l'essai 2.

9.9. Conclusions

Cette étude avait pour objectif d'évaluer le CMT, test microbiologique utilisé pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait. Cette évaluation reprenait une étude d'homogénéité du test au travers différents lots, au sein de chacun des lots, la détermination de la sensibilité du test vis à vis de différents antibiotiques, le comportement du test vis à vis de laits crus de tank et la mise en évidence d'un effet éventuel de la pasteurisation (voir le protocole de détection des résidus inhibiteurs dans le lait suivi en Belgique dans le cadre officiel de la détermination de la qualité du lait).

Les essais menés dans le cadre de cette évaluation montrent que le temps d'incubation de trois heures est nécessaire pour réduire la variabilité des résultats, qu'il s'agisse de la détermination de la sensibilité du test ou de son comportement vis à vis des laits de ferme.

Le CMT présente une sensibilité proche de la LMR pour 5 des antibiotiques étudiés (**Tableau 9-17**).

Le CMT présente une sensibilité équivalente à celle du Delvotest®MCS (test officiellement utilisé en Belgique pour la détermination des antibiotiques dans le lait, dans les conditions de

mise en œuvre déterminées par la firme DSM Gist) en ce qui concerne la tylosine. Sa sensibilité aux antibiotiques à noyau β -lactame (cloxacilline et pénicilline) est moindre mais elle est plus proche des LMR respectives. En ce qui concerne la sulfaméthazine, le CMT la décèle à une concentration égale à la LMR (alors que le Delvotest[®]MCS la détecte à une concentration inférieure à LMR/4). Pour l'oxytétracycline et la dihydrostreptomycine, le CMT présente une meilleure sensibilité.

Tableau 9-17. Limite de sensibilité du CMT ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Antibiotique	LMR	LOD
Pénicilline	4	2,9
Cloxacilline	30	21,6
Tylosine	50	26,6
Sulfaméthazine	100	97,6
Oxytétracycline	100	144
Dihydrostreptomycine	200	850 < x

Les conditions d'obtention de la meilleure sensibilité sont favorables au CMT. En effet, la durée d'incubation (fixée à 3 heures pour le CMT et variable pour chaque lot pour le Delvotest[®]MCS) et la température d'incubation (64°C +/- 1°C pour le CMT et 64°C +/- 0,5°C pour le Delvotest[®]MCS) sont plus facilement maîtrisables au niveau du laboratoire.

L'analyse systématique sur chaque microplaqué, d'échantillons de contrôle (4 antibiotiques et 2 blancos) montre que le CMT présente un taux de faux positifs (relatif aux blancos) important (20,8 % pour 2,8 % pour le Delvotest[®]MCS) et un taux de faux négatifs de 0 %. La remise en question de la valeur de Z utilisée (4,5) pourrait conduire à une réduction de ce taux de faux positifs. Les limites de sensibilité du test devraient alors être ré-évaluées avec cette nouvelle valeur seuil.

En ce qui concerne l'homogénéité, un effet « Lot » est apparu lors des différents essais. Au cours du premier essai, un effet « Bloc » est aussi apparu. Cet effet n'a cependant pas pu être attribué à une variabilité entre blocs ou intra blocs, ces derniers étant constitués de plusieurs, microplaques. L'effet « Lot » a par ailleurs été mis en évidence sur le Delvotest[®]MCS lors d'essais antérieurs (Dehareng F. *et al.*, 2003).

La pasteurisation ne présente pas d'effet sur le résultat du test (exprimé sous la forme positif ou négatif). Par contre, l'utilisation des valeurs de Z conduit à un effet « Pasteurisation ».

Une conclusion importante de ces essais concerne l'utilisation de la valeur de Z enregistrée pour chaque échantillon. En effet, les analyses effectuées montrent que les effets observés lorsque le traitement statistique est appliqué à la valeur Z, sont réduits ou même gommés lorsque le traitement est appliqué à l'interprétation de cette valeur (positif ou négatif). Il ne faut pourtant pas perdre de vue que, si cette valeur de Z est intéressante d'un point de vue scientifique, seule son interprétation est utilisée dans la pratique. De plus, la gamme de résultats obtenus sur les laits de ferme (2,5 à 4,5 pour les laits crus et 1,5 à 4,5 pour les laits pasteurisés) montre que le choix d'un échantillon blanco est particulièrement délicat : tous ces échantillons conduisent à un résultat négatif lors de l'interprétation de la valeur de Z. Des études complémentaires sont à mener pour étudier l'influence potentielle de la composition du lait (et notamment les modifications consécutives aux traitements thermiques).

Quelques recommandations peuvent être formulées au terme de ce travail.

La remise en question de la valeur de Z utilisée (et préconisée par la firme) permettrait de réduire le pourcentage de résultats faux positifs enregistrés pour les échantillons « blancos », donc exempts de substances inhibitrices. Les limites de sensibilité du test vis à vis des antibiotiques analysés seraient alors à recalculer.

Pour gérer au mieux l'effet « lot » mis en évidence pour le CMT (mais que l'on retrouve pour d'autres tests microbiologiques), le choix de confirmer les résultats positifs sur un lot déterminé apparaît comme une solution acceptable. Cette manière de procéder est déjà d'application dans le cadre de la détermination officielle de la qualité du lait fourni aux acheteurs.

Les résultats enregistrés pour les blancos montrent que la nature de ce blanco est importante. Les résultats obtenus pour les laits de ferme confirment ce fait. Il serait judicieux d'évaluer différents échantillons de lait avant de choisir le blanco à utiliser. De plus, la nature du blanco est importante lorsque l'échantillon a subi une pasteurisation : un effet pasteurisation a été mis en évidence. Il est donc normal de comparer les résultats obtenus pour un lait pasteurisé (échantillon en cours de confirmation) avec un blanco de même nature ou d'utiliser une valeur de Z adaptée.

Si les valeurs de Z obtenues pour les échantillons de lait de tank (crus) semblent élevées, le calibrage du scanner et sa stabilité de lecture pourraient être mis en cause. Une manière simple de vérifier cette stabilité est d'inclure, lors de chaque lecture, une carte de trois ou quatre couleurs dont la valeur de Z doit se trouver dans un intervalle donné. Cette tolérance serait

déterminée lors de l'étalonnage du scanner (au moyen d'une carte colorimétrique de référence, type Kodak). Si la valeur de Z calculée pour ces trois ou quatre couleurs de référence ne correspond pas, le scanner doit être ré-étalonné. Dans le cas contraire, les valeurs relatives aux échantillons sont acceptées.

CHAPITRE 10 : DE LA STABILITÉ DES STANDARDS UTILISÉS COMME CONTRÔLE LORS DES TESTS MICROBIOLOGIQUES

10.1. Introduction

Lors des analyses microbiologiques ou autres, il est important de mettre en place un système de gestion de la qualité des résultats, garantissant ainsi le bon déroulement de l'analyse. En effet, tous les laboratoires réalisant les contrôles de la détection des antibiotiques dans le lait utilisent des solutions standards d'antibiotiques. Les tests de screening microbiologiques sont généralement validés au moyen de solution de référence permettant de doper des échantillons avec les molécules à tester, dans des gammes de concentrations ciblées autour des LMR par exemple (Heitzman R.J., 1994 – Boisson J.O. & Keng L.J.-Y., 1998^a – Boisson J.O. & Keng L.J.-Y., 1998^b – Cherlet M. *et al.*, 2003 – Hernandez-Arteseros J.A. *et al.*, 2002). Dans un autre domaine, les solutions de standards d'antibiotiques sont utilisées pour complémenter les milieux de culture mis en œuvre lors de la détermination de différents paramètres de caractérisation des souches bactériennes, notamment en ce qui concerne leur sensibilité aux antibiotiques lors de traitements médicaux⁴⁸.

Lors de la mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait, l'utilisation de laits dopé et non dopé comme contrôles positif et négatif conduit à la préparation de standards, constitués de lait cru. La préparation de ces standards est longue et fastidieuse. Une conservation à long terme représente donc un avantage non négligeable pour le laboratoire, tant en terme d'économie qu'en terme de déchets.

10.2. Objectifs

Au cours de cette étude, la stabilité des standards utilisés comme témoin positif ou négatif est évaluée après conservation par lyophilisation et congélation à -20°C.

L'évolution du lait cru lors de sa conservation par congélation est importante à un autre niveau puisqu'il s'agit de conserver des échantillons déclarés positifs lors des contrôles officiels en vue d'une éventuelle contra-analyse ultérieure.

⁴⁸ Clinical and Laboratory Standards Institute (formely NCCLS), Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically ; Approved Standard, 7th ed., CLSI Catalog M7-A7, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006

10.3. Matériel et méthodes

10.3.1. Comptage des germes

10.3.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de lait cru sont préparés au départ d'un lait cru de tank provenant du Département *Productions et nutrition animales* (CRA-W) [CRAX-D6]. Le lait, conservé à 4°C, est réparti dès sa réception en trois lots (**Tableau 10-1**). Un lait UHT est utilisé comme contrôle stérilisé.

Tableau 10-1. Préparation des échantillons – stabilité des standards

	Lait 1	Lait 2	Lait 3	Lait 4
Nature du lait	Cru entier	Cru entier	Cru entier	UHT demi-écrémé
Nombre d'échantillons	50	50	50	12
Volume par échantillon (mL)	50	50	50	50
Température à la réception	4°C	4°C	4°C	Ambiante
Température ambiante (23°C) – avant conditionnement	0 heures	4 heures	8 heures	Sans objet
Température de stockage	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C

10.3.1.2. Préparation des milieux

- PCA SM (*Plate Count Agar Skim Milk*)

Le milieu PCA SM est préparé en diluant 2 g de poudre PCA SM (Merck 1.15338) dans 100 mL d'eau osmosée (système Elix 10 – Millipore) dans une bouteille Schött de 200 mL. Les bouteilles de PCS SM sont stérilisées à l'autoclave 15 minutes à 121°C et refroidies au bain-marie à 50°C jusqu'à utilisation.

- Diluant

Une solution d'eau de Ringer est utilisée comme diluant. Elle est obtenue en dissolvant une pastille de Ringer (Merck 1.15525.0001) dans 500 mL d'eau osmosée. Cette solution d'eau de Ringer est répartie dans des tubes à raison de 9 mL de solution par tube. Les tubes, bouchonnés, sont stérilisés 15 minutes à 121°C et refroidis à température ambiante jusqu'à utilisation. Ils peuvent être conservés plusieurs jours avant usage.

10.3.1.3. Décongélation des échantillons

Les échantillons sont décongelés dans un bain-marie agitant (15°C) pendant 1 heure.

10.3.1.4. Préparation des dilutions

Avant prélèvement, l'échantillon est par simple retournement du flacon. Cette homogénéisation permet de bien répartir la répartition de la charge microbienne dans l'ensemble du volume. A la pipette stérile, 1 mL d'échantillon est prélevé et est ajouté dans un tube de 9 mL de diluant (eau de Ringer). Cette première dilution (10^{-1}) est homogénéisée au vortex pendant 5 à 10 secondes. La seconde dilution (10^{-2}) est obtenue en ajoutant 1 mL de la dilution 10^{-1} à 9 mL de diluant. Cette séquence de dilutions est répétée afin d'obtenir les dilutions décimales suivantes (10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; ...). Avant chaque prélèvement, la dilution utilisée est homogénéisée 5 à 10 secondes au vortex.

10.3.1.5. Ensemencement et incubation

Le comptage est réalisé sur deux boîtes de pétri pour chaque dilution obtenue : 1 mL de la dilution est transféré de manière stérile dans une boîte de pétri stérile de 90 mm de diamètre. Dans chaque boîte de pétri, 12 à 15 mL de milieu de culture PCA SM sont ajoutés stérilement. L'inoculum est réparti dans le milieu par un mouvement circulaire appliqué aux boîtes de pétri. Ces dernières sont laissées sur une surface horizontale fraîche afin de permettre la solidification du milieu. Une fois le milieu solidifié, les boîtes sont retournées et incubées à l'étuve à 30°C pendant 72 heures.

10.3.1.6. Comptage

Toutes les colonies visibles à l'œil nu sont comptabilisées. Pour calculer le nombre de micro-organismes par mL de produit, seuls les dénombrements faits sur des boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 10 et 300 sont utilisés. La formule suivante est alors appliquée :

$$N = \frac{\sum_{\text{Colonies}}}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

dans laquelle Σ_{Colonies} représente la somme des colonies comptées dans toutes les boîtes retenues,

n_1 : nombre de boîtes comptées à la première dilution,

n_2 : nombre de boîtes comptées à la seconde dilution,

d : facteur de dilution correspondant à la première dilution.

10.3.2. Suivi du pH de laits congelés

10.3.2.1. Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés pour le suivi du pH sont les échantillons préparés au point 10.3.1. Comptage des germes.

10.3.2.2. Décongélation des échantillons

La décongélation est identique à celle mise en œuvre dans le point 10.3.1. Comptage des germes.

10.3.2.3. Prise du pH

Le pHmètre (WTW pH 320) est étalonné au moyen de solutions tampons à pH 4.01 (WTW pH 4.01) et à pH 7.00 (WTW pH 7.00), préalablement amenées à 15°C (température des échantillons). La prise de pH se fait quotidiennement pendant 50 jours pour les échantillons de lait cru et hebdomadairement pendant 12 semaines pour le lait UHT.

10.3.3. Détermination de la perte en eau après lyophilisation

10.3.3.1. Congélation

Les échantillons (lait cru ou dilution d'antibiotique) sont congelés à -20°C. Pour les dilutions d'antibiotique, 25 fioles contenant 0,5 mL de solution sont congelées.

10.3.3.2. Lyophilisation

Lors de la lyophilisation, l'eau, contenue dans les échantillons, est sublimée (passage de la forme solide à la forme gazeuse) par le biais du vide créé dans la chambre de lyophilisation. Elle est ensuite condensée dans un piège à glace (**Figure 10-1**).

Le lyophilisateur utilisé (Lyovac GT2) permet de boucher les flacons, dès la fin de lyophilisation, avant la remise du vide à l'air (abaissement du plateau supérieur). Cette façon de procéder permet de conserver les échantillons sous vide sans reprise d'eau lors de la fermeture.

Pour les dilutions d'antibiotique, 25 fioles sont lyophilisées par concentration (fraction de 0,5 mL par concentration).

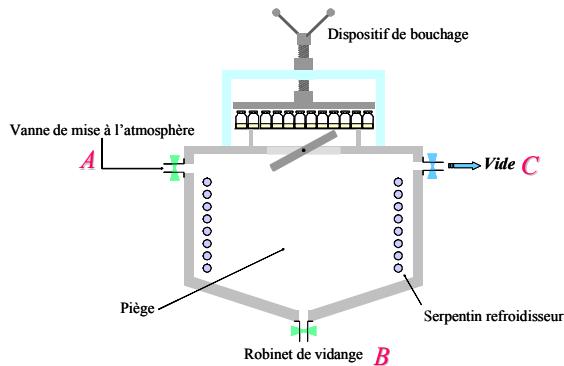


Figure 10-1. Lyophilisateur Lyovac GT2

10.3.3.3. Calcul de la teneur en matière sèche après lyophilisation

Le calcul de la matière sèche permet de caractériser la perte en eau subie par l'échantillon au cours du processus de lyophilisation. Pour évaluer si de l'eau persiste après cette étape, un séchage complémentaire est mené sur les poudres obtenues après lyophilisation. Plusieurs matières sèches sont alors calculées et comparées entre elles, afin d'évaluer si la lyophilisation est suffisante pour la conservation des échantillons. Ces matières sèches correspondent à la matière sèche calculée juste après lyophilisation (% MS), à celle calculée après un séchage de 1 heure à 103°C (% MS₀) et à celle calculée après un séchage de 2 heures à 103°C (% MS₁).

Les calculs sont réalisés sur une série de 10 fioles de lait contenant chacune 5 mL de lait.

A la balance analytique, chaque fiole est pesée individuellement (T). Après ajout de 5 mL de lait, chaque fiole est alors repesée (MF). Les fioles sont mises à lyophiliser pendant 24 heures.

Après lyophilisation, les fioles sont pesées à la balance analytique (ML).

Les fioles sont placées à l'étuve à 103°C pendant 1 heure. Après refroidissement au dessiccateur, les fioles sont pesées (MS₀). Les fioles sont remises à l'étuve à 103°C pendant 1 heure. Après refroidissement au dessiccateur, les fioles sont pesées (MS₁).

Les trois pourcentages de matière sèche se calculent au moyen des trois équations suivantes

$$\% \text{ MS} = \frac{\text{ML} - \text{T}}{\text{MF} - \text{T}} \cdot 100$$

$$\% \text{ MS}_0 = \frac{\text{MS}_0 - \text{T}}{\text{MF} - \text{T}} \cdot 100$$

$$\% \text{ MS}_1 = \frac{\text{MS}_1 - \text{T}}{\text{MF} - \text{T}} \cdot 100$$

dans lesquelles

T : la masse de la fiole (g)

MF : masse de la fiole remplie de 5 mL de lait (g)

ML : masse de la fiole contenant le lait après lyophilisation (g)

MS₀ : masse de la fiole contenant le lait lyophilisé après le premier séchage (g)

MS₁ : masse de la fiole contenant le lait lyophilisé après le second séchage (g)

10.3.4. Analyse de la sulfadiazine par HPLC

10.3.4.1. Réactifs

- Solution de fluorescamine

25 mg de fluorescamine (SIGMA F 9015) sont pesés dans un ballon de 50 mL. La solution est réalisée dans de l'acétone.

- Tampon pH 3

24,612 g d'acétate de sodium anhydre (SIGMA S 2889) sont dissous dans 100 mL d'eau osmosée. Le pH est ajusté à 3 au moyen d'acide chlorhydrique concentré 37 %.

- Acétate de sodium 1,25 M

10,254 g d'acétate de sodium anhydre sont dissous dans 100 mL d'eau osmosée.

- Acide acétique

20 mL d'acide acétique glacial (SIGMA A 6283) sont portés à 1 litre avec de l'eau osmosée.

- Etalon interne (sulfaméthazine à 4 mg·L⁻¹)

40 mg de sulfaméthazine (SIGMA S 6256) sont dissous dans 10 mL d'éthanol, portés à 1 litre avec de l'eau osmosée. Cette solution est diluée 10 fois pour obtenir la concentration souhaitée (10 mL portés à 100 mL avec de l'eau osmosée).

- Acétonitrile (Acros Organics 26826-0025)

10.3.4.2. Paramètres HPLC

Système de pompage : Waters Alliance® Separations module 2690

Détecteur de fluorescence Waters 474 Scanning Fluorescence Detector
 Four externe Waters (piloté par le détecteur Indice de Réfraction Waters 410)
 Boucle d'injection de 100 µl
 Colonne Waters Symmetry® C₁₈ (particules : 5 µm – colonne 250 mm · 4,6 mm)
 Température des échantillons : 4°C
 Température de colonne : 40°C
 Volume injecté : 50 µl
 Phase mobile : acide acétique/acétonitrile (v/v : 60/40)
 $\lambda_{\text{excitation}}$: 405 nm
 $\lambda_{\text{émission}}$: 495 nm
 Logiciel de traitement : Millenium 32TM (*Waters SA*)

10.3.4.3. Protocole

Le lait est écrémé par centrifugation 20 minutes à 5.000 tours·minute⁻¹ (3.300 g). Dans un tube à essai, 0,05 mL de standard interne (sulfaméthazine) sont ajoutés à 1,95 mL de lait écrémé. Après ajout de 2 mL d'HCl 2 N (UCB 2610), le mélange est vortexé et laissé à reposer pendant 5 minutes. Après filtration sur filtre papier, à 1 mL de filtrat sont ajoutés 0,780 mL d'acétate de sodium 1,25 M, 1 mL de tampon 3 M à pH 3 et 0,600 mL de solution de fluorescamine. Le mélange est laissé à température ambiante pour permettre la réaction de fluorescence pendant au moins 30 minutes. 2 mL sont filtrés sur filtre 0,45 µm dans une fiole HPLC.

10.3.5. Préparation des dilutions d'antibiotiques

Différentes solutions d'antibiotiques sont préparées par dilutions successives (**Tableau 10-2**).

Tableau 10-2. Concentrations des différentes solutions d'antibiotiques

Antibiotique	Concentrations préparées
Pénicilline G (lait)	2.000 – 100 – 14 ^a – 15 ^a – 16 ^a – 17 ^a – 18 ^a – 19 ^a – 20 ^a – 21 ^a – 22 ^a – 23 ^a – 24 ^a – 25 ^a
Sulfadiazine (lait)	1.000 – 450 ^a – 500 ^a – 550 ^a – 600 ^a – 650 ^a – 700 ^a – 750 ^a – 800 ^a – 850 ^a
Oxytétracycline (lait)	10.000 – 1.800 ^a – 2.000 ^a – 2.200 ^a – 2.400 ^a – 2.600 ^a – 2.800 ^a – 3.000 ^a – 3.200 ^a – 3.400 ^a
Cloxacilline (lait)	1.000 – 160 ^a – 180 ^a – 200 ^a – 220 ^a – 240 ^a – 260 ^a – 280 ^a – 300 ^a

^a : dilutions lyophilisées (µg·L⁻¹)

Les produits proviennent de la société Sigma (sulfadiazine SIGMA S 8626 – oxytétracycline SIGMA O 5875 – cloxacilline SIGMA C 9393) et de la société Continental Pharma (Pénicilline G 1.000.000 U.I.).

10.3.6. Conservation des dilutions d'antibiotiques

10.3.6.1. La congélation

Les dilutions d'antibiotiques sont réparties dans des flacons (25) par fraction de 0,5 mL. Ces flacons sont bouchonnés et congelés à -20°C.

10.3.6.2. La lyophilisation

Par concentration, 25 fioles contenant 0,5 mL de solution, sont lyophilisées.

10.3.7. Reconstitution des échantillons

Les échantillons lyophilisés (fraction initialement lyophilisée pour les dilutions : 0,5 mL) sont reconstitués par ajout de 5 mL de lait, ce qui conduit à une dilution d'un facteur 10 de la solution initiale.

Pour les échantillons congelés, 4,5 mL de lait sont ajoutés à la fraction congelée de 0,5 mL pour conduire à un facteur de dilution de 10 équivalent au facteur de dilution des échantillons lyophilisés.

10.5. Résultats

10.5.1. Limites de sensibilité du Delvotest® MCS

Au cours de cette étude, la limite du Delvotest® MCS a été déterminée pour quatre antibiotiques (la pénicilline G, la cloxacilline, l'oxytétracycline et la sulfadiazine). Une première série de dilutions a été réalisée en ciblant les LMR respectives (**Tableau 10-3**).

Tableau 10-3. Dilutions préparées ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest® MCS – série 1

	Dilution 1- 1	Dilution 1- 2	Dilution 1- 3	Dilution 1- 4	Dilution 1- 5
Pénicilline G	1	2	3	4	5
Cloxacilline	20	30	50	60	70
Sulfadiazine	50	75	100	125	150
Oxytétracycline	100	200	300	400	500

La zone comprise entre la dernière dilution donnant un résultat négatif (8 puits sur 8) et la première donnant un résultat positif (8 puits sur 8) a été subdivisée pour affiner la limite de détection. Les lectures ont été réalisées visuellement.

Tableau 10-4. Limite de sensibilité du Delvotest® MCS – pourcentage d'inhibition totale série 1

	Dilution 1-1	Dilution 1-2	Dilution 1-3	Dilution 1-4	Dilution 1-5
Pénicilline G	100	100	100	100	100
Cloxacilline	100	100	100	100	100
Sulfadiazine	100	100	100	100	100
Oxytétracycline	0	100	100	100	100

Une première limite a pu être fixée pour chacun des antibiotiques (**Tableau 10-4**). Cette première limite a cependant dû être affinée pour chacune des molécules étudiées. En effet, les résultats montrent que pour trois des antibiotiques (pénicilline G, cloxacilline et sulfadiazine), la limite est inférieure à la première concentration mise en œuvre.

Tableau 10-5. Dilutions préparées (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest® MCS – série 2

	Dilution 2-1	Dilution 2-2	Dilution 2-3	Dilution 2-4	Dilution 2-5
Pénicilline G	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Cloxacilline	2	3	5	6	7
Sulfadiazine	5	7,5	10	12	15

Pour l'oxytétracycline, la limite de détection est comprise entre les deux premières concentrations, à savoir entre 100 et 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La zone de concentrations comprise entre 0 et la première dilution a été divisée de façon à affiner la limite (**Tableau 10-5**). L'oxytétracycline n'a pas fait l'objet de cette série intermédiaire.

Tableau 10-6. Limite de sensibilité du Delvotest® MCS – pourcentage d'inhibition totale série 2

	Dilution 2-1	Dilution 2-2	Dilution 2-3	Dilution 2-4	Dilution 2-5
Pénicilline G	0	0	0	0	0
Cloxacilline	0	0	0	0	0
Sulfadiazine	0	0	0	0	0

Les résultats de cette série de dilutions (**Tableau 10-6**) permettent de dire que la limite de sensibilité du Delvotest® MCS à la pénicilline G est comprise entre $0,5 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (série 2) et $1 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (série 1), à la cloxacilline à une teneur comprise entre $7 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (série 2) et $20 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (série 1) et à la sulfadiazine à une teneur comprise entre $15 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (série 2) et $50 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (série 1).

Tableau 10-7. Dilutions préparées (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest® MCS – série 3

	Dilution 3-1	Dilution 3-2	Dilution 3-3	Dilution 3-4	Dilution 3-5
Pénicilline G	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Cloxacilline	9	11	13	15	18
Sulfadiazine	20	25	30	35	40
Oxytétracycline	100	125	150	175	200

Une troisième série de dilutions (**Tableau 10-7**) a été préparée sur base des résultats obtenus pour les deux premières séries.

Les résultats de cette troisième série de dilutions (**Tableau 10-8**) ont permis de fixer la limite de sensibilité du Delvotest® MCS à la pénicilline à $1 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et à l’oxytétracycline à $200 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (première concentration donnant 100 % de résultats positifs).

Tableau 10-8. Limite de sensibilité du Delvotest® MCS – pourcentage d’inhibition totale série 3

	Dilution 3-1	Dilution 3-2	Dilution 3-3	Dilution 3-4	Dilution 3-5
Pénicilline G	0	0	0	0	100
Cloxacilline	0	0	0	0	100
Sulfadiazine	0	0	0	0	0
Oxytétracycline	0	0	0	0	100

Les deux autres antibiotiques ont été analysés dans une dernière série de dilutions (**Tableau 10-9**).

Tableau 10-9. Dilutions préparées (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pour déterminer la limite de sensibilité du Delvotest® MCS – série 4

	Dilution 4-1	Dilution 4-2	Dilution 4-3	Dilution 4-4
Cloxacilline	17	18	19	20
Sulfadiazine	35	40	45	50

Les résultats obtenus pour ces dernières dilutions (**Tableau 10-10**) permettent de fixer la limite de sensibilité du Delvotest® MCS aux deux derniers antibiotiques utilisés comme standards lors de la méthode officielle utilisée en Belgique.

Ces analyses successives ont permis de déterminer la limite de sensibilité du Delvotest® MCS aux quatre antibiotiques utilisés comme standards lors de la détermination de la présence d'antibiotiques dans le lait en Belgique (**Tableau 10-11**).

Tableau 10-10. Limite de sensibilité du Delvotest® MCS – pourcentage d'inhibition totale série 4

	Dilution 4-1	Dilution 4-2	Dilution 4-3	Dilution 4-4
Cloxacilline	0	0	100	100
Sulfadiazine	0	0	0	100

La sensibilité est par contre trop faible pour l'oxytétracycline. Pour résoudre cet excès de sensibilité, dans un premier temps, le législateur belge a introduit dans la méthode de détection la notion de dilution. La non-spécificité des tests microbiologiques a conduit dans un second temps à introduire les tests rapides, spécifiques du groupe des antibiotiques à noyau β -lactame, dans le schéma de détection.

La comparaison de ces limites de détection avec les limites maximales de résidus correspondantes montre que le Delvotest® MCS présente une sensibilité trop importante à 3 des 4 molécules étudiées (pénicilline G, cloxacilline et sulfadiazine).

Tableau 10-11. Limite de sensibilité du Delvotest® MCS (ppb ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

	Pénicilline G	Cloxacilline	Sulfadiazine	Oxytétracycline
Limite de détection	1	19	50	200
LMR (ppb ou $\mu\text{g}/\text{L}$)	4	30	100	100

10.5.2. Détermination de la teneur en matière sèche après lyophilisation

La détermination de la matière sèche est effectuée sur 10 flacons directement après la lyophilisation. Elle se fait par séchage en deux étapes : une première mesure se fait après un séchage de 1 heure à 103°C et une seconde mesure se fait après un séchage de 2 heures à 103°C (**Tableau 10-12**).

La comparaison des moyennes obtenues pour les différentes séries permet de vérifier la présence éventuelle d'une eau résiduelle, non éliminée par la lyophilisation. Cette comparaison permet d'évaluer l'efficacité du séchage par procédé de lyophilisation. On ne peut cependant parler d'échantillons indépendants, chaque résultat correspondant à une étape supplémentaire dans l'histoire de l'échantillon. Les tests statistiques seront donc conduits sur les échantillons associés par paires, chaque mesure représentant la masse d'un même échantillon à différents moments.

Les conditions d'application du test (caractère aléatoire et simple des échantillons et normalité de la population de la différence) sont moins restrictives que si on se réfère aux deux populations (normalité). Dans ces conditions, le test d'hypothèse nulle devient $H_0 = m_1 = m_2$ ou $\delta = 0$

Tableau 10-12. Données brutes obtenues lors de la détermination de la teneur en matière sèche après lyophilisation

T Masse de la fiole (g)	MF Masse de la fiole remplie de lait (g)	ML Après lyophilisation (g)	MS ₀ Après séchage 1 heure à 103°C (g)	MS ₁ Après séchage 2 heures à 103°C (g)
1	7,8426	8,3496	7,8954	7,8945
2	7,9172	8,4161	7,9687	7,9679
3	7,8915	8,3910	7,9440	7,9431
4	7,8748	8,3854	7,9279	7,9277
5	7,9047	8,4098	7,9574	7,9567
6	7,8632	8,3652	7,9161	7,9149
7	7,9119	8,4227	7,9650	7,9645
8	7,8280	8,3314	7,8804	7,8798
9	7,8335	8,3467	7,8871	7,8862
10	7,8932	8,3981	7,9457	7,9449

Pour réaliser le test d'égalité des moyennes, la quantité $t_{1-\alpha/2}$ est comparée à la quantité t_{obs} calculée de la manière suivante :

$$t_{\text{obs}} = \frac{|d|}{\sqrt{\frac{\text{SCE}_d}{n \cdot (n-1)}}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\text{SCE}_d}{n \cdot (n-1)}}}$$

L'hypothèse H_0 d'égalité des moyennes si $t_{\text{obs}} \geq t_{1-\alpha/2}$, avec $n-1$ degrés de liberté est alors rejetée. La vérification de l'égalité des moyennes après lyophilisation et après le premier séchage (1 heures à 103°C) est réalisée sur les données brutes (**Tableau 10-13**).

Tableau 10-13. Pourcentage de matière sèche obtenus après les étapes de lyophilisation (MS), séchage 1 (MS_0) et séchage 2 (MS_1)

	% MS	% MS_0	% MS_1
1	10,41	10,24	10,20
2	10,32	10,16	10,12
3	10,51	10,33	10,17
4	10,40	10,36	10,30
5	10,43	10,29	10,29
6	10,54	10,30	10,28
7	10,40	10,30	10,24
8	10,41	10,29	10,29
9	10,44	10,27	10,27
10	10,40	10,26	10,24
Moyenne	10,43	10,28	10,24
Ecart type	0,06	0,05	0,06
CV %	0,59	0,53	0,58

En supposant la population des différences normale, les composantes SCE_d et t_{obs} peuvent être calculés de la manière suivante :

$$SCE_d = \sum_{i=1}^n d_i^2 - \frac{1}{n} \cdot \left(\sum_{i=1}^n d_i \right)^2 = 0,24 - \frac{1}{10} \cdot 2,149 = 0,0264$$

$$t_{\text{obs}} = \frac{|d|}{\sqrt{\frac{SCE_d}{n \cdot (n-1)}}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{SCE_d}{n \cdot (n-1)}}} = \frac{| - 0,15 |}{\sqrt{\frac{0,0264}{90}}} = 8,758$$

En comparant cette valeur à la valeur $t_{0,975} = 2,262$ (9 degrés de liberté), il est clair que l'échantillon lyophilisé contient encore de l'eau résiduelle puisqu'il y a une perte après la première heure de séchage. Les différences systématiques observées révèlent déjà la présence d'un biais, de l'ordre de 0,15 %.

Ce même calcul, appliqué aux teneurs en matière sèche mesurées entre le premier et le second séchage, permet d'évaluer la perte résiduelle après deux heures de séchage à 103°C.

En supposant la population des différences normale, les deux composantes SCE_d et t_{obs} peuvent être calculés de la manière suivante :

$$SCE_d = \sum_{i=1}^n d_i^2 - \frac{1}{n} \cdot \left(\sum_{i=1}^n d_i \right)^2 = 0,0365 - \frac{1}{10} \cdot 0,1575 = 0,0208$$

$$t_{obs} = \frac{|\bar{d}|}{\sqrt{\frac{SCE_d}{n \cdot (n-1)}}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{SCE_d}{n \cdot (n-1)}}} = \frac{|-0,04|}{\sqrt{\frac{0,0208}{90}}} = 2,6311$$

En comparant cette valeur à la valeur $t_{0,975} = 2,262$ (9 degrés de liberté), on remarque une perte d'eau encore significative (0,04 %) pour les échantillons.

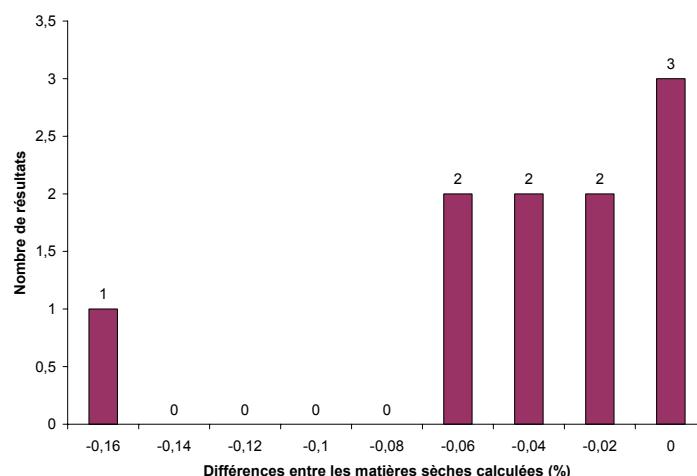


Figure 10-2. Répartition des pertes en eau lors du second séchage

Cependant, des disparités importantes apparaissent cependant entre les échantillons. En effet, trois échantillons ne présentent plus de perte en eau (masse de matière sèche identique avant et après séchage) alors qu'un échantillon présente une différence de 0,16 % (**Figure 10-2**).

Les mesures de la teneur en eau, réalisées tout au long du processus de lyophilisation et de séchage, montre que 99,8 % de l'eau est éliminée lors de la lyophilisation (**Tableau 10-14**)

Dans le cadre de cette étude, le séchage par lyophilisation peut être considéré comme suffisant. Il serait cependant intéressant de disposer de la mesure de l'activité de l'eau (a_w) afin de vérifier si la teneur en eau résiduelle ne peut plus permettre le développement de micro-organismes. Il ne faut pas oublier que la matrice de base de préparation des échantillons est un lait cru. Les standards pourraient être préparés dans une matrice « lait pasteurisé » ou « lait UHT » si le traitement thermique n'interfère pas dans la détection des antibiotiques et si la présence naturelle de micro-organismes s'avérait préjudiciable à la conservation des standards.

Tableau 10-14. Globalisation des résultats de mesure de la matière sèche après lyophilisation, après séchage 1 heure à 103°C et après séchage 2 heures à 103°C

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	0,5070	0,0528	0,0519	0,0517	0,4542	0,0009	0,0002	0,4553	99,76	0,20	0,04
2	0,4989	0,0515	0,0507	0,0505	0,4474	0,0008	0,0002	0,4484	99,78	0,18	0,04
3	0,4995	0,0525	0,0516	0,0508	0,4470	0,0009	0,0008	0,4487	99,62	0,20	0,18
4	0,5106	0,0531	0,0529	0,0526	0,4575	0,0002	0,0003	0,4580	99,89	0,04	0,07
5	0,5051	0,0527	0,0520	0,0520	0,4524	0,0007	0,0000	0,4531	99,85	0,15	0,00
6	0,5020	0,0529	0,0517	0,0516	0,4491	0,0012	0,0001	0,4504	99,71	0,27	0,02
7	0,5108	0,0531	0,0526	0,0523	0,4577	0,0005	0,0003	0,4585	99,83	0,11	0,07
8	0,5034	0,0524	0,0518	0,0518	0,4510	0,0006	0,0000	0,4516	99,87	0,13	0,00
9	0,5132	0,0536	0,0527	0,0527	0,4596	0,0009	0,0000	0,4605	99,80	0,20	0,00
10	0,5049	0,0525	0,0518	0,0517	0,4524	0,0007	0,0001	0,4532	99,82	0,15	0,02
Moyenne									99,79	0,16	0,04

A : matière fraîche (g) – B : matière après lyophilisation (g) – C : matière après la 1^{ère} heure de séchage (g) – D : matière après la 2^{ème} heures de séchage (g) – E : eau éliminée lors de la lyophilisation (g) – F : eau éliminée lors du premier séchage (g) – G : eau éliminée lors du second séchage (g) – H : eau totale éliminée (g) – I : eau éliminée lors de la lyophilisation (en % de l'eau totale éliminée) – J : eau éliminée lors du premier séchage (en % de l'eau totale éliminée) – K : eau éliminée lors du second séchage (en % de l'eau totale éliminée)

Les deux calculs montrent que la lyophilisation n'élimine pas la totalité de l'eau contenue dans le lait. Mais, la quantité d'eau éliminée lors des différentes étapes de contrôle (lyophilisation, séchage 1 et séchage 2) peut être quantifiée.

10.5.3. Suivi du pH et de la contamination bactérienne d'un lait conservé par congélation

Pour suivre l'évolution du pH et de la teneur en germes d'un lait cru, un volume de lait a été divisé en trois échantillons identiques (**Figure 10-3**).

En maintenant les conditions de travail à 4 °C (en chambre frigorifique), le premier de ces sous-échantillons a été conditionné en piluliers de 50 mL, ces derniers étant congelés immédiatement à -20°C.

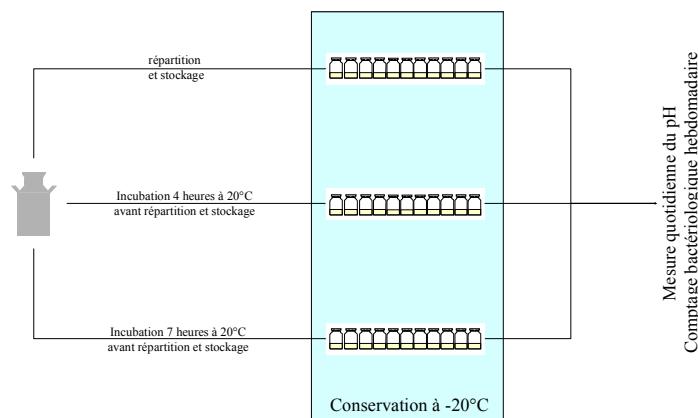


Figure 10-3. Schéma de répartition du lait cru pour le suivi du pH et de la charge en germes, après congélation

Le second échantillon de lait est resté à température ambiante (environ 23°C) pendant une période de 4 heures avant d'être conditionné en piluliers de 50 mL et congelé (-20°C). Le troisième volume de lait est resté à température ambiante (environ 23°C) pendant une période de 8 heures avant d'être conditionné en piluliers de 50 mL et congelé (-20°C).

Tableau 10-15. Comptage et mesure du pH réalisés pendant une période de 54 jours sur du lait cru congelé et sur du lait UHT

Jour	Lait Lot 1 (conditionné immédiatement)		Lait Lot 2 (4 heures à 23°C)		Lait Lot 3 (8 heures à 23°C)		Lait UHT
	pH	Comptage	pH	Comptage	pH	Comptage	pH
1	6,90	$1,90 \cdot 10^5$	6,84		6,85	$72,00 \cdot 10^5$	
9	6,83	$1,56 \cdot 10^5$	6,82	$2,00 \cdot 10^5$	6,81	$4,00 \cdot 10^5$	6,80
17	6,82	$1,80 \cdot 10^5$	6,81	$1,50 \cdot 10^5$	6,78	$3,90 \cdot 10^5$	6,83
25	6,87	$1,70 \cdot 10^5$	6,86	$1,80 \cdot 10^5$	6,84	$2,80 \cdot 10^5$	6,77
33	6,89	$1,25 \cdot 10^5$	6,89	$1,14 \cdot 10^5$	6,87	$2,80 \cdot 10^5$	6,72
45	6,83	$1,51 \cdot 10^5$	6,81	$1,80 \cdot 10^5$	6,79	$2,60 \cdot 10^5$	6,72
54	6,78	$1,81 \cdot 10^5$	6,79	$1,93 \cdot 10^5$	6,78	$2,20 \cdot 10^5$	6,72

La conservation des échantillons a duré 9 semaines, au cours desquelles le pH a été mesuré quotidiennement sur des échantillons et le comptage bactérien a été réalisé de façon hebdomadaire (**Tableau 10-15**).

Cette cinétique (**Figure 10-4**) permet plusieurs observations : les trois laits crus, provenant d'un même lait initial, présentent des variations de pH similaires, même si elles sont minimes. La soustraction d'un pH initial, calculé comme moyenne des 5 premiers résultats, des autres

résultats montre trois zones distinctes dans l'évolution des pH des trois laits congelés (**Figure 10-5**). La première zone serait due à la présence d'un groupe bactérien acidifiant, la seconde zone correspondrait à l'activité d'un groupe bactérien basifiant et la troisième résulterait de la reprise d'une activité acidifiante. Les comptages réalisés ne permettent pas d'obtenir une information sur la nature des germes présents. En effet, aucune tendance précise ne se dégage des comptages réalisés. L'identification et le comptage des groupes de germes présents dans le lait seraient un élément déterminant, permettant d'évaluer l'évolution potentielle du lait à la conservation par congélation en vue de son utilisation dans la préparation de standards dopés.

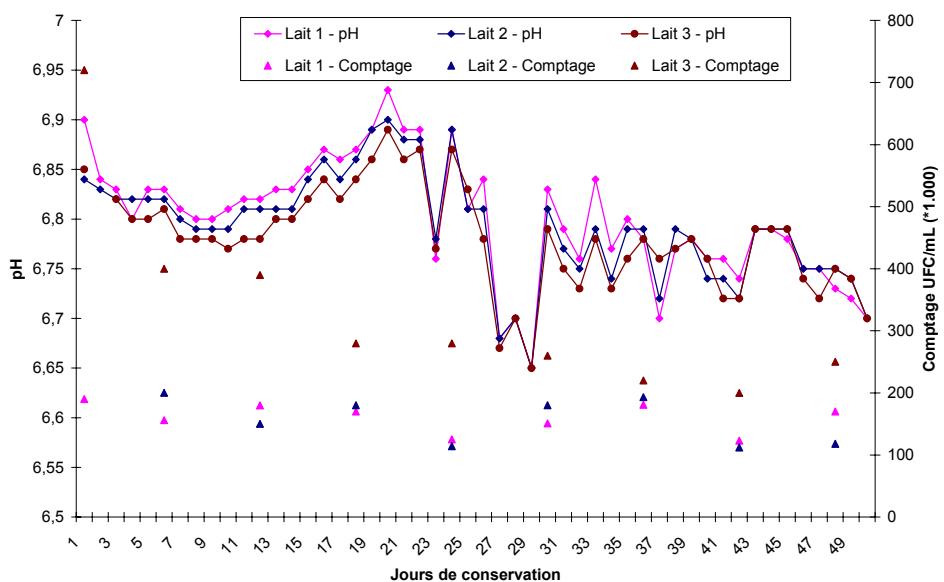


Figure 10-4. Evolution des laits congelés : pH et comptage microbien

Le pH du lait est le résultat de la compétition qu'il peut exister entre les différentes flores initialement présentes dans le lait : le caractère acidifiant ou basifiant d'un groupe ou l'autre va l'emporter en fonction du développement de ce groupe, avec pour conséquence, une baisse ou une augmentation du pH.

Ces résultats montrent l'importance à apporter au choix du lait qui servira de matrice pour préparer des standards antibiotiques destinés aux tests à inhibition bactérienne. En effet, le principe de nombreux tests d'inhibition bactérienne repose sur l'acidification d'un milieu de culture en présence d'un indicateur de pH. L'utilisation d'un lait acide ou acidifié (résultat de l'activité de germes acidifiant) peut conduire à une interprétation erronée d'un résultat négatif,

celui-ci étant dû, non pas à la croissance de la souche test mais à une matrice acide ou acidifiante.

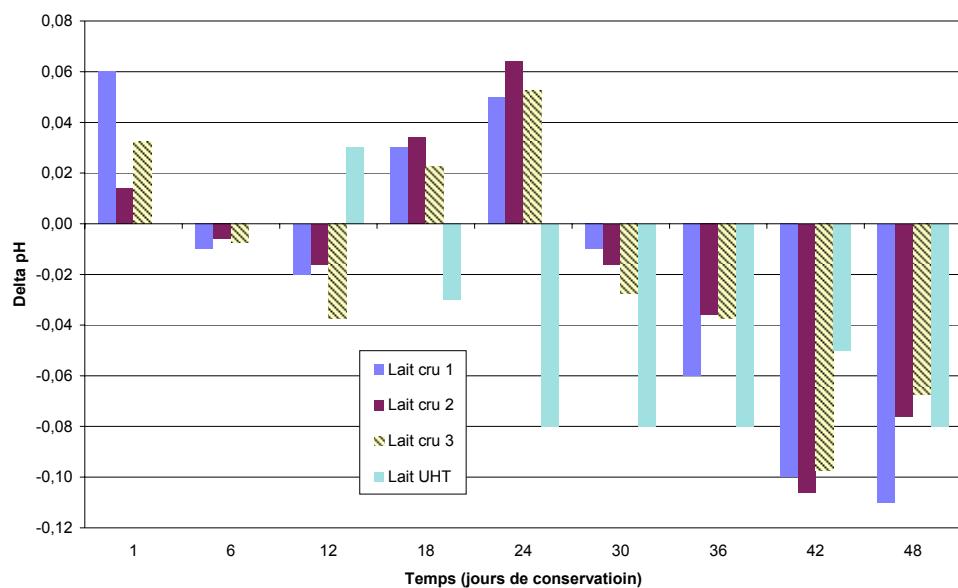


Figure 10-5. Suivi du pH de laits crus congelés

Les résultats obtenus ont une autre conséquence importante : en Belgique, comme dans d'autres pays européens, les laits donnant un résultat positif lors du contrôle officiel sont congelés en vue d'une éventuelle contre-analyse. Si ces échantillons ne présentent pas une qualité microbiologique initiale suffisante, leur conservation par congélation peut conduire à infirmer un premier résultat positif non pas par absence d'agent inhibiteur mais par acidification due à l'évolution de l'échantillon.

10.5.4. Suivi de la stabilité de quatre antibiotiques utilisés comme standards lors des tests d'inhibition bactérienne – conservation par congélation ou par lyophilisation

Les standards ont été réalisés au départ d'un lait UHT. En effet, ce dernier présente une légère acidification au cours de sa conservation mais, le pH se stabilise au cours du temps (**Figure 10-5**). Ce choix permet d'éviter les interférences dues à l'évolution de la flore microbienne du lait cru lors de sa conservation.

Quatre antibiotiques ont été choisis pour évaluer la stabilité des standards selon deux modes de conservation (congélation à -20°C et lyophilisation). Pour chacun des antibiotiques, 9 concentrations (**Tableau 10-16**) ont été préparées et 25 flacons de chaque concentration ont été

stockés selon l'un ou l'autre mode de conservation. Pendant 11 semaines, une série de chaque concentration a été analysées au moyen du Delvotest® MCS.

Le choix des concentrations pour chaque antibiotique repose sur les données fournies par la société DSM. La première concentration correspond à « LOD – 10 % », la seconde à la LOD, les suivantes étant une suite croissante par saut de 10 % (environ) au départ de la LOD. Le choix des concentrations exactes a été fait pour faciliter la préparation des échantillons. Les teneurs en antibiotiques dans les échantillons conservés sont 10 fois plus concentrées car, lors de la reconstitution, ces échantillons sont dilués d'un facteur 10, de manière à obtenir une concentration identique à celle étudiée sur échantillon frais.

Tableau 10-16. Concentrations en antibiotique préparées pour évaluer la stabilité au mode de conservation (lyophilisation et congélation à -20°C)

	Concentrations (en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb)
Pénicilline G	14 – <u>15</u> – 17 – 18 – 20 – 21 – 23 – 24 – 25
Cloxacilline	160 – <u>180</u> – 190 – 200 – 220 – 250 – 260 – 280 – 300
Sulfadiazine	450 – <u>500</u> – 550 – 600 – 650 – 700 – 750 – 800 – 850
Oxytétracycline	1.800 – <u>2.000</u> – 2.200 – 2.400 – 2.600 – 2.800 – 3.000 – 3.200 – 3.400
<i>Ital.</i> : 10 * limite de détection	

Lors des différentes séries d'analyse, chaque concentration est analysée à 10 reprises. Lors de cet essai, la lecture des résultats s'est faite de manière visuelle.

Un résultat est considéré comme positif lorsque la coloration de la gélose (indicateur BCP mauve) n'est pas modifiée, révélant ainsi la présence d'un agent inhibiteur en concentration suffisante pour empêcher le métabolisme de la souche et la production de l'acide lactique, responsable du virage de l'indicateur.

Le résultat est considéré comme négatif lorsque la coloration de la gélose est passée du mauve au jaune, révélant ainsi la présence notamment d'acide lactique, indicateur du métabolisme et de la croissance de la bactérie test.

Un résultat est considéré comme douteux lorsqu'un retard de croissance est mis en évidence : des reflets jaunes et mauves dans la coloration de la gélose indiquent une croissance partiellement inhibée. L'interprétation visuelle de ces résultats se révèle plus difficile et demande une formation rigoureuse.

Tableau 10-17. Résultats obtenus pour la Pénicilline G au cours de 11 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS

Semaine	Type	1,4 ppb			1,5 ppb			1,7 ppb			1,8 ppb			2,0 ppb			2,1 ppb			2,3 ppb			2,4 ppb			2,5 ppb		
		N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P
1	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
2	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
3	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
4	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
5	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
6	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
7	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
8	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
9	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
10	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
11	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	

L : lyophilisé – C : congelé – N : résultat négatif – P : résultat positif – D : résultat douteux

Pour la pénicilline, au cours des 11 semaines de conservation, les résultats ne diffèrent pas pour les deux modes de conservation (**Tableau 10-17**) et la limite de sensibilité correspond bien à la limite annoncée par le fabricant.

Tableau 10-18. Résultats obtenus pour la Cloxacilline au cours de 11 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS

Semaine	Type	16 ppb			18 ppb			19 ppb			20 ppb			22 ppb			25 ppb			26 ppb			28 ppb			30 ppb		
		N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P
1	L	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
2	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
3	L	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
4	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
5	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
6	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
7	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
8	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
9	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
10	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
11	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10

L : lyophilisé – C : congelé – N : résultat négatif – P : résultat positif – D : résultat douteux

Pour la cloxacilline, la réponse dans le temps reste constante à partir de la dilution 19 ppb, que ce soit en mode de conservation par congélation ou en mode de conservation par lyophilisation (**Tableau 10-18**). Cette concentration correspond à la LOD annoncée (18 ppb).

Tableau 10-19. Résultats obtenus pour la Sulfadiazine au cours de 11 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS

Semaine	Type	45 ppb			50 ppb			55 ppb			60 ppb			65 ppb			70 ppb			75 ppb	
		N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D
1	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
2	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
3	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
4	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
5	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
6	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
7	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
8	L	-	10	-	10	-	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
9	L	10	-	-	10	-	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
10	L	-	10	-	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
11	L	10	-	-	10	-	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-

L : lyophilisé – C : congelé – N : résultat négatif – P : résultat positif – D : résultat douteux

Les échantillons dopés à la sulfadiazine présentent plus de variation dans les résultats entre les deux modes de conservation (**Tableau 10-19**). En effet, pour les concentrations les plus basses, on constate que lors de certaines séries d'analyses, les résultats sont de 100 % positifs pour la congélation alors qu'ils sont de 100 % négatifs pour la lyophilisation (semaines 7, 8, 9 et 10 pour les concentrations 45 et 50 ppb).

Tableau 10-20. Résultats obtenus pour l'oxytétracycline au cours de 10 semaines de conservation des échantillons – Delvotest® MCS

Semaine	Type	180 ppb			200 ppb			220 ppb			240 ppb			260 ppb			280 ppb			300 ppb			320 ppb			340 ppb		
		N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P	N	D	P
1	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
2	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
3	L	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
4	L	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
5	L	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
6	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
7	L	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
8	L	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
9	L	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
10	L	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
	C	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10
11	L	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	
	C	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	-	-	10	

L : lyophilisé – C : congelé – N : résultat négatif – P : résultat positif – D : résultat douteux

Pour l'oxytétracycline, les résultats obtenus au cours du temps semblent évoluer pour les deux modes de conservation (**Tableau 10-20**). En effet, lors de la mise en place de l'essai et lors de la première semaine de conservation, la limite de détection du test était de 220 ppb, tant pour les standards congelés que pour les standards lyophilisés. A partir de la 7^{ème} semaine, toutes les concentrations donnent un résultat positif. Lors de la 11^{ème} semaine, les concentrations 180 ppb et 200 ppb donnaient un résultats douteux pour les 10 analyses réalisées. Afin d'éviter des différences d'interprétation, toutes les lectures ont été réalisées par un seul opérateur, à un moment similaire de la journée (élimination d'interférences d'éclairage notamment).

Pour tenter de maîtriser les résultats douteux et les affecter soit à la classe positive, soit à la classe négative, des essais ont été menés en spectrométrie UV, en utilisant un lecteur de microplaques. Cette façon de procéder permettait aussi de répondre à la législation belge qui prévoit, dans son arrêté du 6 novembre 2001 que « *l'appréciation de la coloration s'effectue par la mesure spectrophotométrique de l'absorption à une seule ou à plusieurs longueurs d'onde spécifiques* ». Lors de ces essais, différentes longueurs d'onde ont été testées (405 nm – 450 nm – 590 nm) avec ou sans longueur d'onde de référence (608 nm) sur des microplaques préparées au laboratoire (milieu PCA additionné de spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, de triméthoprime et de pourpre de bromocrésol) sur des laits exempts de substances inhibitrices et sur des laits dopés à des teneurs en pénicilline, notamment, inhibitrices. Les résultats obtenus, si ils semblaient prometteurs sur des solutions pures (eau ou antibiotiques), ont montré qu'en présence de lait, la lecture au spectromètre UV était irréaliste. En effet, la présence du lait ou de résidus de matière grasse, l'évolution de la gélose (apparition de bulles suite à l'incubation) donnaient des réponses aberrantes lors des lectures au spectromètre. Pour ces différentes raisons, les essais menés sur ce mode de lecture ont donc été abandonnés.

Par contre, la société produisant le Delvotest[®] MCS a développé un système de lecture automatisé, basé sur le principe de réflectométrie : les microplaques sont scannées et les images ainsi obtenues sont analysées au moyen d'un logiciel d'analyse d'image, permettant d'objectiver le résultat mesuré. Le logiciel utilisé permet de localiser chaque puit de la microplaques et de numériser la coloration propre à chacun de ses puits. La numérisation correspond à l'attribution d'une valeur Z, intégrant les trois couleurs universelles. Ces valeurs sont alors comparées à une valeur seuil, permettant l'identification des puits positifs et des puits négatifs. Ce principe de lecture est aussi développé, notamment pour le Copan Milk Test, déjà mentionné. Le système de lecture est calibré au moyen d'une carte photo professionnelle associée à un fichier informatique

reprenant les valeurs colorimétriques de l'image de référence. Dans le cadre d'une utilisation légale (détermination de la qualité du lait en vue de son payement), la valeur seuil doit être identique dans les différents laboratoires de contrôle.

Tableau 10-21. Composition des 16 dilutions utilisées pour l'évaluation de la lecture automatisée du Delvotest® MCS

	Antibiotique	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb)	Résultats théoriques
1	Pénicilline	4	+
2	Pénicilline	8	+
3	Pénicilline	2	+/-
4	Cloxacilline	30	+
5	Cloxacilline	60	+
6	Cloxacilline	15	+/-
7	Sulfadiazine	100	+
8	Sulfadiazine	200	+
9	Sulfadiazine	50	-
10	Sulfaméthazine	100	+
11	Sulfaméthazine	200	+
12	Sulfaméthazine	50	-
13	Oxytétracycline	100	+/-
14	Oxytétracycline	200	+
15	Oxytétracycline	50	-
16	Blanco	0	-

L'évaluation de ce système de mesure et la détermination de la valeur seuil ont été menées conjointement dans différents laboratoires, notamment au sein du Département *Qualité des Productions agricoles* [CRAW-D7]. Les résultats obtenus au CRAW-D7 correspondent à l'analyse, lors de deux essais, de 16 échantillons de lait (**Tableau 10-21**).

Ces échantillons de lait ont été répartis aléatoirement (six répétitions) dans les 96 puits de microplaques. Lors de chacun des essais, 4 microplaques ont été utilisées. Après incubation selon les prescriptions de la société DSM, les plaques ont été lues au scanner et la répétabilité de lecture a été déterminée par cinq mesures, d'une série de plaques, la position de ces plaques sur le scanner étant modifiée à chaque lecture.

L'écart-type de répétabilité mesuré est de 0,39. De plus, l'écart-type ne change pas en fonction de la moyenne, ce qui montre que la dispersion des mesures ne dépend pas de la valeur de Z. La répétabilité de la lecture est donc jugée suffisante.

Tableau 10-22. Résultats de l'évaluation de la lecture automatisée du Delvotest® MCS – CRAW-D7 – Valeur de Z = -2,85

Antibiotique	Concentration (ppb)	Résultats théoriques	Résultats	Visuel		Automatique	
				Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs
Pénicilline	4	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	0	48
Pénicilline	8	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	0	48
Pénicilline	2	+/-	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	3	45
Cloxacilline	30	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	0	48
Cloxacilline	60	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	0	48
Cloxacilline	15	+/-	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	3	45	8	40
Sulfadiazine	100	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	2	46
Sulfadiazine	200	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	1	47
Sulfadiazine	50	-	Attendus	48	0	48	0
			Obtenus	18	30	26	22
Sulfaméthazine	100	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	44	4	38	10
Sulfaméthazine	200	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	4	44	9	39
Sulfaméthazine	50	-	Attendus	48	0	48	0
			Obtenus	46	2	47	1
Oxytétracycline	100	+/-	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	4	44	2	46
Oxytétracycline	200	+	Attendus	0	48	0	48
			Obtenus	0	48	0	48
Oxytétracycline	50	-	Attendus	48	0	48	0
			Obtenus	46	2	42	6
Blanco	0	-	Attendus	48	0	48	0
			Obtenus	48	0	48	0

L'utilisation du scanner a permis en outre de mettre en évidence une différence significative entre les deux lots de microplaques utilisées. Ces résultats signifient donc qu'il faut un nombre de lots importants pour fixer la valeur seuil, de façon à intégrer les variations possibles.

A partir des résultats obtenus au Département *Qualité des Productions agricoles*, une valeur seuil de $Z = -2,85$ a été fixée (**Tableau 10-22**). C'est cette valeur qui a permis d'obtenir une balance équilibrée entre les divergences observées pour les interprétations. Si la valeur avait été déterminée au départ du lot utilisé pour l'essai 1, elle aurait été de $Z = -4,30$ et elle aurait été de $Z = -2,85$ si elle avait été déterminée au départ du lot de l'essai 2.

La divergence est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Divergence} = \sum_{i=1}^{16} | \text{Résultats}_{\text{Attendus}} - \text{Résultats}_{\text{Obenus}} |$$

La divergence pour les résultats visuels est de 89 et elle est de 92 pour les résultats automatiques. La balance des divergences est donc de 3.

La valeur de seuil $Z = -2,85$ rejoint la valeur calculée au Comité du Lait de Battice où, environ 120 microplaques provenant de 6 lots différents ont été lues visuellement et automatiquement. Ces microplaques contenaient chacune 4 standards (blanco position A12 – sulfadiazine 100 ppb position B12 – cloxacilline 60 ppb position C12 et pénicilline 3 ppb position D12).

10.5.5. Suivi par HPLC de la teneur en sulfadiazine lors de la conservation de standard

L'instabilité des résultats obtenus pour la sulfadiazine (augmentation de l'activité antimicrobienne) a conduit à comparer les résultats microbiologiques à des résultats analytiques, obtenus par méthode chromatographique (HPLC couplé à un détecteur de fluorescence). Ces analyses chromatographiques ont été réalisées sur les mêmes échantillons.

Les conditions chromatographiques mises en œuvre dérivent d'une méthode chromatographique développée au sein du Département CRAW-D7. Cette méthode repose sur la séparation sur colonne chromatographique (HPLC) de composés fluorescents, constitués de sulfamides couplés à la fluorescamine (Chapitre 13 : Développement d'un outil chromatographique destiné à l'analyse des sulfamides).

La méthode utilisée permet de doser la sulfadiazine avec une limite de détection de l'ordre de quelques ppb. La limite de quantification se situe aux alentours de 10 ppb, en utilisant, dans ce cas, la sulfaméthazine comme standard interne. Cette façon de procéder permet de s'affranchir des erreurs de dosage dues à la manipulation et aussi de compenser les pertes dues à l'évolution du composé fluorescent, les deux cinétiques de perte de fluorescence étant parallèles (**Figure 10-6**).

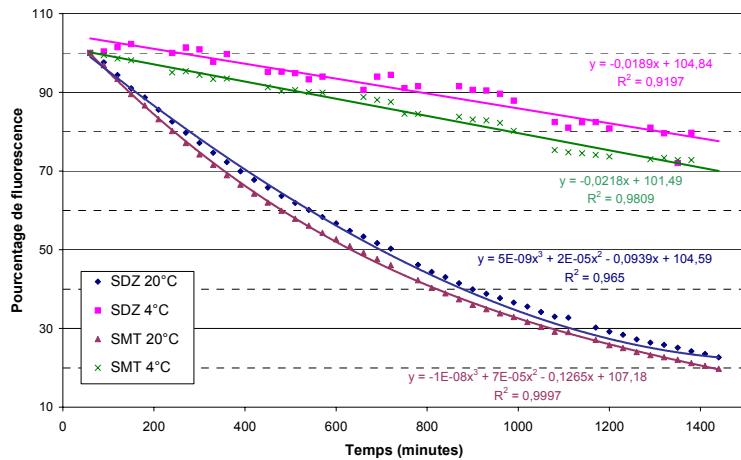


Figure 10-6. Evolution de la fluorescence de la sulfadiazine et de la sulfaméthazine au cours du temps (pourcentage d'aire, $T = 60$ minutes correspondant à 100 %)

Le calcul du pourcentage de fluorescence est obtenu en divisant la surface de la réponse au temps t par la surface de la réponse au temps $t = 60$ minutes (**Figure 10-6**).

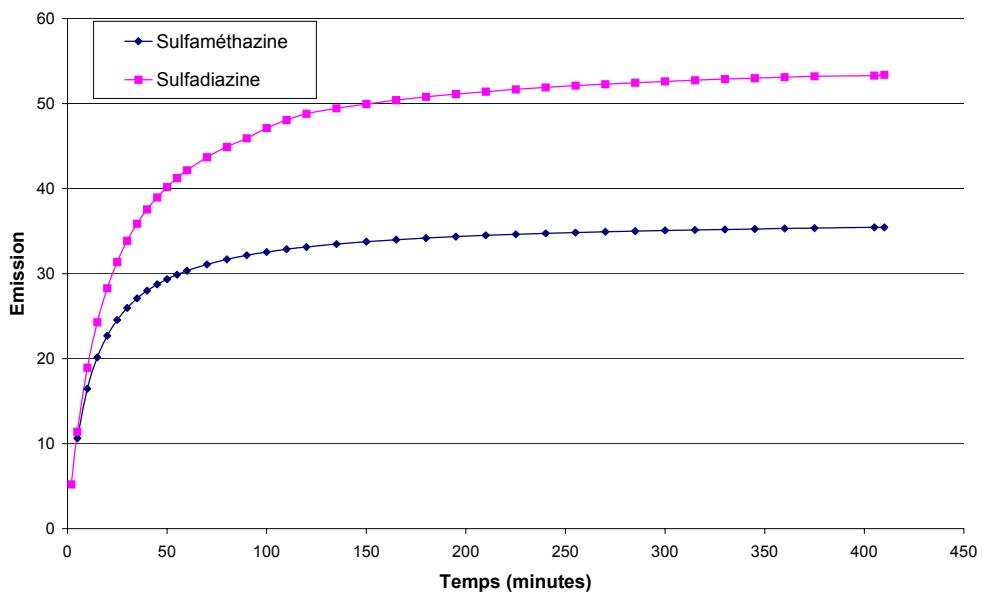


Figure 10-7. Cinétique d'émission de fluorescence – Sulfadiazine et Sulfaméthazine

Pour la plupart des sulfamides étudiés, ce temps de 60 minutes était suffisant pour obtenir la réponse maximale. Il apparaît cependant que, pour la sulfadiazine à 4 °C, la réaction de fluorescence continue au delà de ce temps : le maximum de la fluorescence est compris entre 150 et 210 minutes. Les cinétiques d'émission des deux composés montrent bien (**Figure 10-7**) que

le maximum d'émission est atteint plus rapidement pour la sulfaméthazine que pour la sulfadiazine.

Cette différence dans la cinétique d'émission et dans la perte de la fluorescence du complexe n'est pas préjudiciable à notre étude. En effet, pour les échantillons conservés à 4°C, le rapport entre la réponse de la sulfadiazine et de la sulfaméthazine, prise comme standard interne, varie de 120 à 121 % (à l'exception de la première mesure, réalisée après 30 minutes de stockage) après 24 heures de stockage (**Figure 10-8**).

Ce rapport passe de 107,5 % à 110 % pour les échantillons conservés à 20°C pendant la même période. Le système chromatographique étant équipé d'un passeur d'échantillon thermostaté à 4°C, le standard interne ajouté aux échantillons compense la perte de fluorescence. En effet, le comportement du standard interne est quasi identique à celui du sulfamide étudié.

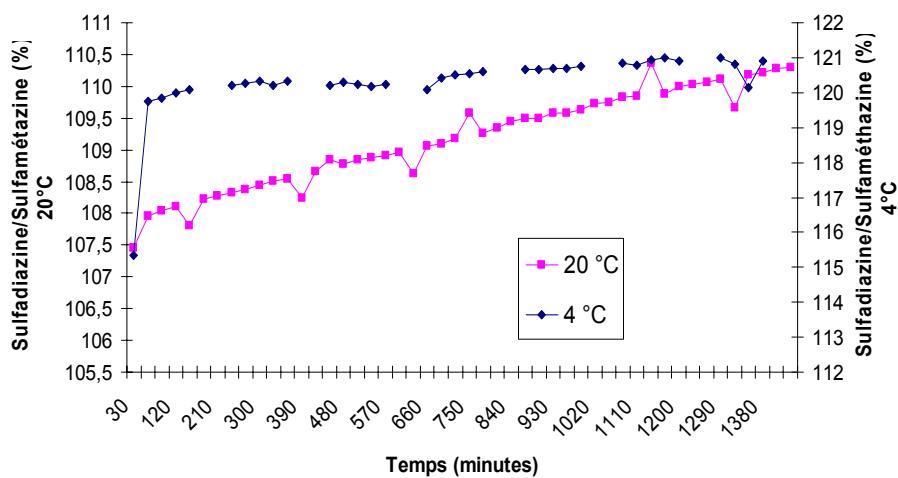


Figure 10-8. Evolution du rapport de la fluorescence de la sulfadiazine et de la sulfaméthazine (standard interne) au cours du temps

Le dosage de la sulfadiazine se fera donc par une droite ayant la forme suivante :

$$\frac{\text{Surface}_{\text{Sulfadiazine}}}{\text{Surface}_{\text{Sulfaméthazine}}} = f(\text{concentration})$$

Les dosages de sulfadiazine réalisés sur des échantillons de lait frais (dès la préparation des dilutions ou après conservation au réfrigérateur) montrent un taux de récupération de l'ordre de 85 % (**Tableau 10-23**).

Si les taux de récupération sont meilleurs pour le lait congelé, il apparaît aussi que la variabilité observée pour les différentes concentrations est plus importante.

Des échantillons analysés par méthode microbiologique ont été soumis à l'analyse chromatographique après 5 semaines de conservation par congélation et lyophilisation. Les résultats obtenus pour ces échantillons montrent une diminution de la teneur en sulfadiazine extraite (**Figure 10-9**).

Tableau 10-23. Taux de récupération sur laits frais, conservé au réfrigérateur (18 heures) et congelé (48 heures)

	Frais	18 h frigo	48 h congelé	Moyenne	Ecart type	CV %	Minimum	Maximum
45	91,9	85,0	95,8	90,9	5,48	6,0	85,0	95,8
50	88,8	81,0	92,9	87,6	6,07	6,9	81,0	92,9
55	91,5	85,3	97,1	91,3	5,87	6,4	85,3	97,1
60	89,2	84,3	90,7	88,1	3,37	3,8	84,3	90,7
65	85,7	86,8	99,3	90,6	7,55	8,3	85,7	99,3
70	86,9	84,1	95,3	88,8	5,83	6,6	84,1	95,3
75	89,7	84,4	97,6	90,5	6,67	7,4	84,4	97,6
80	90,5	84,1	106,1	93,6	11,33	12,1	84,1	106,1
85	87,5	84,7	101,9	91,4	9,25	10,1	84,7	101,9
Moyenne	89,1	84,4	97,4					
Ecart type	2,08	1,55	4,64					
CV %	2,3	1,8	4,8					
Maximum	91,9	86,8	106,1					
Minimum	85,7	81,0	90,7					

Les teneurs en sulfadiazine contenue dans les échantillons de lait sont inférieures aux teneurs initiales (**Figure 10-9**). En effet, le rendement moyen d'extraction pour l'ensemble des concentrations se situe, sur lait frais, à 89,1 % (**Tableau 10-24**).

Ce taux de récupération passe à 80,0 % pour les échantillons congelés et à 81,5 % pour les échantillons lyophilisés, avec une variabilité plus importante pour les laits après conservation. Cette moyenne reste cependant à nuancer, les faibles concentrations en sulfadiazine présentant un moins bon taux de récupération que les plus élevées. L'application du rendement d'extraction

du lait frais à ces échantillons montre une perte globale moyenne de 10,1 % pour le lait congelé et de 8,4 % pour le lait lyophilisé.

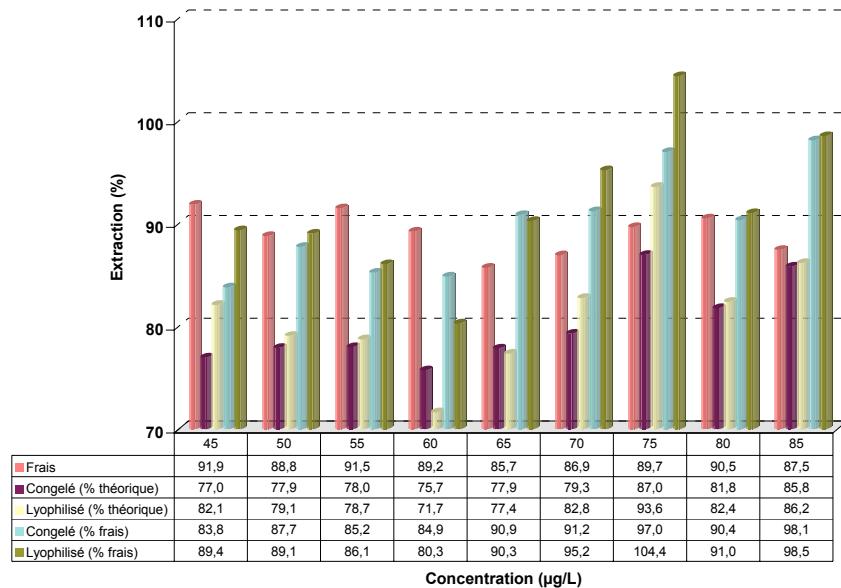


Figure 10-9. Rendement d'extraction de la sulfadiazine après conservation par lyophilisation et par congélation

Les résultats obtenus lors de l'analyse par chromatographie liquide montre une diminution de la teneur en sulfadiazine après 5 semaines de conservation, que cela soit par congélation ou par lyophilisation. Cette perte est légèrement perceptible lors de l'analyse des résultats microbiologiques.

Tableau 10-24. Taux de récupération sur lait frais, sur lait congelé et sur lait lyophilisé (après 5 semaines de conservation)

	Frais	Congelé (% théorique)	Lyophilisé (% théorique)	Congelé (% frais)	Lyophilisé (% frais)
Moyenne	89,1	80,0	81,5	89,9	91,6
Ecart type	2,08	3,97	6,10	5,12	7,04
CV %	2,3	5,0	7,5	5,7	7,7
Maximum	91,9	87,0	93,6	98,1	104,4
Minimum	85,7	75,7	71,7	83,8	80,3

En effet, pour les échantillons congelés, alors que les concentrations de 45 et de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ donnaient initialement 10 résultats positifs sur 10, l'ensemble des résultats obtenus pour ces deux concentrations après 5 semaines de congélation était douteux. Cette évolution, quoique

perceptible dans les résultats chromatographiques ne se traduit aucunement dans les résultats microbiologiques obtenus pour les échantillons lyophilisés.

10.6. Conclusions

Le suivi des standards lors de leur conservation, par congélation ou par lyophilisation, a permis de mettre en évidence les limites de détection annoncées par la firme produisant le Delvotest®MCS étaient respectées avec une tolérance de 10 % (LOD +/- 10 %), et ce, tout au long de la période de conservation de 11 semaines, que ce soit par congélation ou par lyophilisation. Les variations observées pour les faibles concentrations lors de la conservation de la sulfadiazine par congélation ont été confirmées par méthode analytique (chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence). Bien qu'une diminution de la teneur en sulfadiazine ait été montrée aussi sur les échantillons lyophilisés, celle-ci ne s'est pas traduite dans les faits lors de l'analyse microbiologique. Cette étude sur la conservation des standards n'a pas pris en compte le paramètre « lait ». En effet, le suivi du pH lors de la conservation d'un lait cru par congélation montre une acidification du lait, paramètre interférant lors de la détection microbiologique des antibiotiques. Ce paramètre devrait faire l'objet d'études ultérieures, la congélation étant le mode de conservation des échantillons en vue d'une éventuelle nouvelle analyse.

CHAPITRE 11 : LE *CHARM MRL β -LACTAME/TÉTRACYCLINE*, DÉTECTION DE DEUX GROUPES D'ANTIBIOTIQUES IMPORTANTS EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

11.1. Introduction

Le protocole belge de détermination de la qualité du lait en vue de son paiement aux producteurs a été modifié au 1^{er} janvier 2007 lors de l'introduction des tests rapides⁴⁹. Cette modification implique une évaluation des kits de détection rapides disponibles afin de déterminer leur potentiel dans un tel schéma de contrôle. Le test *Charm MRL β -lactame/Tétracycline (Charm MRL)* présente l'avantage de détecter deux groupes de molécules importantes en médecine vétérinaire. Il pourrait d'autre part être utilisé dans un cadre plus large de monitoring dédié à ces deux familles d'antibiotiques, permettant ainsi de vérifier rapidement le respect de la législation européenne en matière de résidus d'antibiotiques (Règlement (CEE) n°2377/90 du Conseil).

11.2. Objectifs

Les essais menés visent à évaluer le test *Charm MRL* (détection des antibiotiques à noyau β -lactame et des antibiotiques du groupe des tétracyclines) lors de son application sur la matrice « Lait ».

Cette évaluation comprend différents paramètres :

- l'homogénéité au sein du même lot
- l'homogénéité entre lots
- la sensibilité du test à différentes molécules : pénicilline G, ampicilline, amoxicilline (groupe des antibiotiques à noyau β -lactame) – oxytétracycline, chlortétracycline (groupe des tétracyclines)
- les interférences microbiologiques : germes – cellules somatiques
- les interférences chimiques : différentes molécules susceptibles de se trouver dans le lait (antibiotiques d'autres groupes, désinfectants, antiparasitaire)
- la stabilité de la réponse du test sur des échantillons conservés par congélation

⁴⁹ Référence de l'arrêté modifiant la détermination de la qualité du lait en Belgique

11.3. Principe du test et de son lecteur

Le test *Charm ROSA* est un test basé sur la capture d'un analyte par des récepteurs. Après l'ajout de l'échantillon, le premier réactif mis au contact du lait est une solution de billes dorées couplées à un récepteur présentant de l'affinité pour l'analyte. Si l'analyte est présent, il se lie à ces récepteurs conjugués.

L'échantillon et le récepteur migrent dans la tigette. La plupart des tests *Charm ROSA* présentent une ligne de test T et une ligne de contrôle C (**Figure 3-1**). Pour les tests quantitatifs ou multirésidus, il y a plusieurs lignes de tests et une seul ligne de contrôle. Ces lignes permettent la révélation de la présence du complexe analyte-conjugué.

En effet, la ligne T capture les conjugués qui ne se sont pas complexés à l'analyte présent dans l'échantillon. Si l'analyte est présent dans l'échantillon, il se lie à un récepteur (conjugué) avant la capture de celui-ci par la ligne T. La ligne C est configurée pour capturer les conjugués qui ne se sont pas liés à la ligne T. Lorsqu'ils sont liés à l'une ou l'autre ligne (T ou C), les conjugués produisent une couleur rouge.

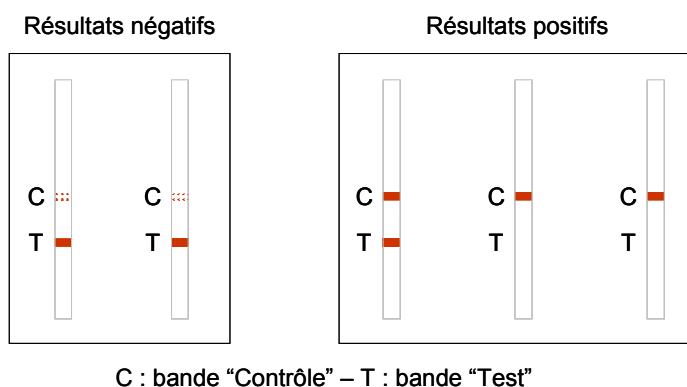


Figure 11-1. Interprétation du résultat obtenu avec le *Charm Rosa*

La présence de la ligne de contrôle indique que le test s'est bien déroulé : l'échantillon a migré correctement. Si la ligne de test est plus sombre ou de couleur similaire à la ligne de contrôle, le résultat du test est négatif. Si la ligne de test est plus clair que la ligne de contrôle ou absente de la tigette, le résultat du test est positif.

La tigette de test est introduite dans le lecteur pour interprétation. Le lecteur donne deux résultats : le premier est un résultat chiffré et le second est une interprétation de ce résultat par rapport à une valeur seuil. Pour les tests multirésidus, si le résultat du test est positif, le lecteur détermine quelle est la ligne de test responsable de ce résultat. Pour obtenir un résultat quantitatif, l'intensité de la ligne de test est comparée à une courbe standard prédefinie, qui permet le calcul de la concentration en analyte présent.

11.4. Essais et résultats

Le lait destiné à préparer les dilutions et les standards est un lait cru préalablement analysé pour vérifier l'absence de résidus appartenant au groupe des β -lactames ou des tétracyclines. Ce contrôle est effectué au moyen du *CHARM II* et du *Charm MRL*.

Le lait utilisé est aussi caractérisé en terme de qualité (germes et cellules) au moyen du BactoScan FC. Il provient de la ferme expérimentale du CRA-W (Département *Productions et nutrition animales*) et il est constitué du lait de tank provenant de vaches en bonne santé et n'ayant plus été traitée depuis au moins 30 jours.

La répartition des échantillons lors des séries d'analyse se fait de manière aléatoire.

La lecture des résultats et l'interprétation se fait au moyen du lecteur et du logiciel fourni par la société *Charm Sciences Inc.*

11.4.1. Homogénéité intra-lots

Pour évaluer l'homogénéité intra-lots, deux échantillons sont analysés : le standard (mélange Oxytétracycline – Pénicilline G) fourni avec le test, reconstitué dans du lait cru et le lait cru servant à la reconstitution du standard. Pour trois lots de kits, 10 analyses sont réalisées pour chacun des deux échantillons. La séquence d'analyses est aléatoire. Les réponses obtenues sont ensuite comparées au sein de chacun des lots. La comparaison porte sur la valeur de la réponse obtenue lors de la lecture du résultat et sur l'interprétation qui en est faite.

Les réponses obtenues pour les différents lots (**Tableau 11-1**) sont comparées entre elles afin de vérifier si un lot se démarque des autres.

Tableau 11-1. Homogénéité intra-lots – Globalisation des résultats

	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Minimum	Maximum
Lot 8 cru	-1214	362,9	-30	-1869	-780
Lot 8 standard	1766	236,7	13	1406	2083
Lot 9 cru	-1211	205,2	-17	-1566	-925
Lot 9 standard	2010	206,4	10	1800	2493
Lot 10 cru	-1140	316,2	-28	-1529	-599
Lot 10 standard	1976	412,3	21	1449	2704

Les valeurs mesurées lors de la lecture des résultats obtenus pour les différents lots donnent, pour le lait cru (identique pour les trois lots) des coefficients de variation allant de 17 à

30 %. Ces coefficients de variation vont, pour le lait dopé, de 10 à 20 %. Ces résultats pourraient laisser sous-entendre que les tests sont non-homogènes.

Il est cependant difficile de conclure à une hétérogénéité intra-lots. En effet, l'interprétation des résultats obtenus pour les laits crus non dopés conduit à 100 % de résultats négatifs et l'interprétation des résultats obtenus pour les laits dopés (standard) donne 100 % de résultats positifs pour chacun des lots étudiés.

Une étude sur un plus grand nombre de résultats devrait permettre de préciser l'homogénéité au sein d'un lot. De plus, cette homogénéité devrait être évaluée sur l'ensemble de la courbe de réponse et pas uniquement pour des valeurs extrêmes. En effet, il est important de voir comment le test se comporte à la limite de sensibilité.

11.4.2. Homogénéité Inter-lots

Afin d'évaluer l'homogénéité inter-lot, les réponses obtenues lors de l'essai 1 sont comparées pour les 3 lots analysés (deux échantillons analysés à dix reprises de manière aléatoire, pour chacun de lots). La comparaison porte sur la valeur de la réponse obtenue lors de la lecture du résultat et sur l'interprétation qui en est faite.

Tableau 11-2. Globalisation des résultats obtenus pour l'étude de l'homogénéité inter-lots

	A : lait cru			B : lait dopé (standard)		
	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 8	Lot 9	Lot 10
Nombre	10	10	10	10	10	9
Moyenne	-1214	-1211	-1140	1766	2010	1976
Ecart type	362.9	205.2	316.2	236.7	206.4	412.3
CV (%)	-30	-17	-28	13	10	21
Maximum	-780	-925	-599	2083	2493	2704
Minimum	-1869	-1566	-1529	1406	1800	1449

Les valeurs moyennes obtenues pour le lait cru sur les trois lots sont semblables, bien que présentant des coefficients de variation plus importants (**Tableau 11-2**). Les valeurs moyennes obtenues pour le standard divergent plus mais les coefficients de variations sont plus faibles.

L'analyse de la variance (**Tableau 11-3**) a été effectuée pour les réponses obtenues pour les 3 lots de tests, tant pour le lait blanc (A) que pour le standard (B). La comparaison entre le F_{obs} et le $F_{1-\alpha}$ repris dans les tables F de Snedecor (**Tableau 11-4**) conduit à l'acceptation

$(F_{\text{obs}} < F_{1-\alpha})$ ou au rejet ($F_{\text{obs}} > F_{1-\alpha}$) de l'hypothèse initiale, c'est à dire au rejet de l'égalité des moyennes.

Pour l'échantillon A, lait blanco, le nombre de degrés de liberté k_2 est en fait égal à 27. Les tables consultées ne donnant que la valeur pour $k_2 = 26$ et $k_2 = 28$, les deux comparaisons ont été effectuées. Elles conduisent toutes deux à la même interprétation, c'est à dire à l'acceptation de l'égalité des moyennes pour les différentes valeurs de α considérées : $F_{\text{obs}} (0,244) < F_{1-\alpha}$ (3.34 dans les conditions les plus strictes). Pour l'échantillon B, lait dopé, le nombre de degrés de libertés k_2 est égal à 26. La valeur de $F_{1-\alpha}$ est égale à 3.37 dans les conditions les plus strictes. Cette valeur est supérieure à la valeur F_{obs} égale à 2.013.

Tableau 11-3. Analyse de la variance (lait blanco A et lait dopé – Standard B)

Lait blanco A				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	2	35286.5	17643.23	$F_{\text{obs}} = 0.244$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	27	1948561.4	72168.94	
Totaux	29	1983847.9		
Lait dopé – Standard B				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	2	348176.0	174087.98	$F_{\text{obs}} = 2.014$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	26	2247930.6	86458.87	
Totaux	28	2596106.6		

Pour les deux types d'échantillons, la comparaison entre les valeurs F_{obs} avec les différentes valeurs F théoriques (**Tableau 11-4**) conduit à l'acceptation de l'hypothèse nulle, même au niveau 0,05, c'est à dire avec un risque d'erreur de première espèce inférieur à 5 %. Aucune différence n'apparaît entre les trois lots étudiés en terme de valeurs de réponse. Il en est de même pour l'interprétation qui est faite de ces réponses (résultats positif ou négatif). En effet, 100 % des laits non dopés conduisent à un résultat négatif et 100 % des standards conduisent à un résultat positif.

Ces résultats sont cependant à nuancer : en effet, il faudrait, comme pour l'évaluation de l'homogénéité intra-lots, réaliser un plus grand nombre de mesures. Ces mesures devraient concerner un plus grand nombre de lots et un nombre d'analyses plus important par lot. De plus, il faudrait étendre la gamme de molécules testées aux autres antibiotiques à noyau β -lactame et la gamme de concentrations analysées.

Tableau 11-4. Valeurs de $F_{1-\alpha}$ extraites des tables F de Snedecor (Dagnelie P., 1975)

	$k_1 = 2$ $k_2 = 26$	$k_1 = 2$ $k_2 = 28$	$k_1 = 1$ $k_2 = 18$	$k_1 = 3$ $k_2 = 30$	$k_1 = 3$ $k_2 = 40$	$k_1 = 4$ $k_2 = 40$	$k_1 = 4$ $k_2 = 50$	$k_1 = 2$ $k_2 = 26$	$k_1 = 2$ $k_2 = 27$
$p = 0,95$	3,37	3,34	4,41	2,92	2,84	2,61	2,56	3,37	3,34
$p = 0,975$	4,27	4,22	5,98	3,59	3,46	3,13	3,06	4,27	4,22
$p = 0,99$	5,53	5,45	8,29	4,51	4,31	3,83	3,72	5,53	5,45
$p = 0,995$	6,44	6,54	10,2	5,24	4,98	4,37	4,23	6,54	6,44
$p = 0,999$	8,93	9,12	15,4	7,05	6,60	5,70	5,46	9,12	8,93
$p = 0,9995$	10,1	10,3	17,9	7,90	7,33	6,30	6,01	10,3	10,1

11.4.3. Limite de sensibilité à la pénicilline G, à l'amoxicilline, à l'ampicilline, à la chlortétracycline et à l'oxytétracycline

11.4.3.1. Échantillons

Cet essai vise à vérifier la limite de sensibilité du test *Charm MRL* à différentes molécules utilisées dans le traitement vétérinaire d'un troupeau laitier.

Tableau 11-5. Liste des antibiotiques testés et concentrations mises en œuvre

Antibiotique	LMR ($\mu\text{g/L}$)	Détection ($\mu\text{g/L}$)	Concentration			
			0,25 * LMR	0,50 * LMR	0,75 * LMR	1,00 * LMR
Pénicilline G	4	2-3	1	2	3	4
Ampicilline	4	3-4	1	2	3	4
Amoxicilline	4	3-4	1	2	3	4
Oxytétracycline	100	50-100	25	50	75	100
Chlortétracycline	100	50-100	25	50	75	100

Différents antibiotiques (**Tableau 11-5**) sont préparés aux dilutions suivantes : 0,25 * LMR – 0,5 * LMR – 0,75 * LMR et 1 * LMR. Le lait utilisé pour la constitution de ces dilutions est un lait cru de vaches provenant de la ferme expérimentale du CRAW-D6. Il est

préalablement testé pour vérifier l'absence de résidus d'antibiotiques pouvant interférer dans la détection (*Charm II Quantitative Assay* et *Charm II Tetracycline Assay*).

11.4.3.2. Incertitude de la limite

Lors du calcul de la concentration limite, une incertitude liée aux différentes étapes de préparation des échantillons dopés peut être associée à la concentration. Le calcul de cette incertitude va prendre en compte les paramètres propres à la manipulation : incertitude de pesée, incertitude des volumes mesurés (ballon, tips, pipettes, ...).

Incertitude de pesée

Le certificat d'étalonnage de la balance montre une incertitude étendue (U), calculée avec un facteur k égal à 2. La composante de l'incertitude liée à la pesée u devient donc

$$u = \frac{U}{k} \text{ avec } k = 2$$

Cette composante doit cependant être prise deux fois en compte, une fois pour le tarage de la balance et une fois pour la pesée proprement-dite. La formule de l'incertitude de pesée standard u_p devient donc, selon le Guide Eurochem

$$u_p = \sqrt{(u)^2 + (u)^2}$$

L'incertitude standard relative \ddot{u}_p devient alors

$$\ddot{u}_p = \frac{u_p}{p}$$

Incertitude de volume

Selon les spécifications du fabricant, l'incertitude du volume (pipette, ballon, ...) est donnée par un delta.

L'incertitude standard u_v est calculée par le biais d'une distribution rectangle selon la formule suivante

$$u_v = \frac{X_{\max} - X_{\min}}{\sqrt{3}}$$

L'incertitude standard relative \ddot{u}_v devient alors

$$\ddot{u}_v = \frac{u_v}{v}$$

Cette incertitude de volume doit être intégrée plusieurs fois. En effet, lors de la préparation de chaque dilution, l'incertitude liée à la pipette et l'incertitude liée à la mise au trait doivent être intégrée.

Incertitude combinée

Le modèle de mesure ne comprenant que des produits ou des quotients, l'incertitude combinée relative (\ddot{u}_c) peut être calculée de la manière suivante

$$\ddot{u}_c(y) = \sqrt{\sum (\ddot{u}_i)^2} = \sqrt{(\ddot{u}_p)^2 + \sum (\ddot{u}_v)_i^2}$$

L'incertitude combinée relative est égale à la racine carrée de la variance totale, obtenue en sommant toutes les composantes de l'incertitude, en respectant la loi de propagation de l'incertitude. Il faudrait pouvoir intégrer, dans le calcul de l'incertitude combinée, la composante de pureté des constituants, donnée dont on ne dispose pas nécessairement.

11.4.3.3. Résultats

L'essai comprend l'analyse de 5 molécules à 4 concentrations, répétées 10 fois de manière aléatoire. La limite de détection est obtenue en prenant la concentration la plus basse pour laquelle 9 résultats sur 10 sont positifs. Le taux de faux positifs est calculé sur les échantillons blancs analysés. Si la définition de la limite de détection prise en compte correspond à la concentration minimale donnant 9 réponses positives sur 10, la sensibilité du test est de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de pénicilline G (**Tableau 11-6**).

La pénicilline G utilisée pour ce test est une forme commerciale provenant de la firme SIGMA. Les valeurs obtenues ne correspondent cependant pas aux mesures rencontrées dans d'autres études, notamment aux données obtenues par la société *Charm*. Ces valeurs, plus proches des valeurs obtenues pour un standard de pénicilline G dopé à $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ont conduit à réaliser l'essai 4 au moyen d'une pénicilline certifiée (standard USP).

Lors de cet essai, des résultats étonnantes sont cependant apparus : 10 résultats positifs sur 20 ont été attribués simultanément à la pénicilline G et à la tétracycline le premier jour et 10 résultats positifs sur 20 ont été attribués simultanément aux deux molécules le deuxième jour. La valeur globale positive ne pose pas de problème mais bien l'interprétation qui en est faite par le logiciel.

L'attribution d'un résultat positif pour lequel la valeur était particulièrement élevée a été révisée dans le logiciel et a été corrigée de manière à attribuer correctement le résultat positif à l'une ou à l'autre ou aux deux molécules responsables.

Tableau 11-6. Sensibilité du test *Charm MRL β -Lactame/Tétracycline* à la pénicilline G

		Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Pénicilline 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	Valeur	826	1053	1013	1194	932	900	1196	1096	1422	1457	10 ^a	
	Tétracycline	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ^b
	β -lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 ^c
<i>Pénicilline 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	Valeur	2182	2100	3040	4107	2142	2086	1893	1895	2862	2096	10	
	Tétracycline	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	5
	β -lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>Pénicilline 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	Valeur	2825	2510	2671	2948	2575	2536	2575	2644	2805	2469	10	
	Tétracycline	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	5
	β -lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>Pénicilline 4. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	Valeur	2992	3082	3213	3194	3309	2939	3136	3567	3406	3157	10	
	Tétracycline	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
	β -lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10

^a: résultats positifs (valeur supérieure à 0) - ^b: résultats positifs attribués aux tétracyclines - ^c: résultats positifs attribués aux β -lactames

La concentration minimale d'ampicilline qui conduit à 9 résultats positifs sur 10 est la concentration de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (**Tableau 11-7**). Il s'agit donc de la limite de détection pour l'ampicilline.

Pour cette molécule aussi, des résultats globalement positifs ont été attribués simultanément aux deux molécules, alors que seule l'ampicilline était présente (6 sur 18 le premier jour et 1 sur 15 le second jour).

La sensibilité du test *Charm MRL* à l'amoxicilline est de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (**Tableau 11-8**). En effet, pour la concentration de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 8 réponses sur 10 étaient positives.

La concentration de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ présente les 9 résultats positifs sur 10 nécessaires à la définition de la limite de sensibilité.

Pour cette molécule, seuls 2 résultats positifs sur 17 ont été attribués simultanément aux deux molécules (le troisième jour essentiellement).

Tableau 11-7. Sensibilité du test test *Charm MRL β-Lactame/Tétracycline* à l'ampicilline

	Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Ampicilline 1 µg·L⁻¹</i>	Valeur	518	536	-897	-625	750	-429	-444	-635	-541 ^a	801	4 ^a
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b
	β-lactame	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	4 ^c
<i>Ampicilline 2 µg·L⁻¹</i>	Valeur	1211	3727	2268	1193	2147	514	503	484	-487	470	9
	Tétracycline	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	2
	β-lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	9
<i>Ampicilline 3 µg·L⁻¹</i>	Valeur	1679	1232	1487	2412	2147	288	995	997	965	1478	10
	Tétracycline	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
	β-lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>Ampicilline 4 µg·L⁻¹</i>	Valeur	1135	1061	1826	2615	1192	872	2090	1263	1127	1419	10
	Tétracycline	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	3
	β-lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10

^a: résultats positifs (valeur supérieure à 0) - ^b: résultats positifs attribués aux tétracyclines - ^c: résultats positifs attribués aux β-lactames

Tableau 11-8. Sensibilité du test *Charm MRL β-Lactame/Tétracycline* à l'amoxicilline

	Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Amoxicilline 1 µg·L⁻¹</i>	Valeur	-634	-721	-834	-1082	-708	-714	-968	-743	-531	588	1 ^a
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b
	β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 ^c
<i>Amoxicilline 2 µg·L⁻¹</i>	Valeur	-888	-1130	-709	-645	494	-587	-598	-863	-100	749	2
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	β-lactame	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	2
<i>Amoxicilline 3 µg·L⁻¹</i>	Valeur	-53	1271	1946	1240	765	604	461	467	-290 ^a	584	8
	Tétracycline	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	2
	β-lactame	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8
<i>Amoxicilline 4 µg·L⁻¹</i>	Valeur	1091	845	956	-948	1438	648	942	1159	586	537	9
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	β-lactame	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	9

^a: résultats positifs (valeur supérieure à 0) - ^b: résultats positifs attribués aux tétracyclines - ^c: résultats positifs attribués aux β-lactames

La concentration de $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en oxytétracycline conduit à 9 résultats positifs sur 10 mesures (**Tableau 11-9**). Cependant, 1 résultat (répétition 4) n'est pas attribué à l'une ou l'autre molécule. Il en est de même pour la répétition 2 de la concentration $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et pour la répétition 3 de la concentration $75 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Les valeurs mesurées pour ces échantillons sont positives mais restent relativement peu élevées (< 100) ce qui peut justifier ce statut de douteux. En effet, le logiciel initialement reçu ne permettait pas de distinguer les molécules responsables du résultat positif lorsque celui-ci était compris entre 0 et 400 et donc de donner, lors du résultat, (attribuer BL, TET, BLTET). Cet état de fait a été corrigé dans la version ultérieure du logiciel.

Pour cette molécule aussi (tétracycline), des résultats globalement positifs sont attribués aux deux molécules (tétracycline et β -lactame).

Tableau 11-9. Sensibilité du test *MRL β -Lactame/Tétracycline* à l'oxytétracycline

		Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Oxytétracycline</i> $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Valeur	-185	60	-342	547	-79	-302	-1155	-214	-505	-188	1 ^a	
	Tétracycline	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	-	1 ^b	
	β -lactame	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^c	
<i>Oxytétracycline</i> $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Valeur	765	-233	1028	97	586	843	1153	990	822	1130	7	
	Tétracycline	-	-	+	n.d.	+	+	+	+	+	+	7	
	β -lactame	-	-	-	n.d.	-	+	+	+	+	+	5	
<i>Oxytétracycline</i> $75 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Valeur	766	845	14	-53	947	1295	601	581	1221	1386	8	
	Tétracycline	+	+	n.d.	-	+	+	+	+	+	+	8	
	β -lactame	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	+	+	2	
<i>Oxytétracycline</i> $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Valeur	879	1327	861	1484	672	845	885	938	569	746	10	
	Tétracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	
	β -lactame	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1	

^a: résultats positifs (valeur supérieure à 0) - ^b: résultats positifs attribués aux tétracyclines - ^c: résultats positifs attribués aux β -lactames

n.d. : résultat positif pour lequel l'origine (tétracycline ou β -lactame) n'est pas identifiée par le logiciel (zone incertaine autour de la valeur du cut off). Le résultat positif indique cependant la contamination par l'une ou l'autre molécule

La limite de détection est de $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la chlortétracycline (

Tableau 11-10). Pour cette série de résultats, seuls 4 résultats positifs (valeurs < 100) ne sont pas attribués à l'une ou l'autre molécule.

Tableau 11-10. Sensibilité du test *MRL β-Lactame/Tétracycline* à la chlortétracycline

	Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Chlortétracycline</i> <i>25 µg·L⁻¹</i>	Valeur	909	561	92	-205	34	620	466	506	52	-244	5 ^a
	Tétracycline	+	+	n.d.	-	n.d.	+	+	+	n.d.	-	5 ^b
	β-lactame	-	-	n.d.	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	0 ^c
<i>Chlortétracycline</i> <i>50 µg·L⁻¹</i>	Valeur	787	1176	955	1330	1269	52	1595	502	965	1090	9
	Tétracycline	+	+	+	+	+	n.d.	+	+	+	+	9
	β-lactame	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	0
<i>Chlortétracycline</i> <i>75 µg·L⁻¹</i>	Valeur	800	1035	1117	857	1055	868	1309	1037	931	1300	10
	Tétracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
	β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Chlortétracycline</i> <i>100 µg·L⁻¹</i>	Valeur	1023	1170	1457	1651	1173	1501	982	914	755	770	10
	Tétracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
	β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

^a : résultats positifs (valeur supérieure à 0) - ^b : résultats positifs attribués aux tétracyclines - ^c : résultats positifs attribués aux β-lactames

n.d. : résultat positif pour lequel l'origine (tétracycline ou β-lactame) n'est pas identifiée par le logiciel (zone incertaine autour de la valeur du cut off). Le résultat positif indique cependant la contamination par l'une ou l'autre molécule

Un taux de 10 % (6 résultats positifs sur 60) de faux positifs a été obtenu (

Tableau 11-11). Il faut cependant remarquer que 4 de ces résultats ont été obtenus le même jour, dans la même série d'analyse. Il y a tout lieu de penser que ces résultats sont globalement erronés, puisque le même lait, analysé parallèlement a conduit à un résultat négatif.

Pour les 5 molécules étudiées, l'incertitude combinée de la limite a été calculée. Cette incertitude combinée reprend la somme d'incertitudes individuelles, notamment les incertitudes de pesée et de volume.

Inc^{er}titude de pesée

$$\text{Pour la pénicilline G : } \bar{u}_p = \sqrt{2 \cdot \left(\frac{0.00076}{2} \right)^2} = 0.0336$$

$$\text{Pour l'ampicilline : } \bar{u}_p = \sqrt{2 \cdot \left(\frac{0.00076}{2} \right)^2} = 0.0537$$

Tableau 11-11. Synthèse des blancos (sensibilité)

Répétition		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Blanco 1</i>	Valeur	-1200	-1451	-1474	-1173	-1083	-1033	-1326	-1314	-1288	-1430	0 ^a
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b
	β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^c
<i>Blanco 2</i>	Valeur	-1452	-1258	-1330	-1280	-1413	-1064	-1655	-1034	-1541	-1794	0
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Blanco 3</i>	Valeur	-1081	-1810	-721	-1468	-1139	3533	3654	3771	2927 ^d	-1091	4
	Tétracycline	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	4
	β-lactame	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	4
<i>Blanco 4</i>	Valeur	-943	-1359	-799	2414	733	-492	-1404	-884	-1261	-1059	2
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	β-lactame	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
<i>Blanco 5</i>	Valeur	-1288	-1104	-1169	-1130	-1222	-1098	-1053	-1291	-1168	-965	0
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Blanco 6</i>	Valeur	-1215	-1088	-1649	460	-1150	-1148	-1126	-1404	-1375	-1219	1
	Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	β-lactame	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1

^a: résultats positifs (valeur supérieure à 0) – ^b: résultats positifs attribués aux tétracyclines – ^c: résultats positifs attribués aux β-lactames
^d: répétition avec le lait cru non congelé : -886

$$\text{Pour l'amoxicilline : } \ddot{u}_p = \frac{\sqrt{2 \cdot \left(\frac{0.00076}{2} \right)^2}}{0.01010} = 0.0532$$

$$\text{Pour la chlortétracycline : } \ddot{u}_p = \frac{\sqrt{2 \cdot \left(\frac{0.00076}{2} \right)^2}}{0.010} = 0.0537$$

$$\text{Pour l'oxytétracycline : } \ddot{u}_p = \frac{\sqrt{2 \cdot \left(\frac{0.00076}{2} \right)^2}}{0.010} = 0.0537$$

Incertitude de volume

$$\text{Ballon de 100 mL : } \ddot{u}_v = \frac{0.1}{100 \cdot \sqrt{3}} = 0.000577$$

$$\text{Pipette de 1 mL : } \ddot{u}_v = \frac{0.007}{1 \cdot \sqrt{3}} = 0.00404$$

$$\text{Pipette de 10 mL : } \ddot{u}_v = \frac{0.002}{10 \cdot \sqrt{3}} = 0.000115$$

$$\text{Micropipette 70 } \mu\text{l prélevés : } \ddot{u}_v = \frac{2.2}{70 \cdot \sqrt{3}} = 0.01814$$

$$\text{Micropipette 130 } \mu\text{l prélevés : } \ddot{u}_v = \frac{2.2}{130 \cdot \sqrt{3}} = 0.009770$$

$$\text{Micropipette 20 } \mu\text{l prélevés : } \ddot{u}_v = \frac{2.2}{20 \cdot \sqrt{3}} = 0.06351$$

$$\text{Micropipette 40 } \mu\text{l prélevés : } \ddot{u}_v = \frac{2.2}{40 \cdot \sqrt{3}} = 0.03175$$

$$\text{Micropipette 50 } \mu\text{l prélevés : } \ddot{u}_v = \frac{2.2}{50 \cdot \sqrt{3}} = 0.03969$$

Le calcul de l'incertitude combinée relative conduit, pour chaque composé, à la valeur suivante :

- Pénicilline G (commerciale) :

$$\ddot{u}_c = \sqrt{2 \cdot (0.0336)^2 + 3 \cdot (0.000577)^2 + 1 \cdot (0.00404)^2 + 1 \cdot (0.01814)^2} = 0.05103 \approx 5 \%$$

- Amoxicilline : 4 $\mu\text{g/L}$

$$\ddot{u}_c = \sqrt{2 \cdot (0.0336)^2 + 3 \cdot (0.000577)^2 + 1 \cdot (0.00404)^2 + 1 \cdot (0.03175)^2} = 0.05730 \approx 6 \%$$

- Ampicilline : 2 $\mu\text{g/L}$

$$\bar{u}_c = \sqrt{2 \cdot (0.0336)^2 + 3 \cdot (0.000577)^2 + 1 \cdot (0.00404)^2 + 1 \cdot (0.06351)^2} = 0.07943 \approx 8 \%$$

- Oxytétracycline : 50 µg/L

$$\bar{u}_c = \sqrt{2 \cdot (0.0336)^2 + 3 \cdot (0.000577)^2 + 1 \cdot (0.00404)^2 + 1 \cdot (0.03969)^2} = 0.06205 \approx 6 \%$$

- Chlortétracycline : 50 µg/L

$$\bar{u}_c = \sqrt{2 \cdot (0.0336)^2 + 3 \cdot (0.000577)^2 + 1 \cdot (0.00404)^2 + 1 \cdot (0.03969)^2} = 0.06205 \approx 6 \%$$

L'incertitude relative étendue est calculée en multipliant l'incertitude relative combinée par un facteur K, choisi en tenant compte d'une série d'éléments tels que le niveau de confiance désiré (en général, $p = 95 \%$) et tel que les degrés de liberté, respectant l'équation simplifiée de Welch-Satterthwaite suivante :

$$v_{\text{eff}} = \frac{[\bar{u}_c(\bar{y})]^4}{\sum \left[\frac{(\bar{u}(\bar{x}_i))^4}{v_i} \right]}$$

Dans la plupart des cas, un facteur $K = 2$ est choisi, ce qui conduit à niveau de confiance de environ 95 %.

L'analyse des résultats relatifs aux 5 molécules étudiées conduit aux limites de détection assorties de leurs incertitudes propres (**Tableau 11-12**).

Tableau 11-12. Limites de détection et incertitudes de mesure

Molécule	Limite de détection (µg·L ⁻¹)	Incertainude élargie relative (%)	Incertainude élargie absolue (µg·L ⁻¹)
Pénicilline G (commerciale)	< 1	10	0,1
Amoxicilline	4	12	0,48
Ampicilline	2	16	0,32
Oxytétracycline	50	12	6
Chlortétracycline	50	12	6

11.4.4. Limite de sensibilité à la pénicilline G (standard USP)

11.4.4.1. Échantillons

Lors de cet essai, des dilutions en Pénicilline G Standard USP sont préparées (

Tableau 11-13).

Tableau 11-13. Concentrations mises en œuvre pour le standard USP Pénicilline G

Antibiotique	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Détection ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,25 * LMR	0,50 * LMR	0,75 * LMR	1,00 * LMR
Pénicilline G	4	2-3	1	2	3	4

11.4.4.2. Protocole

L'essai comprend l'analyse d'une seule molécule certifiée à 4 concentrations, répétées 10 fois de manière aléatoire. La limite de détection est obtenue en prenant la concentration la plus basse pour laquelle 9 résultats sur 10 sont positifs. Le taux de faux positifs est calculé sur les échantillons blancs analysés.

Lors de cet essai, une version plus récente du logiciel de lecture a été utilisée.

Tableau 11-14. Limite de sensibilité à la pénicilline G (standard USP) – Globalisation des résultats

	<i>Pen G 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>Pen G 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>Pen G 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>Pen G 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>
Nombre de résultats positifs	0	10	10	10
Moyenne	-1330,8	586,8	1007,1	1333,9
Ecart type	162,84	131,75	195,16	168,51
CV (%)	-12,2	22,5	19,4	12,6
Minimum	-1590	404	736	1072
Maximum	-1032	762	1241	1607

La limite de sensibilité à la Pénicilline G (Standard USP) est fixée à $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, les 10 répétitions donnant un résultat positif (**Tableau 11-14**). Les résultats obtenus avec le standard Pénicilline G USP sont moins élevés que les résultats obtenus avec la pénicilline SIGMA, non certifiée. Comme pour les autres molécules, l'incertitude de la limite a été calculée :

$$\bar{u}_c = \sqrt{2 \cdot (0.0336)^2 + 3 \cdot (0.000577)^2 + 1 \cdot (0.00404)^2 + 1 \cdot (0.009770)^2} = 0.04869 \approx 5 \%$$

Ce calcul conduit à une limite égale à :

Pénicilline G (standard USP) : $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 10 \%$, soit $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

11.4.5. Interférences microbiologiques - cellules somatiques

Le lait utilisé pour cet essai provient de vaches présentant une mammite sub-clinique et donnant un lait ayant un taux cellulaire élevé : une numération de 890.000 cellules somatiques·mL⁻¹ est obtenue sur ce lait. Le lait est contrôlé au moyen du test *Charm II Quantitative Assay* pour vérifier son statut négatif avant l'expérimentation.

Le lait cru est analysé en l'état (10 répétitions) au moyen du test *Charm MRL*. Le standard (mélange Oxytétracycline – Pénicilline G) est reconstitué au moyen du même lait à haute teneur en cellules somatiques. Ce standard est alors analysé à 10 reprises.

Les réponses obtenues sont comparées aux réponses obtenues pour un lait de bonne qualité hygiénique.

Tableau 11-15. Interférences biologiques – cellules somatiques – Résultats

		Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Lait à haute teneur en cellules somatiques</i>	<i>Blancvo</i>	Valeur	-1443	-1389	-1117	-1431	-1153	-1607	-972	-1716	-921	-1281	0 ^a
		Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b
		β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^c
	<i>Standard Pen - Oxy</i>	Valeur	1932	2272	2034	2051	2011	1999	2348	2291	2159	2028	10
		Tétracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
		β-lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>Lait de bonne qualité hygiénique (référence)</i>	<i>Blancvo</i>	Valeur	-990	-895	-1074	-1471	-946	-1321	-777	-1164	-1236	-1072	0
		Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		β-lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Standard Pen - Oxy</i>	Valeur	1974	1856	2224	2424	2135	1976	2325	2069	2410	2114	10
		Tétracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
		β-lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10

^a: résultats positifs (valeur supérieure à 0) - ^b: résultats positifs attribués aux tétracyclines - ^c: résultats positifs attribués aux β-lactames

Une analyse de la variance (**Tableau 11-16**) est réalisée sur les données brutes (**Tableau 11-15**) afin de vérifier si le test se comporte différemment lorsque le lait analysé contient une forte concentration en cellules somatiques. Le lait provenant d'une vache souffrant d'une mammite sub-clinique est ainsi comparé à un lait de bonne qualité hygiénique.

La comparaison entre le F_{obs} et le $F_{1-\alpha}$ repris dans les tables F de Snedecor (**Tableau 11-4**) conduit à l'acceptation ($F_{\text{obs}} < F_{1-\alpha}$) ou au rejet ($F_{\text{obs}} > F_{1-\alpha}$) de l'hypothèse initiale, c'est à dire au

rejet de l'égalité des moyennes. La comparaison la plus stricte conduit tant pour le lait blanco que pour le lait dopé par le mélange standards à l'acceptation de l'égalité des moyennes. En effet, pour une valeur de $p = 0,95$, le F_{obs} est égal à 3,863 (lait blanco) et à 0,251 (lait dopé), alors que le $F_{1-\alpha}$ est égal à 4,41, ce qui est bien supérieur aux deux valeurs de F_{obs} .

Tableau 11-16. Analyse de la variance (lait blanco A et lait dopé – Standard B)

Lait blanco A				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	1	217152,8	217152,8	$F_{\text{obs}} = 3,8630$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	18	1011842,4	56213,4667	
Totaux	19	1228995,2		
Lait dopé – Standard B				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	1	7296,2	7296,2	$F_{\text{obs}} = 0,2514$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	18	522316,6	29017,5889	
Totaux	19	529612,8		

En ce qui concerne l'interprétation faite du résultat donné, tous les blancos conduisent à une interprétation négative pour les deux groupes de molécules. Par contre, tous les standards conduisent à une interprétation positive pour les deux groupes de molécules. Aucun résultat « Faux positif » n'est donc comptabilisé, malgré la présence d'une teneur très élevée en cellules. De même, aucun résultat « Faux négatif » n'est comptabilisé pour les standards analysés (quelle que soit la teneur en germes mesurée dans le lait utilisé pour la reconstitution du mélange).

Tableau 11-17. Interférences biologiques – cellules – Globalisation des résultats

	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Minimum	Maximum
Lait cru – teneur en cellules élevée	-1303	262,3463	20,1	-1716	-921
Lait cru – teneur en cellules élevée – Standard Pen G/Oxy	2112,5	144,4432	6,8	1932	2348

La globalisation des résultats (**Tableau 11-17**) montre que le lait non dopé présente une plus forte variabilité dans les résultats obtenus : coefficient de variation de l'ordre de 20 % pour le lait cru (exempt de substances inhibitrices mais à haute teneur en cellules) alors que ce coefficient est de 6,8 % pour le standard (lait cru à haute teneur en cellules somatiques, dopé par un mélange pénicilline G – Oxytétracycline).

La teneur en cellule n'influence pas le résultat obtenu lors de l'interprétation, tant sur le lait cru non dopé que sur le lait dopé au moyen du mélange pénicilline G/oxytétracycline.

11.4.6. Interférences microbiologiques - Germes

Un lait de mélange de qualité (teneur en germes inférieure à $10.000 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) est utilisé pour évaluer l'influence de la teneur en germes sur le résultat. Il est en outre contrôlé au moyen du test *Charm II Quantitative Assay* pour vérifier son statut négatif avant l'expérimentation.

Tableau 11-18. Interférences biologiques – germes – Résultats

		Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Lait cru après 24 h d'incubation</i>	<i>Blanco</i>	Valeur	-1496	-1390	-1302	-1025	-1085	-971	-859	-743	-1008	-1156	0 ^a
		Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^b
		β -lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^c
	<i>Standard Pen G - Oxy</i>	Valeur	2117	2252	2300	2155	2305	2096	2204	2229	1920	2178	10
		Tétracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
		β -lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>Lait cru initial</i>	<i>Blanco</i>	Valeur	-990	-895	-1074	-1471	-946	-1321	-777	-1164	-1236	-1072	0
		Tétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		β -lactame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>Standard Pen G - Oxy</i>	Valeur	1974	1856	2224	2424	2135	1976	2325	2069	2410	2114	10
		Tétracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
		β -lactame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10

^a: résultats positifs (valeur supérieure à 0) - ^b: résultats positifs attribués aux tétracyclines - ^c: résultats positifs attribués aux β -lactames

La teneur en germes est déterminée sur le lait de mélange utilisé. Ce lait est mis à incuber à température ambiante afin de générer un lait à haute teneur en germes. Les deux laits ainsi obtenus (teneur basse et teneur haute en germes) sont analysés en l'état (10 répétitions pour chaque lait) au moyen du test *Charm MRL β -Lactame/Tétracycline*. De plus, ils sont utilisés pour reconstituer deux standards (mélange Oxytétracycline – Pénicilline G). Ces standards sont

alors analysés à 10 reprises. Les réponses obtenues sont comparées aux réponses obtenues pour le lait initial, de bonne qualité hygiénique.

Le lait utilisé présente une teneur initiale en germes de $4.000 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Après incubation, cette teneur est passée à plus de $999.999 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Le comptage est réalisé par BactoscanTM FC (FOSS), ce qui explique le seuil de mesure. En effet, le calibrage de l'appareil ne lui permet pas de donner un comptage précis au delà de cette valeur.

Les valeurs obtenues pour le lait de bonne qualité hygiénique ont été mises en rapport avec les résultats obtenus pour le lait à haute teneur en germes (**Tableau 11-18**). Ces résultats ont servi de base à une analyse de la variance (**Tableau 11-19**) afin de vérifier si le test se comportait différemment en présence de germes.

Tableau 11-19. Analyse de la variance (lait blanco A et lait dopé – Standard B)

Lait blanco A				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	1	396,05	396,05	0,0080
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	18	893630,9	49646,1611	
Totaux	19	894026,95		
Lait dopé – Standard B				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	1	3100,05	3100,05	0,1235
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	18	451788,5	25099,3611	
Totaux	19	454888,55		

La comparaison entre le F_{obs} et le $F_{1-\alpha}$ repris dans les tables F de Snedecor (**Tableau 11-4**) conduit à l'acceptation ($F_{\text{obs}} < F_{1-\alpha}$) ou au rejet ($F_{\text{obs}} > F_{1-\alpha}$) de l'hypothèse initiale, c'est à dire au rejet de l'égalité des moyennes. La teneur en germes n'a pas d'influence sur le résultat chiffré donné par le lecteur du test. En effet, à un niveau 0,005, c'est à dire avec un risque de première espèce inférieur à 0,5 %, la comparaison des F_{obs} avec le $F_{1-\alpha}$ théorique conduit à l'acceptation de l'égalité des moyennes, soit à l'absence d'interférences pour le paramètres biologiques « Germes ».

En ce qui concerne l'interprétation faite du résultat donné, tous les blancs conduisent à une interprétation négative pour les deux groupes de molécules. Par contre, tous les standards conduisent à une interprétation positive pour les deux groupes de molécules.

Aucun résultat « Faux positif » n'est donc comptabilisé, malgré la présence d'une teneur très élevée en germes. De même, aucun résultat « Faux négatif » n'est comptabilisé pour les standards analysés (quelle que soit la teneur en germes mesurée dans le lait utilisé pour la reconstitution du mélange).

Tableau 11-20. Interférences biologiques – germes – Globalisation des résultats

	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Minimum	Maximum
<i>Lait cru après 24 h d'incubation</i>	-1103,5	235,9893	21,4	-1496	-743
<i>Lait cru après 24 h d'incubation + Standard Pen G/Oxy</i>	2175,6	114,1375	5,2	1920	2305
<i>Lait cru initial</i>	-1094,6	208,8094	19,1	-1471	-777
<i>Lait cru initial + Standard Pen G/Oxy</i>	2150,7	192,7987	9,0	1856	2424

Les laits non dopés présentent cependant une plus forte variabilité dans les résultats obtenus (**Tableau 11-20**) : coefficient de variation de l'ordre de 20 % pour les deux laits crus alors que ce coefficient est respectivement de 9,0 % pour le standard « Lait cru initial » et de 5,2 % pour le standard « Lait cru après incubation ». La teneur en germes n'influence pas le résultat obtenu lors de l'interprétation, tant sur le lait cru non dopé que sur le lait dopé à la pénicilline G et dopé à l'oxytétracycline.

11.4.7. Interférences chimiques

Tableau 11-21. Composition du mélange destiné à évaluer les interférences chimiques

Molécule	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Molécule	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Tyrosine	50	Novobiocine	50
Eythromycine	40	Sulfamethazine	100
Dihydrostreptomycine	200	Trimethoprim	50
PABA ^a	100	Chlorhexidine	200
Chloramphenicol	100	Levamisol	1000

^a : acide *p*-aminobenzoïque

Deux essais ont été menés pour évaluer l'influence d'autres molécules présentes dans le lait sur le résultat du test *Charm MRL*.

Dans le premier essai, un mélange de molécules diverses est constitué (**Tableau 11-21**). Le mélange ainsi obtenu est analysé en l'état et est utilisé pour reconstituer le standard (mélange Oxytétracycline – Pénicilline G). Le standard est alors analysé.

Dans le second essai, différents mélanges, basés sur les mêmes molécules, sont préparés (**Tableau 11-22**).

Tableau 11-22. Composition des mélanges réalisés pour la seconde partie de l'essai Interférences chimiques ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Mélange 1		Mélange 2		Mélange 3		Mélange 4	
Tyrosine	50	Chloramphenicol	100	Sulfamethazine	100	Chlorhexidine	200
Erythromycine	40	<i>p</i> -ABA (acide <i>p</i> -aminobenzoïque)	100	Trimethoprime	50	Levamisol	1000
Dihydrostreptomycine	200	Novobiocine	50				

Deux expérimentations ont été menées pour évaluer l'influence d'autres molécules présentes dans le lait sur le résultat du test *Charm MRL β -Lactame/Tetracycline*.

Les résultats de la première expérimentation (**Tableau 11-23**) montrent que sur les 10 répétitions du mélange, 3 seulement donnent un résultat négatif aux deux groupes de molécules.

Tableau 11-23. Interférences chimiques 1 – Résultats

	Répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nb. positifs
<i>Mélange de 10 substances inhibitrices dans du lait cru</i>	Valeur	-1836	783	767	587	850	-1309	919	918	701	-1355	7
	Tétracycline	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
	β -lactame	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
<i>Lait cru + Standard Pen G et Oxy</i>	Valeur	1732	1301	574	1551	1784	1613	1792	1764	1804	1872	10
	Tétracycline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	β -lactame	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. : non déterminé – l'impression des résultats s'est faite à partir de la mémoire du lecteur et l'information relative au(x) groupe(s) positif(s) est alors perdue.

Ces résultats ont conduit à réaliser une nouvelle expérimentation en fragmentant le mélange en 4 sous-mélanges (**Tableau 11-22**) pour cibler la ou les molécules responsables des interférences. Lors de cette seconde expérimentation, une version plus récente de logiciel et un lecteur plus récent ont été utilisés.

Deux conditions d'incubation ont aussi été utilisées. Lors de la première incubation, les tigettes ont été incubées en étuve statique à 55°C (**Tableau 11-24**). Dans les secondes conditions, les dilutions ont été analysées selon la procédure préconisée (incubateur fourni) (**Tableau 11-25**).

Tableau 11-24. Interférences chimiques 2 – Résultats (étuve 55°C) – Globalisation des résultats

	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3	Mélange 4
Nombre de résultats positifs	0	0	0	0
Moyenne	-1023,5	-1302	-1022,4	-1152,6
Ecart type	309,74	451,86	213,21	238,22
CV (%)	-30,3	-34,7	-20,9	-20,7
Minimum	-1478	-1863	-1327	-1667
Maximum	-656	-547	-708	-859

Modifier les conditions d'incubation n'est pas recommandé par la société proposant le test, il s'agit uniquement des résultats de la recherche menée au sein du CRAW-D7. Dans la pratique et dans un usage destiné au contrôle de la qualité du lait, il est impératif de suivre les prescriptions d'utilisation du test, à savoir utiliser l'incubateur prévu à cet effet et non pas une étuve ventilée.

L'analyse de la variance (**Tableau 11-26**) conduit à ne pas mettre en évidence une différence significative entre les résultats obtenus pour les différents mélanges, lors de l'incubation à 55°C en étuve.

Tableau 11-25. Interférences chimiques 2 – Résultats (incubateur *Charm*) – Globalisation des résultats

	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3	Mélange 4	10 molécules
Nombre de résultats positifs	0	0	0	0	0
Moyenne	-1627,6	-1711,2	-1596,9	-1595,5	-1607,3
Ecart type	139,30	179,54	124,70	133,70	278,98
CV (%)	-8,6	-10,5	-7,8	-8,4	-17,4
Minimum	-1860	-1947	-1838	-1827	-2247
Maximum	-1422	-1291	-1464	-1374	-1273

La comparaison du F_{obs} et du $F_{1-\alpha}$ conduit à l'acceptation de l'égalité des moyennes et donc du comportement du test pour les différents mélanges de molécules, pour une valeur de $\alpha = 0,05, 0,01$ ou $0,005$ (**Tableau 11-4**).

Lors de cette seconde expérimentation (incubation en étuve), tous les résultats obtenus sur les différents mélanges ont été négatifs. Les résultats des contrôles positif et négatif étaient, dans cette expérimentation, respectivement de 1863 et -2149.

Tableau 11-26. Analyse de la variance – interférences chimiques – Essai 2 Etuve 55°C

Lait blanco A				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	3	529197,075	176399,025	$F_{\text{obs}} = 1,7538$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	36	3620905,3	100580,703	
Totaux	39	4150102,38		

Les mêmes mélanges, additionnés d'un mélange contenant les dix molécules, ont été analysés selon le protocole défini par la société *Charm*. Une analyse de la variance (**Tableau 11-27**) a été réalisée sur les résultats de cet essai.

La comparaison du F_{obs} (0,7193) et du $F_{1-\alpha}$ le plus strict (2,61 pour $p = 0,95$, $k_1 = 4$ et $k_2 = 40$ – tableau 11-4) conduit à l'acceptation de l'égalité des moyennes et donc du comportement du test pour les différents mélanges de molécules, pour une valeur de $\alpha = 0,05, 0,01$ ou $0,005$.

Tableau 11-27. Analyse de la variance – interférences chimiques – Incubateur

Lait blanco A				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	4	93739	23434,75	$F_{\text{obs}} = 0,7193$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	45	1466063,5	32579,1889	
Totaux	49	1559802,5		

Les conditions d'incubation en étuve sont cependant moins maîtrisables, ce qui se traduit par des coefficients de variation (%) plus importants (de 20 à 30 %) que ceux obtenus lors de l'incubation en incubateur (de l'ordre de 10 %).

Des deux essais « Interférences chimiques réalisés », il est aisé de conclure que les molécules d'autres groupes d'antibiotiques ou d'autres types de molécules (antiparasitaire, désinfectants) n'interfèrent pas dans la détection des antibiotiques du groupe « Tétracyclines » ou du groupe à noyau β -lactame.

11.4.8. Stabilité de la réponse dans le temps

La conservation des échantillons de lait peut s'avérer importante dans le cadre de contre analyse. Cet essai vise à évaluer la réponse du test sur des échantillons conservés par congélation (1 semaine, 1 mois), en la comparant à la réponse du test obtenue sur les mêmes laits au temps $t = 0$. Cette comparaison se fait par le biais d'une analyse de la variance réalisée sur les résultats bruts obtenus.

Un lait de mélange de qualité (teneur en germes inférieure à $10.000 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ et teneur en cellules inférieure à $100.000 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$) est utilisé pour reconstituer le standard (mélange Oxytétracycline – Pénicilline G).

Tableau 11-28. Stabilité à la conservation – résultats

Mesure	Lait cru blanco			Lait cru dopé (Pen G/ Oxy)		
	T = 0	T = 1 semaine	T = 1 mois	T = 0	T = 1 semaine	T = 1 mois
1	-1055	-1246	-1145	1622	2428	1693
2	-1466	-724	-1539	1759	2104	2183
3	-875	-768	-1430	2069	2362	1586
4	-1058	-868	-1164	1690	2546	1907
5	-1518	-1068	-1008	1920	1657	1879
6	-1102	-990	-1108	1633	2204	2167
7	-997	-1423	-1328	1822	1682	1678
8	-1373	-1081	-996	1838	1727	2353
9	-953	-848	-1126	1909	1976	1987
10	-1267	-1357	-869	1768	1074	1736

Trois lots de 10 flacons sont constitués à partir du lait exempt de substances inhibitrices et du standard. Le premier lot est analysés dès préparation, le second est conservé et sera analysé après une semaine de conservation par congélation (-20°C), le troisième lot après un mois de conservation (-20°C).

Lors de chaque série d'analyses, 10 répétitions sont réalisées sur chaque échantillon (lait cru et standard). L'analyse de la variance réalisée (**Tableau 11-29**) sur les résultats bruts (**Tableau 11-28**) montre que les échantillons « Lait cru » et « Lait dopé » (standard) n'évoluent pas à la congélation (durant 1 mois) et que les réponses obtenues à $t = 0$ se maintiennent au cours du temps.

Tableau 11-29. Analyse de la variance – Stabilité dans le temps (lait blanco A et lait dopé – Standard B)

Lait blanco A				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	2	115489,4	57744,7	$F_{\text{obs}} = 1,1374$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	27	1370708,6	50766,9852	
Totaux	29	1486198		
Lait dopé – Standard B				
Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Entre populations (facteur contrôlé)	2	154650,067	77325,0333	$F_{\text{obs}} = 0,8141$
Entre observations dans les populations (erreur résiduelle)	27	2564642,9	94986,7741	
Totaux	29	2719292,97		

En effet, la comparaison de F_{obs} avec les valeurs théoriques ($F_{1-\alpha}$) conduit à une égalité de moyennes, tant pour le lait cru blanco que pour le standard (lait cru dopé). Pour les valeurs de α variant de 5 à 0,1, la valeur du F_{obs} est systématiquement inférieure à la valeur du $F_{1-\alpha}$. Cette conclusion est importante pour la conservation des échantillons, lors d'un résultat positif obtenu à un contrôle. Cette approche devrait sans doute être approfondie avec des laits particuliers ou de qualité moindre.

11.5. Conclusions

Les essais menés ont visés à évaluer le test *Charm MRL β -Lactame/Tétracycline* selon plusieurs paramètres :

- l'homogénéité au sein du même lot
- l'homogénéité entre lots

- la sensibilité du test à différentes molécules : pénicilline G, ampicilline, amoxicilline (groupe des antibiotiques à noyau β -lactame) – oxytétracycline, chlortétracycline (groupe des tétracyclines)
- les interférences microbiologiques : germes – cellules somatiques
- les interférences chimiques : différentes molécules susceptibles de se trouver dans le lait (antibiotiques d'autres groupes, désinfectants, antiparasitaire)
- la stabilité de la réponse du test sur des échantillons conservés par congélation

Tant au sein d'un même lot qu'entre plusieurs lots, il n'apparaît pas de différences significatives entre les interprétations des résultats obtenus sur lait cru et sur lait dopé. Il faudrait cependant étendre l'étude à des valeurs plus proches de zéro pour mieux appréhender cette homogénéité.

La sensibilité du test a été étudiée pour 5 molécules régulièrement rencontrées en médecine vétérinaire (**Tableau 11-30**).

Un taux de 10 % de faux positifs (6 résultats sur 60) a été obtenu lors de l'étude sur les limites de détection. Ce taux est nettement moindre pour l'ensemble de l'étude. Il est sans doute dû (4 des résultats faux positifs proviennent de la même série d'analyses) à un lait particulier ou à une erreur de manipulation.

Tableau 11-30. Limites de détection et incertitudes de mesure

Molécule	Limite de détection ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Incertitude élargie relative (%)	Incertitude élargie absolue ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Pénicilline G (commerciale)	< 1	10	0,1
Pénicilline G (Standard USP)	2	10	0,2
Amoxicilline	4	12	0,5
Ampicilline	2	16	0,3
Oxytétracycline	50	12	6
Chlortétracycline	50	12	6

Aucune interférence chimique ou biologique (cellules ou germes) n'a pu être mise en évidence. La réponse du test à des échantillons conservés par congélation est restée stable pendant 1 mois.

CHAPITRE 12 : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE COMPTAGE RAPIDE DE *G. STEAROTHERMOPHILUS* VAR. *CALIDOLACTIS*

12.1 Introduction

Le suivi du métabolisme de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* au cours de la détection des antibiotiques par spectroscopie infra-rouge doit être accompagné d'un comptage bactérien. En effet, si on souhaite « quantifier » les variations spectrales observées lors des cinétiques de croissance, il est nécessaire de disposer de paramètres à mettre en relation avec ces variations. Le premier de ces paramètres correspond à la croissance bactérienne enregistrée au cours du temps. Cependant, les méthodes microbiologiques de comptage sont particulièrement fastidieuses et longues à mettre en œuvre : préparation des milieux de comptage, préparation de dilutions, préparation des ensemencements, incubation (72 heures) et comptage des colonies. Cette façon de procéder, si elle est méthode de référence, présente un intérêt relatif dans le cadre de notre étude. Afin de limiter des manipulations excessives, nous avons cherché à transposer la méthode de comptage rapide utilisée pour le dénombrement des germes dans le lait cru.

12.2. Objectifs

Dans ce chapitre, nous avons cherché à transposer la méthode de comptage rapide mise en œuvre lors du dénombrement bactérien réalisé sur du lait vers le milieu de culture qui constitue le test de détection d'antibiotiques. Ce transfert permet de ne plus utiliser la méthode de comptage de référence sur boîte de pétri, particulièrement lourde à mettre en place au laboratoire.

12.3. Matériel et méthode

12.3.1. Milieux à utiliser – composition et préparation

12.3.1.1. PCA (Plate Count Agar)

Composition (g·L⁻¹) : extrait de levure 2,5 – peptone de caséine 5,0 – D(+)-Glucose 1,0 – agar-agar 14,0 – pH 7,0 ± 0,2

Préparation : ajouter 22,5 g à 1 litre d'eau déminéralisée en chauffant au bain-marie. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

12.3.1.2. Bouillon nutritif

Composition (g·L⁻¹) : extrait de viande de bœuf 1,0 – extrait de levure 2,0 – peptone 5,0 – chlorure de sodium 5,0 – pH 7,4 ± 0,2

Préparation : ajouter 13 g de poudre et une quantité de glucose définie lors de chaque essai à 1 litre d'eau osmosée. Bien mélanger, répartir et stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

12.3.1.3. Gélose nutritive

Composition (g·L⁻¹) : extrait de viande 3,0 – peptone de viande 5,0 – agar-agar 12,0 – pH 7,0 ± 0,2 à 25°C

Préparation : ajouter 20 g à 1 litre d'eau déminéralisée en chauffant au bain-marie. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

12.3.2. Méthodes de comptage sur boîte

12.3.2.1. Préparation des échantillons

Les préparations des échantillons et des dilutions sont réalisées selon les recommandations de la norme FIL 122C:1996 en prenant comme diluant une solution de Ringer diluée au quart. Une modification a cependant été apportée lors de l'homogénéisation de la première dilution : celle-ci a été préparée, comme les suivantes, en utilisant un agitateur mécanique de type « vortex » plutôt que manuellement.

12.3.2.2. Comptages

Les contrôles de stérilité ont été réalisés selon la norme FIL 100B:1991 décrivant une méthode de comptage des colonies à 30°C. Le milieu « Plate count agar » a été utilisé pour l'ensemencement.

La croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* a été évaluée sur milieu gélosé nutritif par comptage des colonies à 55°C (forme active) et à 64°C (forme sporulée et forme active). Ces deux températures correspondent à l'optimum de croissance pour la forme active (55°C) et à la température nécessaire à la levée de la dormance des spores (64°C).

12.3.3. BactoscanTM FC

Le BactoscanTM FC (Foss Electric, Hillerød, Danemark) est un instrument permettant le comptage rapide (150 échantillons à l'heure) des bactéries du lait cru (**Figure 12-1**).

L'échantillon de lait, prélevé au niveau du passeur, est mélangé à une solution tamponnée de bromure d'éthidium, de détergent et d'enzymes protéolytiques. Le bromure d'éthidium permet le marquage des cellules bactériennes et le mélange « détergent – enzymes protéolytiques » conduit à la réduction et à la dispersion des constituants susceptibles d'interférer

dans le comptage. Le mélange est homogénéisé et mis à incuber. L'homogénéité est maintenue par des passages répétés du mélange à travers un tamis de $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Une aliquote du mélange est ensuite transférée vers l'unité de lecture : les cellules bactériennes passent en flux laminaire devant un détecteur optique. Le bromure d'éthidium, marquant les cellules bactérienne, est excité par un faisceau laser. Il émet alors un rayonnement de fluorescence qui est détecté par un lecteur optique. Une impulsion électronique est émise lors du passage de chaque bactérie. Entre les échantillons, une solution d'ammoniaque à 0,12 % est utilisée pour le rinçage du système.

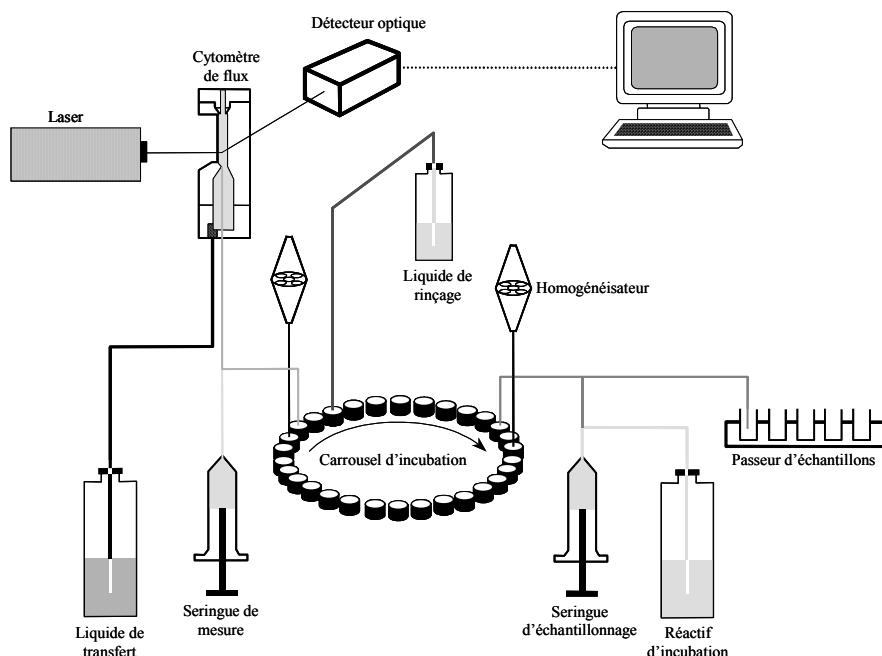


Figure 12-1. Schéma de fonctionnement du Bactoscan FC (Ninane V. et al., 2000)

Une table de conversion, déterminée par le laboratoire, permet de transformer les impulsions comptabilisées en unités de référence ($\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Lors de nos essais, le lait est remplacé par un milieu constitué du bouillon nutritif, du lait, des spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*.

La validation du Bactoscan FC pour notre application spécifique sera réalisée en étudiant la linéarité de la réponse, l'erreur de transfert et différents paramètres analytiques.

12.4. Résultats

12.4.1. Vérification des conditions de stérilité du milieu, comptage de la teneur en spores initiale et vérification de l'incapacité des spores à se développer à 55°C

Les conditions de stérilité du milieu ont été vérifiées sur milieu PCA (comptage des colonies développées après incubation à 30°C en aérobiose). L'incapacité des spores à se développer à 55°C a été vérifiée sur gélose nutritive (comptage des colonies développées après incubation à 55°C) et le comptage proprement dit des spores a été réalisé sur gélose nutritive (comptage des colonies après incubation à 64°C) (**Tableau 12-1**).

Tableau 12-1. Résultats des comptages effectués pour la vérification des conditions de stérilité du milieu et la détermination de la teneur en spores initiale

	Echantillon 1	Echantillon 2
Composition	Lait UHT demi-écrémé Bouillon nutritif 2/1 – V/v	Lait UHT demi-écrémé Bouillon nutritif 2/1 – V/v Spores de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> (Titre : 10 ⁶ – 10 ⁷ – 1%)
Contrôle de la croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> à 30°C en aérobiose (2 boîtes à la dilution 10 ⁰)	0 UFC·mL ⁻¹	0 UFC·mL ⁻¹
Contrôle de la croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> à 55°C en aérobiose (2 boîtes à la dilution 10 ⁰)	0 UFC·mL ⁻¹	0 UFC·mL ⁻¹
Contrôle de la croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> à 64°C en aérobiose Echantillon 1 : 2 boîtes à la dilution 10 ⁰ Echantillon 2 : 2 boîtes par dilution (10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴)	0 UFC·mL ⁻¹	40.000 UFC·mL ⁻¹
Comptage Bactoscan FC (bacteria·mL ⁻¹) – n = 5	Moyenne : 125.600 Ecart-type : 11.610 CV : 9,24 %	Moyenne : 119.800 Ecart-type : 5.450 CV : 4,55 %
Comptage Bactoscan FC (UFC·mL ⁻¹) – n = 5 (valeurs obtenues avec la droite « Lait cru »)	Moyenne 23.400 Ecart-type : 1.816 CV : 7,76 %	Moyenne : 22.400 Ecart-type : 548 CV : 2,45 %

Les résultats obtenus permettent de montrer que la température de 64°C est effectivement nécessaire à la levée des spores (non croissance observée à 30°C et à 55°C). Le dénombrement obtenu en incubant à 64°C indique que la teneur en spores est comprise entre 10⁶ et 10⁷ (valeur

annoncée par le fabricant). En effet, l'ensemencement de 1 % conduit à une teneur théorique de 10.000 à 100.000 spores·mL⁻¹.

Pour le Bactoscan FC, le comptage obtenu pour le milieu additionné de lait est différent de 0 puisque cette technique compte toutes les bactéries présentes dans l'échantillon (vivantes ou mortes), ce qui conduit à un bruit de fond à éliminer lors des études ultérieures. Ce bruit de fond sera systématiquement évalué pour chaque série d'échantillons par l'analyse d'un échantillon T₀ non mis à incuber.

12.4.2. Vérification du non-comptage des spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* par le Bactoscan FC

L'ajout de spores dans le milieu nutritif du test peut constituer une interférence lors des comptages. En effet, la méthode de référence utilise une température d'incubation de 55°C, insuffisante pour lever la dormance des spores. Pour éviter un biais entre les deux mesures, il faut donc vérifier le non-comptage des spores par le Bactoscan FC.

Pour contrôler ce paramètre, trois milieux ont été constitués et analysés au Bactoscan FC (**Tableau 12-2**).

Tableau 12-2. Résultats des comptages effectués pour la vérification du non-comptage des spores par le Bactoscan FC

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Volume de lait (mL) – lait UHT écrémé	1.000	1.000	1.000
Volume de milieu (mL) – bouillon nutritif	480	480	-
Volume de spores (mL) – titre 106-107	-	8	-
Nombre d'échantillons	5	5	-
Comptage 1 ^a	111	121	191
Comptage 2	123	121	192
Comptage 3	131	127	182
Comptage 4	142	118	182
Comptage 5	121	112	184
Moyenne rapportée au volume de lait ^a	186	179	186

^a : * 1.000 UFC·mL⁻¹

Les résultats obtenus lors de ces analyses ont été rapportés à un volume de lait unitaire (UFC_{lait}) par la formule suivante :

$$\text{UFC}_{\text{lait}} = \text{UFC}_{\text{moyenne}} \cdot \frac{\sum \text{volumes}}{1000}$$

dans laquelle la somme des volumes représentent le lait, le milieu et les spores.

Les résultats obtenus lors de cet essai (**Tableau 12-2**) montrent que la présence de spores dans l'échantillon n'interfère d'aucune manière avec le comptage de micro-organismes présents dans le lait. En effet, la moyenne des comptages rapportée au litre de lait ne diffère pas entre les trois milieux.

12.4.3. Vérification de la seule croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* à 64°C

Afin de vérifier la levée de la dormance des spores, des comptages microbiologiques ont été effectués après une incubation de 5 heures à 64°C (conditions dans lesquelles le test est évalué) et comparés aux résultats obtenus sur les échantillons avant incubation (**Tableau 12-3**).

Tableau 12-3. Evaluation de la non contamination de la croissance à 64°C

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4
Composition	Lait UHT demi-écrémé Bouillon nutritif 2/1 – V/v	Lait UHT demi-écrémé Bouillon nutritif 2/1 – V/v	Spores de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> (Titre : 10^6 – 10^7) – 1%	Lait UHT demi-écrémé Bouillon nutritif 2/1 – V/v
Incubation	-	5 heures à 64°C	-	5 heures à 64°C
Contrôle de la croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> à 30°C en aérobiose (2 boîtes à la dilution 10^0)	0 UFC·mL ⁻¹	0 UFC·mL ⁻¹	0 UFC·mL ⁻¹	0 UFC·mL ⁻¹
Contrôle de la croissance de <i>G. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> à 55°C en aérobiose (2 boîtes à la dilution 10^0)	0 UFC·mL ⁻¹	0 UFC·mL ⁻¹	0 UFC·mL ⁻¹	$130 \cdot 10^4$ UFC·mL ⁻¹

Les contrôles réalisés à 30°C (conditions de détermination de la flore totale) et à 55°C (conditions de croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* sous forme active, 64°C étant nécessaire pour lever la dormance des spores) montrent l'absence de contamination du milieu par d'autres bactéries. De plus, l'absence totale de colonies indique que la température n'est pas suffisante pour lever la dormance de la spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* (échantillon 3) et pour permettre la croissance de la souche active (échantillon 4). La température de 55°C ne permet pas la levée de la dormance (échantillon 3) mais permet par

contre le développement de la souche active (échantillon 4). Ces données confirment les résultats obtenus lors de l'essai de contrôle de la stérilité du milieu et de la croissance de la souche à différentes températures⁵⁰.

12.4.4. Table de conversion

12.4.4.1. Evaluation de l'erreur de transfert

L'erreur de transfert d'un échantillon sur le suivant a été évaluée sur une série de 12 échantillons affichant de 100.000 à plus de 50.000.000 impulsions·mL⁻¹. Pour cette estimation, des échantillons à teneur croissance en bactéries ont été analysés selon la séquence « L' – B – B' » dans laquelle les « L' » correspondent aux échantillons de référence, les « B » et « B' » étant constitués d'échantillons à teneur constante en germes (**Tableau 12-4**).

L'erreur de transfert a été calculée selon l'équation 4.

$$Erreur_{transfert} = \frac{\sum B - \sum B'}{\sum L'} * 100$$

Équation 4

Tableau 12-4. Résultats obtenus pour le calcul de l'erreur de transfert (impulsions·mL⁻¹ ou bacteria·mL⁻¹)

L' : données en gras – B : *données en italiques* – B' : données soulignées

1	125.000	8	134.000	15	152.000	22	148.000	29	32.541.000	36	226.000
2	66.000	9	<i>151.000</i>	16	141.000	23	8.478.000	30	<i>241.000</i>	37	<u>126.000</u>
3	124.000	10	<u>160.000</u>	17	958.000	24	<i>179.000</i>	31	<u>137.000</u>		
4	<u>123.000</u>	11	135.000	18	<i>146.000</i>	25	<u>166.000</u>	32	51.479.000		
5	72.000	12	<i>139.000</i>	19	<u>148.000</u>	26	33.705.000	33	<i>328.000</i>		
6	148.000	13	<u>142.000</u>	20	8.745.000	27	<i>225.000</i>	34	<u>156.000</u>		
7	<u>139.000</u>	14	1.013.000	21	<i>171.000</i>	28	<u>162.000</u>	35	40.972.000		

Par calcul (Équation 4), l'erreur de transfert est de 0,27 %. Dans ce calcul, la première valeur de B' (125.000) n'est pas prise en compte. Le coefficient de variation obtenu pour la série B (**Tableau 12-5**), soit la série contaminée par un éventuel transfert d'échantillon fortement

⁵⁰ 13.4.1. Vérification des conditions de stérilité du milieu, comptage de la teneur en spores initiale et vérification de l'incapacité des spores à se développer à 55°C

chargé sur un échantillon moins chargé, montre que cette contamination n'est pas négligeable. Il est donc important d'intercaler un échantillon de contrôle entre chaque échantillon analysé.

Tableau 12-5. Paramètres calculés lors de l'estimation de l'erreur de transfert ($\text{impulsions}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $\text{bacteria}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Paramètres statistiques et sommes nécessaires au calcul de l'erreur de transfert (s.o. : sans objet)					
	n	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Somme
L'	12	s.o.	s.o.	s.o.	178.298.000
B	12	185.833	58.823	31,7	2.230.000
<u>B'</u>	12	145.667	13.680	9,4	1.748.000

12.4.4.2. Limite de détection

La limite de détection est définie comme étant la plus petite teneur en bactéries ($\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lait) qui peut être détectée par la méthode de comptage, et ce avec un certain degré de confiance (95 %).

Elle est déterminée en comparant les résultats obtenus par la méthode de référence et par le Bactoscan FC pour des échantillons contenant de faibles teneurs en germes. La limite de détection du Bactoscan FC correspond à la plus basse concentration en bactéries à partir de laquelle la relation entre la méthode de référence et le Bactoscan FC est linéaire. En dessous de cette limite, la relation est hyperbolique.

Cette concentration se situe aux alentours de $30.000 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

12.4.4.3. Précision

La précision représente la capacité du BactoScan FC à fournir un résultat similaire au résultat obtenu par la méthode de référence. Elle est calculée au moyen de la formule suivante :

$$S_R \equiv \sqrt{\frac{1}{2 \cdot q} \cdot \sum_{i=1}^q w_i^2}$$

dans laquelle q représente le nombre d'échantillons analysés et w représente la différence entre les logarithmes des comptages réalisés.

La précision calculée sur un nombre de 101 mesures, réalisées par méthode de référence sur boîte de pétri et par BactoScan FC, est de 0,3526.

12.4.4.4. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité caractérise la capacité du BactoScan FC à donner un résultat identique au cours d'un court laps de temps, pour un même échantillon, dans des conditions d'analyse identiques. La reproductibilité évalue la même capacité lorsque les conditions d'analyses sont modifiées (temps entre les analyses plus long). La répétabilité et la reproductibilité sont évaluées sur les données brutes du BactoScan FC ($\text{bactéries}\cdot\text{mL}^{-1}$). Dans le cas de nos essais, la répétabilité est estimée sur une série d'échantillons analysés à quelques heures d'intervalle et la reproductibilité sur une série d'échantillons analysés à plus de 24 heures d'intervalle.

Tableau 12-6. Répétabilité des comptages BactoScan FC sur quelques heures ($\text{impulsions}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $\text{bacteria}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Comptage T_0	Comptage T_1	$\text{Log}(T_0)$	$\text{Log}(T_1)$	Différence des logarithmes	$(\text{Différence})^2$
50	62	1,6990	1,7924	-0,0934	0,0087276
3158	2246	3,4994	3,3514	0,1480	0,0219047
6035	4412	3,7807	3,6446	0,1360	0,0185074
11038	8119	4,0429	3,9095	0,1334	0,0177923
31504	30341	4,4984	4,4820	0,0163	0,0002669
56265	51894	4,7502	4,7151	0,0351	0,0012335
89805	90379	4,9533	4,9561	-0,0028	0,0000077
96209	97521	4,9832	4,9891	-0,0059	0,0000346
107927	110477	5,0331	5,0433	-0,0101	0,0001029
117696	121632	5,0708	5,0850	-0,0143	0,0002041
120394	123633	5,0806	5,0921	-0,0115	0,0001329
120599	124704	5,0813	5,0959	-0,0145	0,0002113
Somme					0,0691258

Les conditions de conservation des échantillons ont été particulièrement strictes de manière à éviter toute évolution des échantillons au cours du stockage. Les différences observées seraient alors attribuées erronément à l'appareil en lieu et place de la modification de l'échantillon. Le tableau 12-6 reprend les résultats des comptages effectués par BactoScan FC au temps T_0 et au temps T_1 (**Tableau 12-6**), pour 12 échantillons répartis sur l'ensemble de la gamme des concentrations analysées, permettent de calculer la répétabilité (GRDS), selon la formule suivante :

$$\text{GRDS}_{\text{Répétabilité}} = (10^{\text{Précision}} - 1) \cdot 100$$

La précision calculée dans les conditions de répétabilité (**Tableau 12-6**), est égale à 0,0537, ce qui conduit à une valeur de GRDS de 13,2 %.

Tableau 12-7. Reproductibilité des comptages BactoScan FC sur plus de 24 heures ($\text{impulsions} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $\text{bacteria} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Comptage J	Comptage J + 1	Log(J)	Log(J+1)	Différence des logarithmes	(Différence) ²	Impulsion J	Impulsion J + 1	Log(J)	Log(J+1)	Différence des logarithmes	(Différence) ²
7	35	1,5682	1,5441	0,0241	0,000582	41	42	1,6128	1,6232	-0,0105	0,000110
63	58	1,7993	1,7634	0,0359	0,001290	40	44	1,6021	1,6435	-0,0414	0,001713
70	65	1,8451	1,8129	0,0322	0,001036	42	39	1,6232	1,5911	0,0322	0,001036
118	131	2,0719	2,1173	-0,0454	0,002060	172	179	2,2355	2,2529	-0,0173	0,000300
312	311	2,4942	2,4928	0,0014	0,000002	116	143	2,0645	2,1553	-0,0909	0,008259
992	1061	2,9965	3,0257	-0,0292	0,000853	1026	1051	3,0111	3,0216	-0,0105	0,000109
31	32	1,4914	1,5051	-0,0138	0,000190	501	556	2,6998	2,7451	-0,0452	0,002046
50	62	1,6990	1,7924	-0,0934	0,008728	8416	9281	3,9251	3,9676	-0,0425	0,001805
74	69	1,8692	1,8388	0,0304	0,000923	5960	6573	3,7752	3,8178	-0,0425	0,001808
235	250	2,3711	2,3979	-0,0269	0,000722	64	62	1,8062	1,7924	0,0138	0,000190
720	796	2,8573	2,9009	-0,0436	0,001899	598	648	2,7767	2,8116	-0,0349	0,001216
2469	2971	3,3925	3,4729	-0,0804	0,006461	922	943	2,9647	2,9745	-0,0098	0,000096
23	15	1,3617	1,1761	0,1856	0,034461	1259	1380	3,1000	3,1399	-0,0399	0,001588
74	72	1,8692	1,8573	0,0119	0,000142	2498	2739	3,3976	3,4376	-0,0400	0,001600
81	73	1,9085	1,8633	0,0452	0,002040	3572	3746	3,5529	3,5736	-0,0207	0,000427
87	66	1,9395	1,8195	0,1200	0,014394	6913	7483	3,8397	3,8741	-0,0344	0,001184
85	82	1,9294	1,9138	0,0156	0,000244	14575	16334	4,1636	4,2131	-0,0495	0,002449
87	105	1,9395	2,0212	-0,0817	0,006670	18439	20398	4,2657	4,3096	-0,0439	0,001923
88	78	1,9445	1,8921	0,0524	0,002745	44608	48325	4,6494	4,6842	-0,0348	0,001208
80	72	1,9031	1,8573	0,0458	0,002094	70717	73969	4,8495	4,8690	-0,0195	0,000381
92	75	1,9638	1,8751	0,0887	0,007872	26	30	1,4150	1,4771	-0,0621	0,003862
96	84	1,9823	1,9243	0,0580	0,003363	40	38	1,6021	1,5798	0,0223	0,000496

n = 44

 $\Sigma(\text{Différence})^2 = 0,132576772$

Le paramètre GRDS, exprimé en pourcents, dans les conditions de reproductibilité définies (comptage au temps J et au temps J + 24 heures), est calculé selon une formule identique à celle utilisée pour le calcul en condition de répétabilité :

$$\text{GRSD}_{\text{Reproductibilité}} = (10^{\text{Précision}} - 1) \cdot 100$$

La précision est calculée de la même manière, dans les conditions de reproductibilité :

$$S_R \equiv \sqrt{\frac{1}{2 \cdot n} \cdot \sum_{i=1}^q w_i^2}$$

dans laquelle n est le nombre d'échantillon et w est la différence entre les logarithmes.

Les calculs (**Tableau 12-7**) conduisent à un GRDS égal à 3,88 %.

Le diagramme de dispersion réalisé à partir des mêmes données (**Figure 12-2**) renseignait déjà sur la qualité de la reproductibilité.

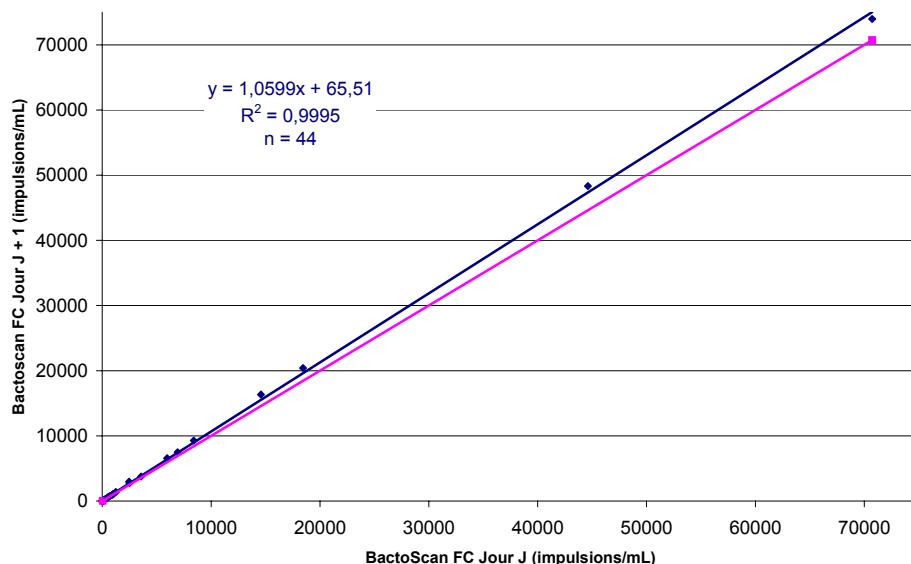


Figure 12-2. Diagramme de dispersion des résultats obtenus en conditions de reproductibilité

12.4.4.5. Comptage BactoScan FC et comparaison avec la méthode de référence

La technologie mise en œuvre dans le BactoScan FC dénombre l'ensemble de bactéries présentes dans l'échantillon, tant les bactéries mortes que les bactéries vivantes. Dès lors, il est important, pour chaque série d'échantillons constitués à partir d'un même lait, de réaliser un échantillon non-incubé T_0 qui constitue le bruit de fond de chaque série. En effet, les laits contiennent au départ une quantité différente de bactéries tuées lors des traitements de thermisation. Il est donc nécessaire de soustraire ce bruit des résultats obtenus pour les échantillons constitués avec le même lait afin de comparer les séries entre elles.

L'erreur de transfert pouvant aller jusqu'à 1 %, un échantillon blanc, à faible teneur bactérienne, est inséré entre chaque échantillon. Cette façon de procéder, si elle double le temps d'analyse, permet de limiter les contaminations entre échantillons, surtout lorsqu'ils sont chargés.

Tableau 12-8. Cinétique de croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* au Bactoscan FC et par méthode de comptage sur boîte

Incubation (heures)	BactoScan FC (impulsions·mL ⁻¹)	Comptage sur boîte (UFC·mL ⁻¹)	Incubation (heures)	BactoScan FC (impulsions·mL ⁻¹)	Comptage sur boîte (UFC·mL ⁻¹)
2h	3.158	37	3h30	96.209	6.750
2h15	6.035	137	3h45	107.927	11.000
2h30	11.038	335	4h	117.696	13.000
2h45	31.504	1.423	4h15	120.394	19.091
3h	56.265	2.145	4h30	120.599	20.864
3h15	79.805	2.800			

La courbe de la croissance bactérienne (**Figure 12-3**) a été réalisée à partir des comptages réalisés au BactoScan FC (**Tableau 12-8**) pour des échantillons incubés entre deux heures et quatre heures quart.

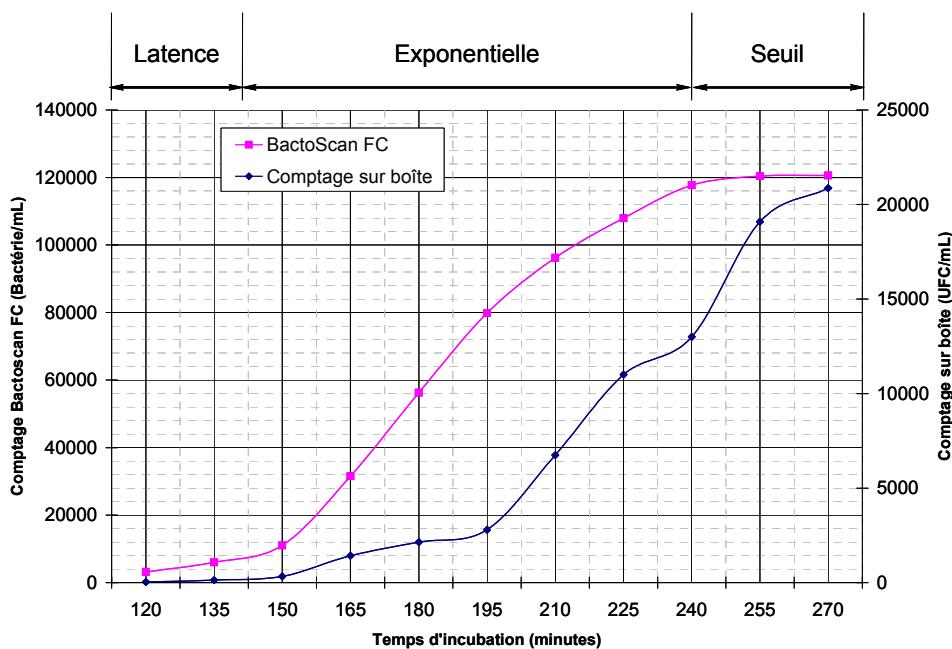


Figure 12-3. Cinétique de croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* : comparaison du Bactoscan FC et de la méthode de comptage sur boîte

Cette courbe décrit bien la croissance propre aux bactéries, croissance qui présente trois stades : le premier correspond à la phase de latence (jusque environ 2h30), le second reprend la phase de croissance exponentielle (jusque environ 4h00) et le dernier correspond à une phase de

palier au cours de laquelle la croissance est arrêtée par manque de substrat ou par accumulation de métabolites.

De plus, la courbe de la méthode de comptage sur boîte présente une allure similaire à la courbe Bastocan, cette dernière ayant cependant des valeurs beaucoup plus importantes, alors que les échantillons sont identiques pour les deux méthodes. Cette différence peut être attribuée au fait que le BactoScan FC comptabilise toutes les bactéries mortes ou vivantes, la méthode de référence ne prenant en compte que les bactéries susceptibles de croître.

12.4.4.6. Droite de calibrage

La comparaison des données obtenues par la méthode de référence et par le BactoScan FC montre qu'il existe une grande distorsion entre les deux types de résultats. Il est cependant possible d'établir une relation linéaire entre les logarithmes des comptages effectués (**Figure 12-4**).

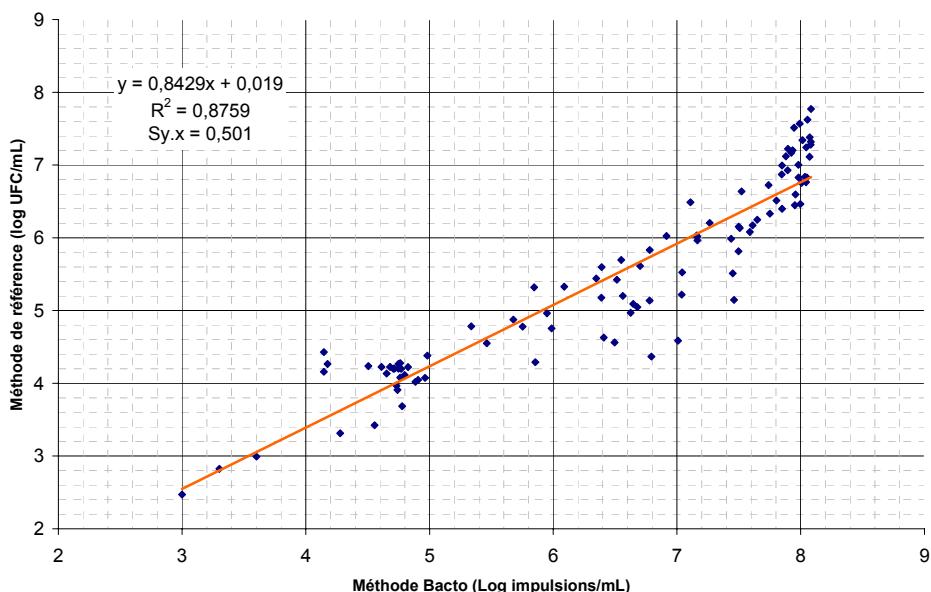


Figure 12-4. Diagramme de dispersion des valeurs obtenues par le Bactoscan FC et par la méthode de comptage sur boîte

La droite obtenue permet d'obtenir la concentration en UFC d'un échantillon simplement par projection de sa teneur en bactéries ($\text{impulsions} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Afin de vérifier le potentiel de cette droite de calibrage à être utilisée dans le cadre de la détection des antibiotiques, une cinétique supplémentaire a été réalisée sur une durée de 5 heures

et les valeurs obtenues au BactoScan FC ont été comparées, après conversion, aux valeurs obtenues par la méthode de comptage sur boîte (**Tableau 12-9**).

Tableau 12-9. Cinétique de croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* au Bactoscan FC et par méthode de comptage sur boîte – résultats obtenus

Incubation	BactScan FC (Bactéries·mL ⁻¹)	BactScan FC (UFC·mL ⁻¹) Estimées	Comptage sur boîte (UFC·mL ⁻¹) Obtenues	Log(Estimées)	Log(Obtenues)	Différence des logarithmes
T ₀	152.000	25.900	23.600	4,4133	4,3729	0,040388
1 heures	208.000	33.900	28.200	4,5302	4,4502	0,079951
2 heures	1.857.000	219.900	242.700	5,3422	5,3851	-0,042845
3 heures	39.992.000	3.026.000	3.500.000	6,4809	6,5441	-0,063199
4 heures	108.201.000	7.081.000	7.000.000	6,8501	6,8451	0,004997
5 heures	121.953.000	7.843.000	10.000.000	6,8945	7,0000	-0,105518

Un intervalle de confiance peut être calculé pour la droite (Norme FIL 128). Cet intervalle de confiance est égal à $S_{y,x} = 0,501$.

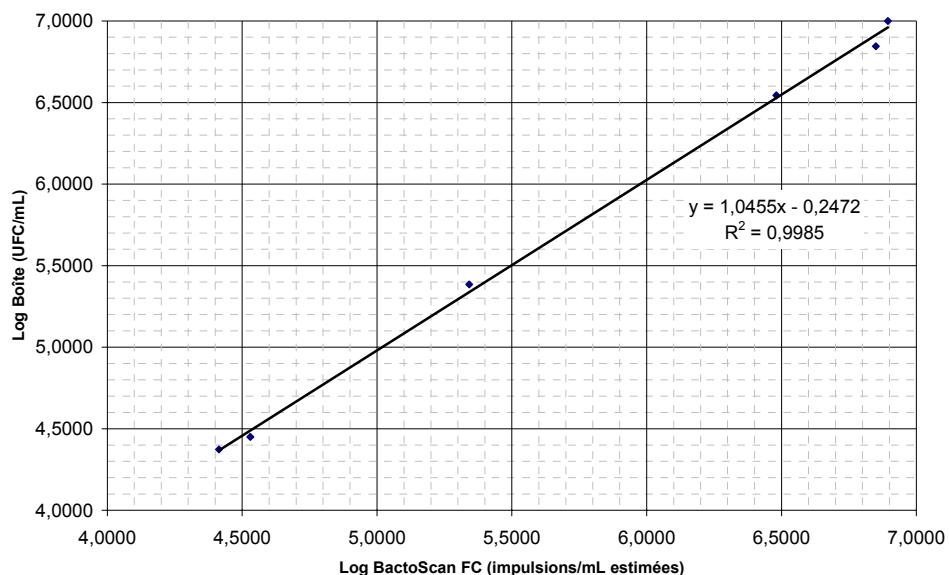


Figure 12-5. Cinétique de croissance – relation entre les valeurs mesurées par BactoScan FC et les comptages déterminés sur boîtes de pétri

Il est à noter que chaque différence de logarithmes obtenue est inférieure à $S_{y,x}$, ce qui tend à montrer que les valeurs se trouvent bien dans l'intervalle de confiance et que la droite conduit à des estimations correctes. De plus, la relation obtenue entre les résultats obtenus par comptage et

les résultats estimés par BactoScan FC, en utilisant l'équation de correction, est particulièrement bonne (**Figure 12-5**).

L'équation de correction calculée pourra être utilisée pour réaliser le comptage de la teneur en bactéries présentes dans les échantillons, lors du suivi du métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* par techniques de spectrométrie infrarouge. Le suivi de l'action antibactérienne de certaines molécules antibiotiques sera réalisé par cette technique de comptage.

Cette technique de comptage reste cependant, elle aussi, limitée par la taille des échantillons à analyser. Elle ne sera pas directement transposable à des échantillons préparés en micro-plaques dont le volume utile est de 300 µL maximum.

12.4.5. Interférences

Lors des premiers dosages effectués, le milieu additionné de lait était stérilisé avant l'ajout des spores. La stérilisation produisait un bouillon nutritif lactosé de teinte brunâtre avec formation de peaux. Lors de l'utilisation de ces bouillons, la croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* a pu être mise en évidence sur boîte de pétri. Par contre, les peaux formées (**Figure 12-6**) ont rendu les comptages par Bactoscan impossible. En effet, leur présence a conduit au colmatage du système de pompage du Bactoscan.

Lait ajouté au milieu avant stérilisation



Lait ajouté au milieu après stérilisation



Incubation du milieu test : 5 heures

Figure 12-6. Réaction de Maillard obtenue sur le milieu chauffé après 5 heures d'incubation

Alors que la souche s'est multipliée, aucun acide, dont l'acide lactique, n'a pu être mis en évidence par chromatographie liquide. Il apparaît que le glucose ajouté dans le milieu réagit avec des groupements amines, dans une réaction de Maillard. Cette réaction conduit à la formation d'un produit condensé et polymérisé formant des agrégats (les peaux), rendant le sucre

indisponible à la production d'acide lactique. L'ajout du lait UHT après la stérilisation, juste avant l'incubation, a permis de résoudre ce problème.

12.4.6. Mise en évidence de l'inhibition bactérienne par différentes molécules antibiotiques, lors des comptages par BactoScan FC

Afin d'évaluer la méthode de comptage rapide développée, des essais en présence de molécules antibiotiques ont été réalisés. Cinq composés ont ainsi été testés : la benzylpénicilline, la cloxacilline, l'oxytétracycline, la sulfadiazine et la dihydrostreptomycine.

Tableau 12-10. Nature et concentration des antibiotiques testés ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb)

Antibiotiques	0,5 * LMR	LMR	2 * LMR
Benzylpénicilline	2	4	-
Oxytétracycline	-	100	200
Dihydrostreptomycine	-	200	400
Cloxacilline	15	30	-
Sulfadiazine	-	100	200

Pour constituer le bouillon nutritif, deux niveaux de concentration de dopage sont choisis pour le lait, parmi les trois suivants : 0,5 * LMR – 1 * LMR – 2 * LMR (**Tableau 12-10**).

Pour chacune des concentrations testées, une cinétique est réalisée, avec dénombrements effectués sur boîtes et par BactoScan FC après 1, 2, 3, 4 et 4h30 d'incubation. Les dénombrements sont réalisés sur les mêmes échantillons, le prélèvement pour le comptage sur boîte étant d'abord réalisé, les échantillons étant ensuite placés dans un bain à 0°C, pour bloquer suffisamment le métabolisme de la souche présente avant l'analyse par BactoScan FC.

Différentes cinétiques ont été obtenues lors des dénombrements réalisés par le BactoScan FC, les échantillons étant dopés à la LMR pour chacun des antibiotiques (**Figure 12-7**).

Trois comportements sont clairement mis en évidence dans les cinétiques illustrées : la benzylpénicilline et la cloxacilline, deux antibiotiques à noyau β -lactame inhibent la croissance de la souche, le dénombrement n'évoluant pas au cours du temps, l'oxytétracycline et la sulfadiazine montrent une augmentation du nombre de bactéries après 3 heures d'incubation et la dihydrostreptomycine qui offre une cinétique typique d'une souche bactérienne.

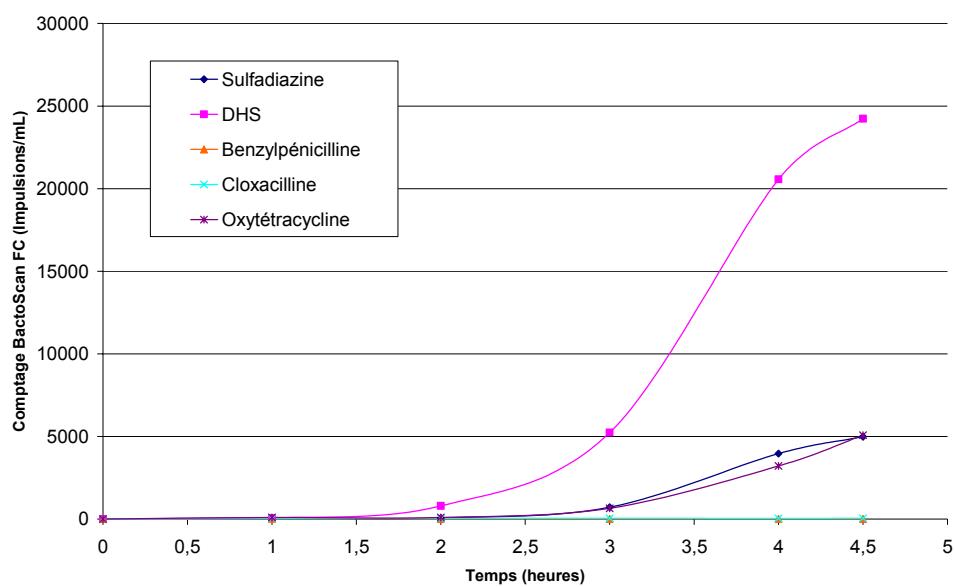


Figure 12-7. Cinétiques « BactoScan FC » en présence d'antibiotiques (LMR)

Le BactoScan FC comptabilisant l'ensemble des bactéries, sans aucun conversion, il est impossible d'avoir une information sur l'évolution réelle de l'échantillon.

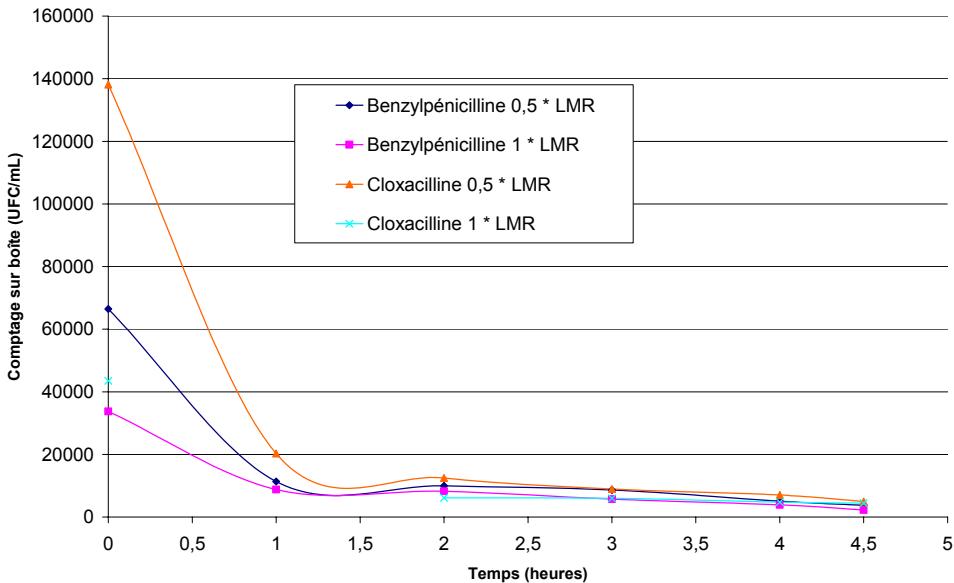


Figure 12-8. Cinétiques « Boîtes de pétri » en présence de 2 antibiotiques à noyau β-lactame, la benzylpénicilline et la cloxacilline

La cinétique réalisée sur boîte de pétri permet de mieux caractériser les différentes molécules. Ainsi, les dénombrements sur boîtes pour la pénicilline et la cloxacilline, qui apparaissent comme bactériostatiques lors des comptages BactoScan FC, montrent que le

nombre de colonies viables diminuent au cours du temps, mettant en évidence le caractère bactéricide des deux molécules (**Figure 12-8**). Si les comptages initiaux sont relativement différents, après deux heures d'incubation, ils sont devenus semblables et continuent à décroître dans le temps.

Les deux molécules, la sufladiazine et l'oxytétracycline, présentant un comportement similaire lors des comptages BactoScan FC, à savoir, une augmentation ralentie du nombre de bactéries présentent des comportements différents sur boîtes de pétri (**Figure 12-9**). En effet, l'oxytétracycline se comporte en bactéricide pour la concentration de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2 * \text{LMR}$) et en bactériostatique pour la concentration de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LMR). La teneur en colonies viables se maintient durant les premières heures d'incubation.

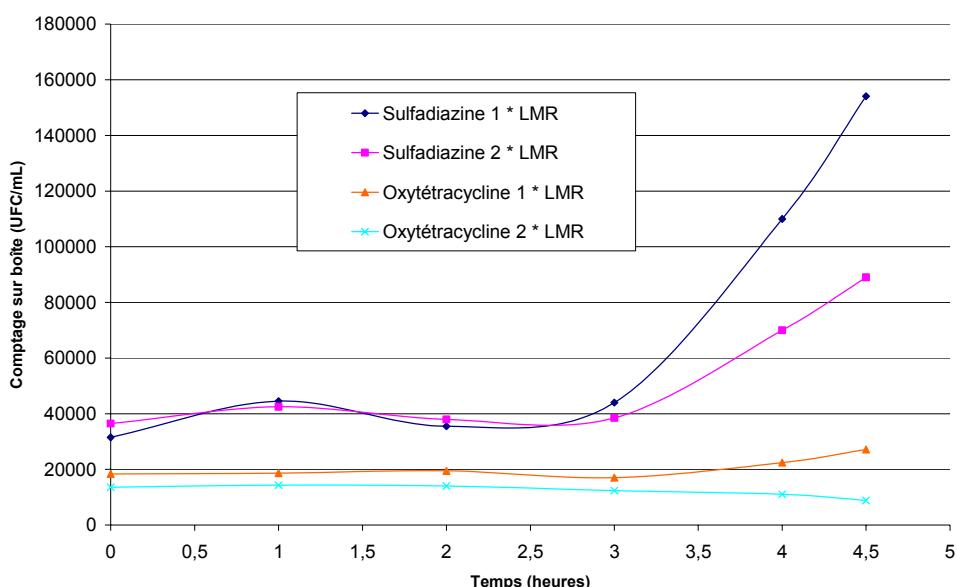


Figure 12-9. Cinétiques « Boîtes de pétri » en présence de 2 antibiotiques, la sulfadiazine et l'oxytétracycline

Pour la concentration de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, elle augmente après 4 heures, pour la concentration de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, elle diminue après ce même temps.

Ce maintien de la teneur en colonies viables signifie simplement que la balance entre cellules vivantes et cellules mortes est constante, les résultats du BactoScan FC montrant effectivement le renouvellement des cellules. En ce qui concerne la sulfadiazine, le maintien, jusqu'à 3 heures d'incubation, de la teneur en cellules vivantes s'explique de la même manière que pour l'oxytétracycline. Après 4 heures d'incubation, et à fortiori après 4 h 30 d'incubation,

l'effet concentration en antibactérien se fait sentir : la croissance est ralentie nettement pour la concentration de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2 * \text{LMR}$) alors qu'elle présente une courbe plus rapide pour la concentration de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LMR). Les résultats obtenus pour la dihydrostreptomycine montrent que les deux concentrations en antibiotiques utilisées ne présentent aucun effet sur la croissance de la bactérie test (**Figure 12-10**).

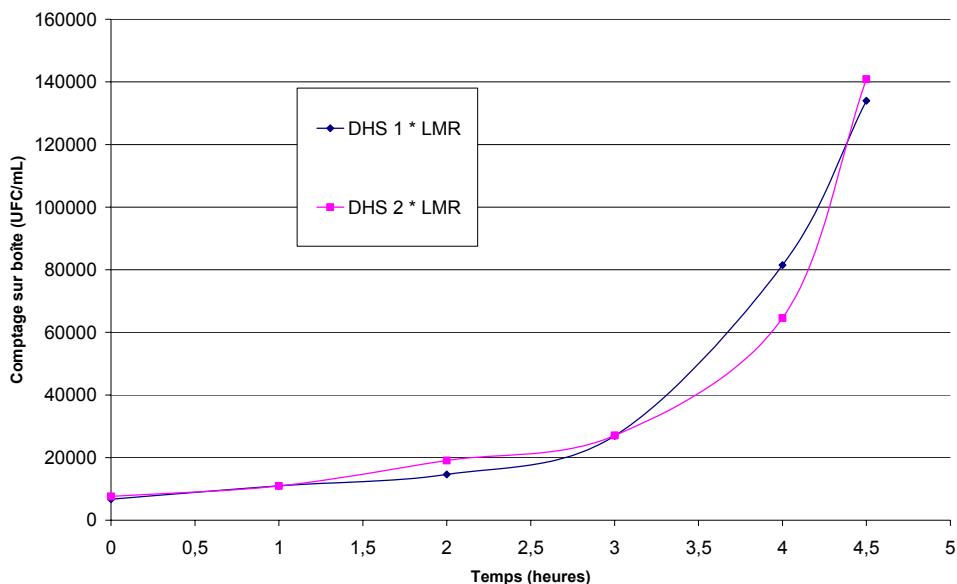


Figure 12-10. Cinétiques « Boîtes de pétri » en présence de la dihydrostreptomycine

L'augmentation de la sensibilité de la souche à la sulfadiazine peut se faire par le biais de l'ajout, dans le milieu, de triméthoprime, comme c'est le cas dans les tests commerciaux.

12.5. Conclusions

L'objectif principal de ces essais résidait dans le développement d'une méthode de comptage rapide, permettant de mettre en évidence la croissance bactérienne de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, en s'affranchissant de la méthode de comptage sur boîte de pétri, particulièrement lourde à mettre en œuvre.

Cet objectif a été atteint en adaptant la méthode de dénombrement des germes dans le lait cru, une méthode basée sur le marquage des cellules par un composé fluorescent sur le comptage des impulsions générées par ce marquage, lors de l'excitation du marqueur par un rayonnement laser (BactoScan FC). Une équation de correction est établie entre les dénombrements réalisés par méthode sur boîte et le dénombrement calculé pour la technique rapide, celle-ci comptabilisant toutes les cellules, vivantes ou mortes. L'équation calculée, sur une centaine

d'échantillons, conduit à un $R^2=0,88$. Les échantillons de validation permettent de rendre la droite utilisable dans le cadre de nos essais.

L'application de la technique rapide a montré l'efficacité de plusieurs antibiotiques, à la LMR, sur la souche utilisée. Ainsi, la benzylpénicilline et la cloxacilline présente un caractère bactéricide confirmé par les dénombrements réalisés sur boîte de pétri. Le caractère bactériostatique de la sulfadiazine et de l'oxytétracycline a été mis en évidence sur boîte de pétri alors qu'un simple ralentissement était constaté par le BactoScan FC. La dihydrostreptomycine, dernière molécule étudiée, ne présente aucune action sur la bactérie utilisée dans la détection des antibiotiques, tant à la concentration de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LMR) qu'à la concentration de $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (2^*LMR).

CHAPITRE 13 : DÉVELOPPEMENT D'UN OUTIL CHROMATOGRAPHIQUE DESTINÉ À L'ANALYSE DES SULFAMIDES

13.1. Introduction

Le seul outil microbiologique, destiné à mettre un pouvoir inhibiteur en évidence et donc, par voie de conséquence, la présence de résidus d'antibiotiques, n'est pas suffisant pour décider de la contamination d'un échantillon de lait. En effet, les résultats obtenus sont parfois dus à une combinaison de résidus : effets additifs ou synergiques mesurés pour certaines associations (triméthoprime-sulfamides), effets antagonistes conduisant à la disparition de l'effet inhibiteur sur l'échantillon de lait (β -lactames-tétracyclines).

Il est donc important de disposer d'outils analytiques spécifiques, permettant d'identifier et de quantifier les molécules présentes, que le résultat du test microbiologique soit positif ou négatif. Ces outils doivent intégrer l'extraction d'une multitude de composés (environ 75 repris dans la législation) présentant des propriétés physico-chimiques différentes. En l'état actuel, il est illusoire de vouloir disposer d'un protocole d'extraction unique permettant l'analyse simultanée des résidus antibiotiques à leur limite propre. La technologie qui le permettrait repose sur l'analyse par spectrométrie de masse en temps de vol (*TOF*) couplé à un traitement des résultats par chimiométrie.

13.2. Objectifs

Les sulfamides appartiennent à un groupe de molécules particulièrement important dans le traitement de pathologies bovines. La sensibilité du test microbiologique présente parfois quelques lacunes par rapport à ces composés. De plus, pour ce groupe, une LMR globale est fixée : $100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ par composé ou pour le groupe. Il est donc important d'identifier individuellement les sulfamides présents et de les sommer.

Certains kits commerciaux permettent la mise en évidence de la sulfaméthazine, l'un des sulfamides les plus répandus, mais il est difficile de relier la réponse de ce type de kits aux autres sulfamides (non maîtrise d'éventuelles réactions croisées).

Le but de ces essais repose sur le développement d'un outil analytique permettant la détection et le dosage des molécules du groupe des sulfamides. Cet outil contribuera à établir, sur échantillons réels, la relation existant entre les résultats des tests microbiologiques de screening et les résultats de la physico-chimie.

13.3. Matériel et méthode

13.3.1. Réactifs

Les différents solvants (acétonitrile, méthanol et acétone) nécessaires à la mise en œuvre de la méthode développée sont de qualité HPLC (Merck). L'acide acétique glacial, l'acétate de sodium anhydre et l'acide hydrochlorique sont de qualité analytique (Merck). L'eau ultra-pure est produite par un système MilliQ (Millipore).

La fluorescamine (réactif de fluorescence) provient de la firme Fluka.

Les différents sulfamides analysés ont été achetés auprès de la firme Sigma : sulfadiazine (SDZ), sulfaméthazine (SMT), sulfamérazine (SMR), sulfameter (SME), sulfamethoxazole (SMZ), sulfadimethoxine (SMDX), sulfamethizole (SMTZ), sulfamoxole (SMX).

Le sulfatroxazole (STX) a été fourni gracieusement par la firme Roche.

L'acide *p*-amino benzoïque (PABA) est de qualité analytique (Sigma).

13.3.2. Matériel

Les analyses ont été réalisées sur deux systèmes HPLC.

Le premier système utilisé pour le développement de la méthode comprend une unité de pompage Perkin Elmer (série 400), un four externe, thermostaté à 40°C, de la marque Chrompack et un détecteur à fluorescence (spectrofluorimètre Waters 474), équipé de deux monochromateurs. Dans cette configuration, les calculs sont réalisés au moyen du logiciel ICI DP 800. La colonne utilisée est une colonne C18 *reversed phase*, Licrocart 250-HPLC Superspher 100 RP (Merck), 4 µm (4 * 250 mm).

Le second système, utilisé pour l'analyse en routine d'échantillons, comprend un système chromatographique AllianceTM (Waters SA), composé d'une unité de pompage quaternaire, d'un four intégré, d'un passeur d'échantillons thermostaté et d'un détecteur à fluorescence (spectrofluorimètre Waters 474), le tout piloté par le logiciel Millenium32 (Waters SA). La colonne utilisée est une colonne Symmetry[®] C₁₈ 5 µm (4,6 * 250 mm).

13.3.3. Méthode

13.3.3.1. Préparation des solutions de standards

Les solutions stock des sulfamides SDZ et SMR sont préparées en dissolvant 10 mg de chacune des molécules dans 10 mL de méthanol. Le volume est porté à 100 mL avec de l'eau ultra-pure.

Les solutions stock des autres sulfamides (SMT – SME – SMZ – SDMX – SMX – STX) sont préparées en dissolvant directement 10 mg de chacune des molécules dans 100 mL d'eau ultra-pure.

Chaque solution est alors diluée 100 fois au moyen d'eau ultra-pure pour obtenir une solution d'une concentration de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Les droites de calibrages sont obtenues à partir de dilutions réalisées au départ de cette solution, tant dans l'eau que dans le lait.

Le lait utilisé pour réaliser les droites et les calculs de taux de récupération est un lait de mélange provenant d'au moins sept vaches dont le dernier traitement antibiotique est antérieur à 3 mois. La production individuelle de ces vaches est au minimum de 20 litres par jour. Le moment de prélèvement du lait se trouve dans le tiers médian de la période de lactation. La teneur en germes du lait utilisé est inférieure à $100.000 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ et la teneur en cellules somatiques inférieure à $200.000 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$. La présence de résidus inhibiteurs dans le lait a été contrôlée par test microbiologique et par HPLC, en ce qui concerne les sulfamides (aucune réponse n'est apparue aux différents temps de rétention correspondant aux molécules recherchées).

Les différentes solutions de standard interne étudiées sont préparées de façon similaire. Ces solutions sont ajoutées aux solutions standards (aqueuse) des différents antibiotiques ou aux échantillons de lait de manière à obtenir une concentration finale en standard interne (SI) de $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

13.3.3.2. Préparation des réactifs

Le réactif de fluorescence Fluram est préparé en dissolvant 10 mg de fluorescamine dans 50 mL d'acétone.

La solution tampon à pH 3 est obtenue en ajoutant de l'HCl 3M à une solution d'acétate de sodium 3M.

La phase mobile consiste en un mélange 60/40 v/v Acide acétique 2 %/Acétonitrile.

13.3.3.3. Préparation des échantillons

La première étape de préparation des échantillons consiste à écrêmer le lait cru par centrifugation (15 minutes à 3.000 g).

Un volume de 1,95 mL de lait écrémé est prélevé sous la couche de crème. Le standard interne est alors ajouté (0,05 mL), de manière à obtenir une concentration finale en SI de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Transférer les 2 mL de lait (1,95 mL de lait + 0,05 mL de SI) dans un tube contenant 2 mL d'HCl 2N. Agiter et laisser reposer 5 minutes. Filtrer sur filtre papier (Schleicher & Schuell 602h ; 150 mm), jusqu'à obtention d'un filtrat clair.

Prélever 1 mL de filtrat, y ajouter, dans l'ordre, 0,780 mL d'acétate de sodium 1,25M, 1 mL de tampon acétate 3M pH 3 et 0,6 mL de la solution de fluorescamine. Laisser reposer à température ambiante pour 25 minutes. Filtrer sur un filtre 0,45 μm (Gelman FP-450 – 13 mm).

Injecter 50 μL dans le système HPLC.

13.3.3.4. Conditions d'étude de la fluorescence

Lors de l'étude de la fluorescence (définition des conditions optimales d'émission, cinétique de fluorescence et stabilité), les essais ont été réalisés sur un spectrofluorimètre Baird-Atomic, Fluoricord FP100 muni d'une lampe au xénon de 150w, équipé d'une cellule en verre.

L'échantillon destiné à évaluer les conditions optimales de fluorescence est constitué d'une solution en sulfamide à $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, dissout dans la phase mobile de la chromatographie liquide (mélange 60/40 v/v Acide acétique 2%/Acétonitrile).

Il est préparé de la manière suivante :

A 1 mL d'échantillon sont ajoutés 1 mL HCl 2N, 1,56 mL de solution d'acétate de sodium 1,25 M, 2 mL de tampon pH 3 et 1,2 mL de solution de fluorescamine. Les concentrations en fluorescamine sont variables ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de façon à étudier l'incidence de la concentration en réactif de fluorescence.

L'étalonnage du spectrofluorimètre est réalisé au moyen d'une solution de sulfate de quinine ($0,250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ H_2SO_4 0,05 M) qui présente une longueur d'onde d'excitation à 350 nm et une longueur d'onde d'émission à 450 nm.

Les longueurs d'onde sont réglées sur $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 495 \text{ nm}$, la solution est placée dans la cellule en verre et les mesurées réalisées à intervalle de temps constant, fonction de la nature de l'étude.

13.4. Résultats

13.4.1. Choix des conditions de fluorescence

Takeda N. & Akiyama Y. (1992) renseignent les longueurs d'onde suivantes pour l'analyse mettant en œuvre la fluorescamine : $\lambda_{\text{excitation}} = 405 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 495 \text{ nm}$. Ces longueurs d'onde ont été confirmées lors de l'analyse d'un lait UHT, dopé par addition de différents sulfamides (SMR – SDZ et SMT).

La fluorescence liée à l'usage de la fluorescamine est basée sur la réaction du groupement $-\text{NH}_2$ présent sur ce type de molécule et de la molécule fluorescente (**Figure 13-1**).

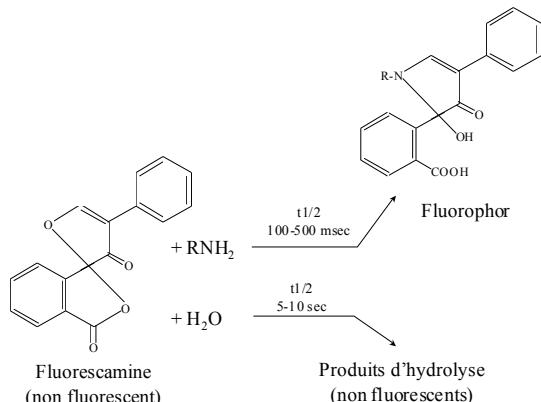


Figure 13-1. Réaction de fluorescence entre la fluorescamine et les sulfamides

La déprotéinisation du lait par ajout d'acide nécessite d'optimiser le pH de réaction entre les deux constituants. Ainsi, pour fixer une valeur optimale de pH, différents essais ont été menés (**Figure 13-2**).

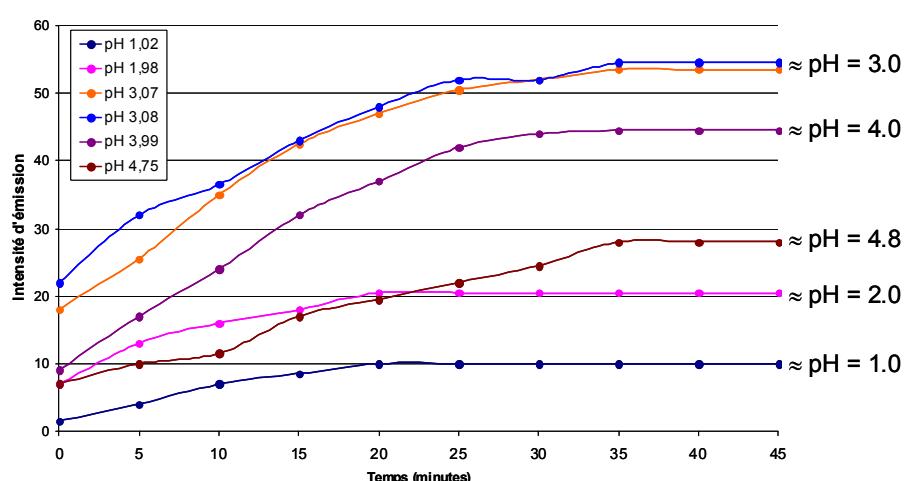


Figure 13-2. Cinétiques de fluorescence d'une solution de sulfamérazine $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ – incidence du pH

Après un temps de réaction de l'ordre de 25 minutes (dans le lait), un pH proche de 3 conduit aux valeurs maximales d'émission. La réaction de fluorescence se fait à température ambiante et à la lumière du jour.

Avant de définir les conditions de travail pour la détection des sulfamides, la concentration en fluorescamine utilisée a été testée. Des solutions à $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $2.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ont été préparées. Pour chacune de ces solutions, la cinétique de développement de la fluorescence a été calculée (**Figure 13-3**) pour la sulfaméthazine et pour la sulfadiméthoxine.

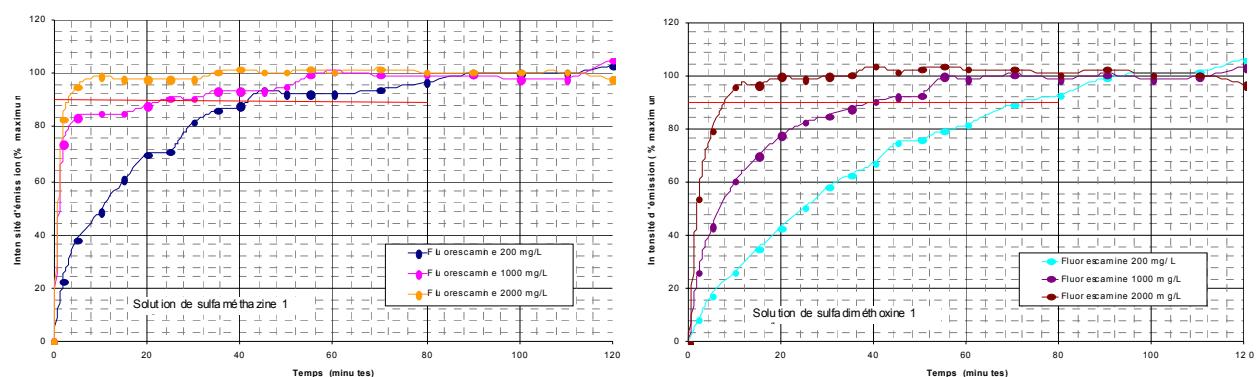


Figure 13-3. Cinétiques de fluorescence d'une solution de sulfaméthazine et d'une solution de sulfadiméthoxine ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) – incidence de la concentration en fluorescamine

Sur base des résultats obtenus pour ces deux molécules, il est aisément de conclure qu'une quantité de fluorescamine importante favorise la vitesse de développement de la fluorescence. Il apparaît aussi que cette quantité conditionne l'intensité de la réponse (**Figure 13-4**), bien qu'après une période suffisamment longue d'incubation, les différences s'estompent.

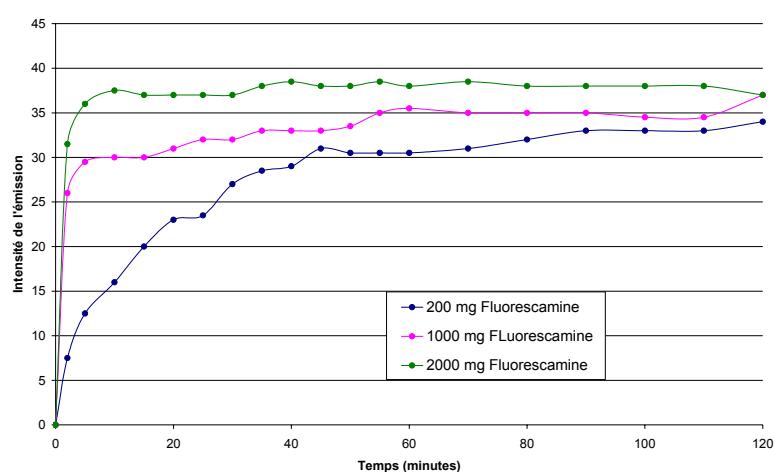


Figure 13-4. Cinétiques du développement de la fluorescence d'une solution de sulfaméthazine ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) – incidence de la concentration en fluorescamine

La nature du sulfamide présent est aussi responsable de variation dans l'intensité de la réponse (**Figure 13-5**).

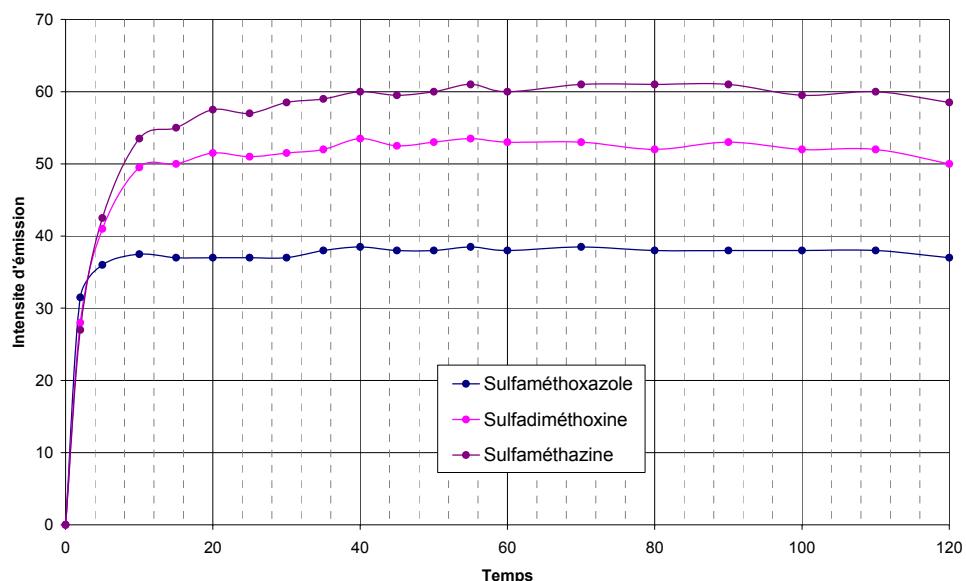


Figure 13-5. Cinétiques de fluorescence de différents sulfamides ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) – incidence de la nature du sulfamide

Il est dès lors important de trouver un compromis permettant d'être suffisant sensible (intensité de la réaction) tout en limitant le temps de manipulation nécessaire et le coût du réactif de fluorescence. La durée de la séparation des sulfamides étudiés, de l'ordre de 25 minutes, est compatible avec une incubation de 25 minutes, si la configuration HPLC ne possède pas de passeur automatique. L'injection manuelle se fait échantillon par échantillon, l'injection précédente permettant l'incubation de l'échantillon suivant. Il n'en va pas de même lorsque la configuration HPLC présente un passeur automatique. Il faut dans ce cas, se trouver dans le plateau de la cinétique de fluorescence ou programmer les réactions de manière à maintenir le même temps d'incubation avant injection.

13.4.2. Stabilité de la fluorescence obtenue

Les cinétiques de fluorescence ont été réalisées sur des concentrations en sulfamides particulièrement élevées ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), rarement rencontrées dans des échantillons de lait. Le choix de ces concentrations repose aussi sur la sensibilité du spectrofluorimètre utilisé (spectrofluorimètre Baird-Atomic, Fluoricord FP100 muni d'une lampe au xénon de 150w, cellule de verre). En effet, la lecture de l'intensité d'émission se fait sur un galvanomètre, ce qui réduit la précision de la lecture.

Il est dès lors important de réaliser une étude de l'évolution de la fluorescence à des concentrations proches de la limite maximale autorisée ($100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). De plus, lorsque le laboratoire dispose d'un système d'injection automatique, il est nécessaire de connaître l'évolution de la fluorescence une fois le maximum atteint, soit après environ 60 minutes.

Tableau 13-1. Ordre d'élution et temps de rétention des sulfamides étudiés ($100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb)

Ordre d'élution	Sulfamide	Abréviation	Temps de rétention (minutes)
1	Sulfadiazine	SDZ	9.5
2	Sulfamérazine	SMR	10.2
3	Sulfaméthazine	SMT	10.8
4	Sulfaméthizole	SMTZ	12.1
5	Sulfameter	SME	13.2
6	Sulfaméthoxazole	SMZ	18.0
7	Sulfadiméthoxine	SDMX	21.2

Deux études sont programmées, l'une dans laquelle les échantillons sont stockés à température ambiante (20°C) et l'autre au cours de laquelle les échantillons sont stockés à 4°C (température de frigo facilement applicable au niveau du passeur d'échantillons). Les échantillons étudiés sont constitués d'un mélange de 7 sulfamides (**Tableau 13-1**) à une concentration individuelle de $100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

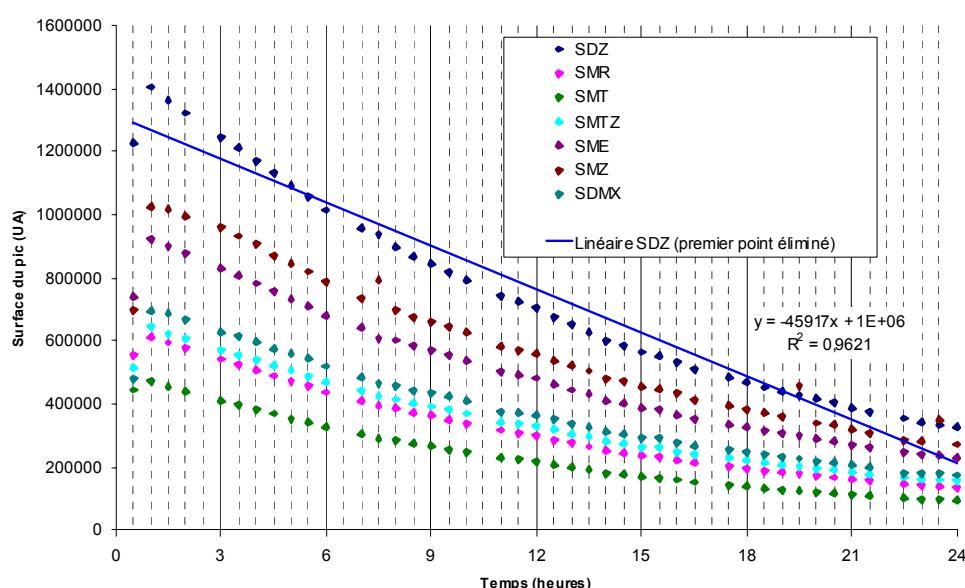


Figure 13-6. Evolution de la fluorescence des sulfamides ($100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) au cours de 24 heures à température ambiante (20°C) – enregistrements réalisés toutes les 30 minutes

Les surfaces des pics des différents sulfamides ont été mesurées au cours du temps, pendant 24 heures à température ambiante (20°C), à une cadence de mesures de toutes les demi-heures afin de retracer leur évolution (**Figure 13-6**). Les points manquants correspondent à l'analyse de référence, permettant de vérifier la dérive de l'équipement.

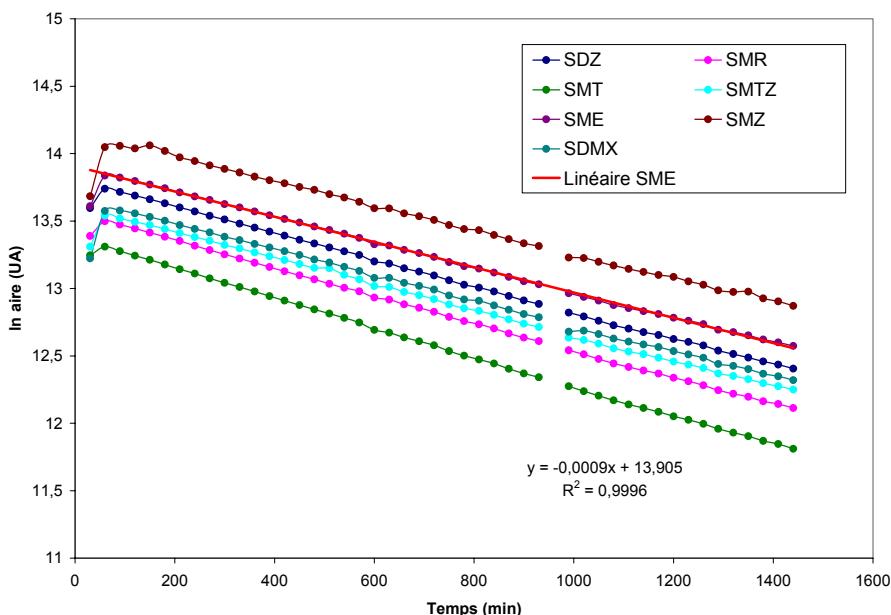


Figure 13-7. Evolution de la fluorescence des sulfamides (100 µg·L⁻¹) après transformation de la réponse du détecteur en logarithme népérien (ln) – température ambiante (20°C)

L'analyse des surfaces obtenues sur 24 heures d'essai, montre une diminution de l'intensité de la fluorescence, pour chaque sulfamide. Cette diminution varie de 73,3 % (SMZ) à 80,0 % (SMT). L'application d'un modèle de régression linéaire (le points « 30 minutes » est éliminé du modèle) ne permet pas d'obtenir une relation suffisamment satisfaisante entre les données. En effet, la droite de régression linéaire obtenue pour la sulfadiazine (SDZ) présente un R^2 de 0,9621.

La transformation de la réponse du détecteur de fluorescence en logarithme népérien (ln) permet d'obtenir une relation linéaire lors de la diminution de fluorescence du complexe sulfamide-fluorescamine (**Figure 13-7**). Si le premier point est éliminé, la qualité de la relation, exprimée par la valeur du R^2 , est excellente : $R^2=0,9996$ pour le sulfameter (SME). Si le premier point est maintenu, la valeur du R^2 passe à 0,9902. Pour les différents sulfamides étudiés, la relation présente des paramètres similaires (**Tableau 13-2**).

L'importance de la température de conservation des échantillons a été évaluée en comparant la diminution d'intensité de la fluorescence au cours du temps pour les échantillons maintenus à 4°C et à 20°C (**Figure 13-8**).

Tableau 13-2. Equations de régression linéaire et coefficients de détermination obtenus pour les sulfamides étudiés (100 µg·L⁻¹ ou ppb) – température de 20°C

Ordre d'élation	Sulfamide	Equation ^a	R ²
1	Sulfadiazine	y = -0,001x + 13,801	0,9997
2	Sulfamérazine	y = -0,001x + 13,557	0,9997
3	Sulfaméthazine	y = -0,0011x + 13,368	0,9996
4	Sulfaméthizole	y = -0,001x + 13,608	0,9994
5	Sulfameter	y = -0,0009x + 13,905	0,9996
6	Sulfaméthoxazole	y = -0,0009x + 14,151	0,9983
7	Sulfadiméthoxine	y = -0,0009x + 13,664	0,9990

^a : x = temps en minutes et y = ln(Aire du pic), l'aire étant exprimée en UA

L'analyse des résultats obtenus après 24 heures à 20°C montre une diminution moyenne de 75 % de l'intensité d'émission de fluorescence. Cette diminution, calculée à 4°C, n'est que de 22 %. Après 12 heures de stockage, les diminutions mesurées sont respectivement de 47 % à 20°C et de 8 % à 4°C. Ces résultats conduisent à imposer un stockage des échantillons à 4°C, après réaction de fluorescence. Des modifications de ces conditions de stockage peuvent être compensées par l'utilisation d'un standard interne qui, ajouté à l'échantillon, présenterait la même cinétique de dégradation du complexe fluorescent. Cette manière de procéder permet de préparer des séries d'échantillons et de bénéficier des avantages d'un passeur automatique. Attention cependant, à la perte de sensibilité liée à la diminution de fluorescence pour une même concentration.

Les cinétiques de dégradation du complexe fluorescent se présentant sous la forme d'une fonction d'ordre 1, il est dès lors possible de calculer une demi-vie pour chacun des composés (**Tableau 13-3**) sous la forme de la formule suivante, dans laquelle k est la pente de la droite de régression :

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

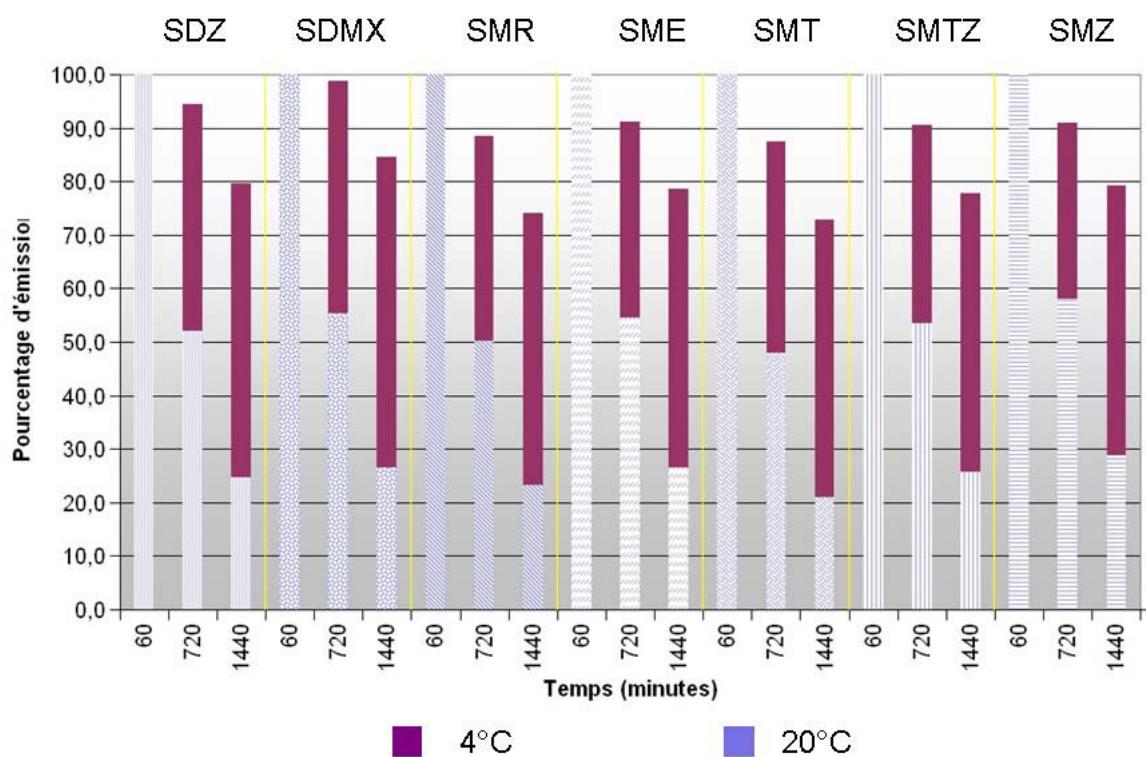


Figure 13-8. Evolution de la fluorescence des sulfamides ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) – comparaison des cinétiques de dégradation à 4°C et à 20°C

La valeur de k , pente de la droite de régression, conduit, pour la cinétique à 4°C , à des valeurs de demi-vie trop élevées pour être prises en considération. Il est dès lors nécessaire de définir un autre paramètre permettant de caractériser la cinétique de dégradation.

Tableau 13-3. Demi-vie du complexe fluorescent obtenu pour les sulfamides étudiés ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb)

Ordre d'élution	Sulfamide	$T_{1/2}$ (minutes) – 4°C	$T_{1/2}$ (minutes) – 20°C
1	Sulfadiazine	231000	693
2	Sulfamérazine	173250	693
3	Sulfaméthazine	173250	630
4	Sulfaméthizole	231000	693
5	Sulfameter	173250	770
6	Sulfaméthoxazole	231000	770
7	Sulfadiméthoxine	346500	770

Ce paramètre ($P_{12\text{heures}}$) apparaît déjà précédemment (**Figure 13-8**) puisqu'il est défini comme étant le rapport entre l'émission à 60 minutes (émission maximale) et l'émission à 12

$$P_{12\text{heures}} = \frac{S_{720}}{S_{60}} * 100$$

heures (720 minutes).

Tableau 13-4. Caractérisation du complexe fluorescent obtenu pour les sulfamides étudiés (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou ppb) – $P_{12\text{heures}}$

Ordre d'élution	Sulfamide	$P_{12\text{heures}} (\%)$ à 4°C	$P_{12\text{heures}} (\%)$ à 20°C
1	Sulfadiazine	94.5	52.1
2	Sulfamérazine	88.5	50.3
3	Sulfaméthazine	87.6	47.9
4	Sulfaméthizole	90.6	53.4
5	Sulfameter	91.2	54.6
6	Sulfaméthoxazole	91.0	58.0
7	Sulfadiméthoxine	98.8	55.3

Le paramètre $P_{12\text{heures}}$ a été calculé pour chacun des sulfamides (**Tableau 13-4**). Ces données confirment la nécessité de conserver les échantillons à basse température (4°C) après réaction de fluorescence et d'utiliser un standard interne pour compenser la perte de fluorescence enregistrée au cours de la conservation, même si cette perte est limitée à 10 % au cours des douze premières heures. Le mélange de 7 sulfamides a été utilisé pour étudier la répétabilité de la cinétique de dégradation à 20°C. Ainsi, sur base du même mélange, 5 cinétiques ont été réalisées.

Les intensités mesurées pour les différentes cinétiques montrent des variations, bien que les relations de dégradations restent identiques. Les deux sulfamides pris en exemple (**Figure 13-9**) montrent que l'ordre d'intensité de la fluorescence est respecté pour l'ensemble des 7 molécules analysées :

$$\text{Intensité}_{\text{Cin}1} < \text{Intensité}_{\text{Cin}3} < \text{Intensité}_{\text{Cin}2} < \text{Intensité}_{\text{Cin}4} < \text{Intensité}_{\text{Cin}5}$$

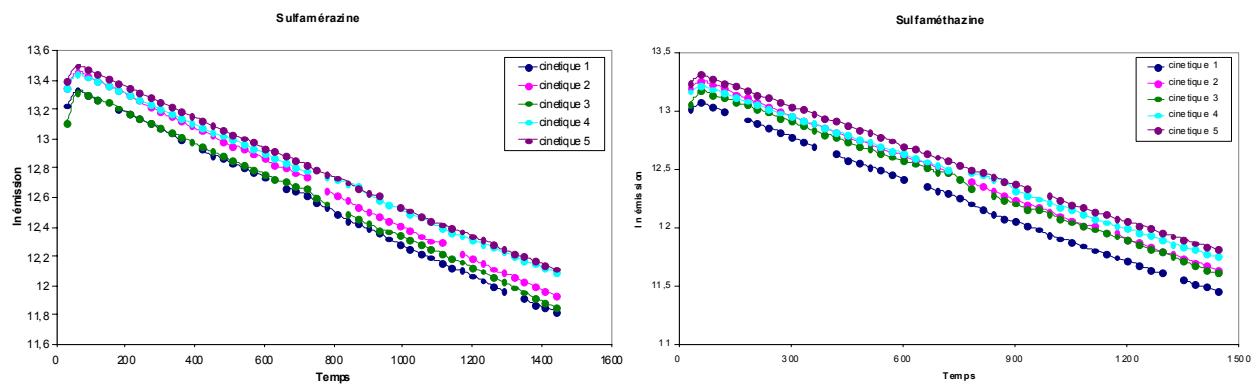


Figure 13-9. Evolution de la fluorescence des sulfamides ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) – répétabilité de la cinétique de dégradation à 20°C

Ces résultats renforcent l'intérêt de l'utilisation d'un standard interne.

13.4.3. Séparation et identification des sulfamides

La séparation et l'identification des sulfamides étudiés ont été réalisées sur le mélange utilisé pour l'étude de la stabilité de la fluorescence en conditions HPLC. Ce mélange est constitué de 7 sulfamides à la concentration individuelle de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La séparation (Figure 13-10) montre que les différents composés étudiés peuvent être séparés en un temps de 25 minutes.

Seule la paire 2-3 (sulfamérazine – sulfaméthazine) peut être considérée comme critique. En effet, pour évaluer la séparation de deux composés, un facteur de résolution R est calculé de la manière suivante :

$$R = 2 \cdot \frac{T_{R(3)} - T_{R(2)}}{\omega_3 + \omega_2}$$

dans laquelle T_R représente le temps de rétention et ω la largeur du pic à 13.5% de sa hauteur.

Le facteur de résolution R , calculé pour cette paire critique de composés, est de $R = 1,06$. Cette valeur, inférieure à $1,50$, signifie que les deux pics sont considérés comme non résolus (Rouessac et Rouessac, 2004). Cette non-résolution n'est pas limitative lors des analyses à réaliser.

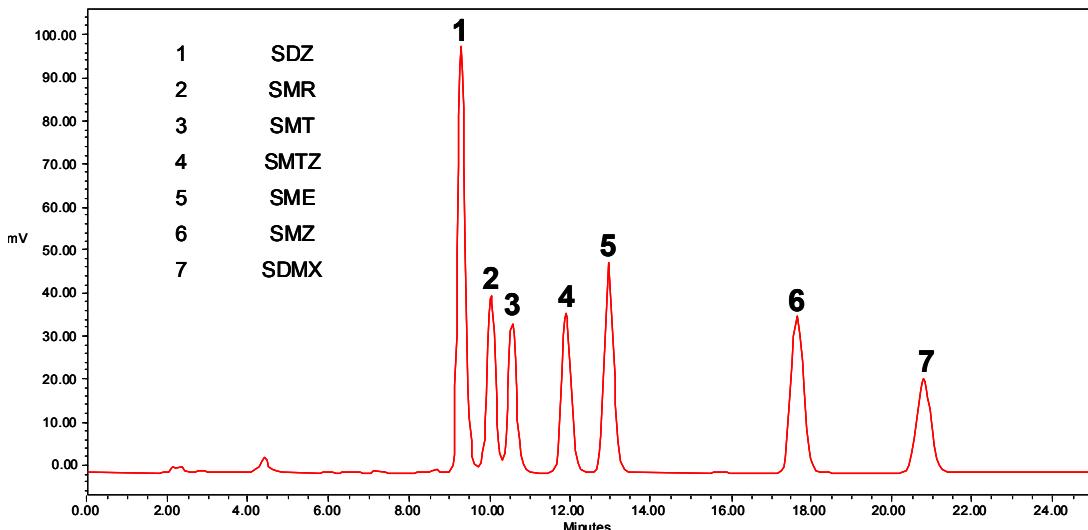


Figure 13-10. Chromatogramme de la séparation des complexes fluorescents sulfamide-fluorescamine ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm}$ – $\lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)

13.4.4. Choix du standard interne

Les études de stabilité du complexe fluorescent et l'étude de la répétabilité de la dégradation du complexe ont montré la nécessité d'utiliser un standard interne de manière à compenser ces évolutions. Le standard interne choisi doit avoir deux caractéristiques essentielles : il doit être réactif à la fluorescamine et présenter une cinétique de dégradation semblable aux cinétiques des sulfamides étudiés. De plus, il ne doit pas se retrouver comme résidus dans les matrices analysées.

Trois molécules ont ainsi été évaluées comme standard interne : le sulfatroxazole, le sulfamoxole et l'acide *p*-aminobenzoïque. La première des molécules étudiées, l'acide *p*-aminobenzoïque, a un temps de rétention de 10,9 minutes (Figure 13-11). Il élue donc dans une zone du chromatogramme où plusieurs sulfamides se trouvent, le risque de coelution ou d'interférences avec la sulfaméthazine ($T_R = 10,8$ minutes), si elle est présente dans l'échantillon, est donc bien réel.

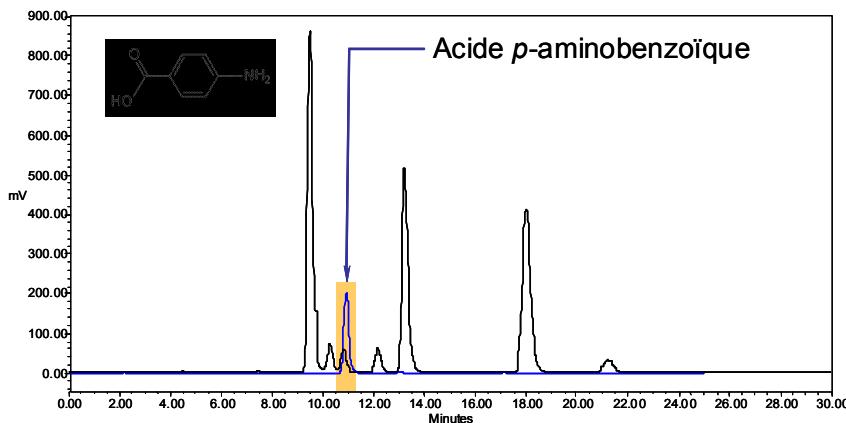


Figure 13-11. Chromatogramme de la séparation des sulfamides et de l'acide *p*-aminobenzoïque ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm} - \lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)

La seconde molécule envisagée, le sulfamoxole, élue à un temps de rétention de $T_R = 11,2$ minutes (**Figure 13-12**). Ce temps de rétention ne lui permet pas d'être parfaitement résolu de la sulfaméthazine ($T_R = 10,8$ minutes).

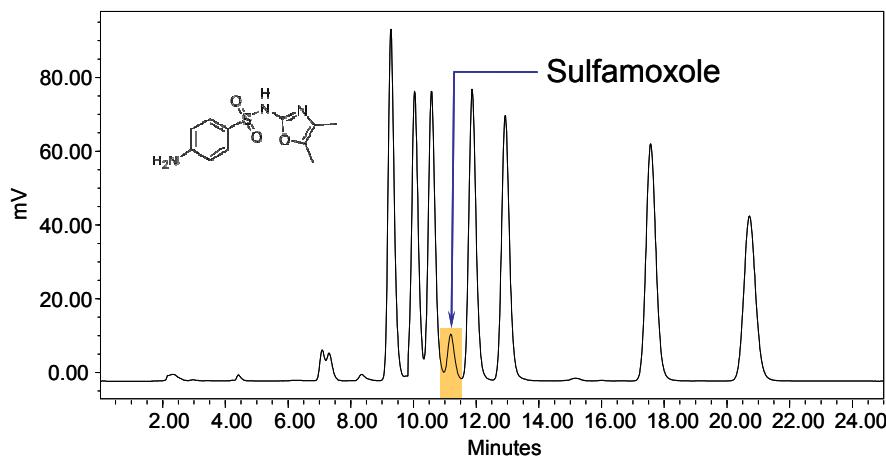


Figure 13-12. Chromatogramme de la séparation des sulfamides et du sulfamoxole ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm} - \lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)

La dernière molécule étudiée, le sulfatroxazole, présente un temps de rétention de $T_R = 19,4$ minutes, la plaçant juste entre le sulfaméthoxazole et le sulfadiméthoxine. La position du sulfatroxazole est idéale (**Figure 13-13**). Cette molécule présente les caractéristiques idéales, d'un point de vue chromatographique. De plus, au moment du développement de la méthode, elle n'était pas utilisée en élevage laitier, réduisant ainsi les risques de la retrouver dans un échantillon. Malheureusement, sa commercialisation a été interrompue par la société Roche, la rendant indisponible.

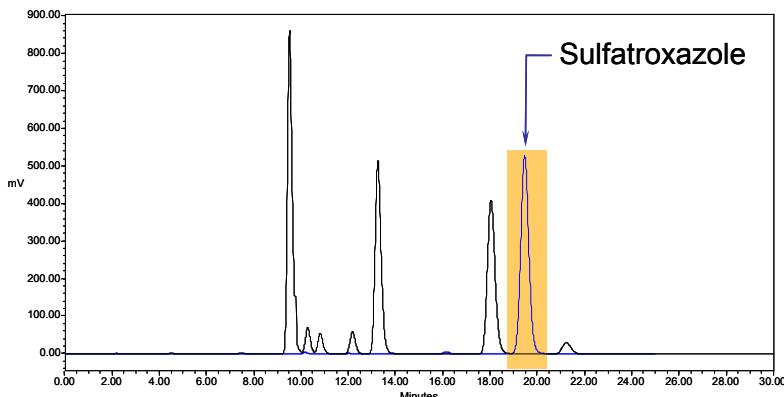


Figure 13-13. Chromatogramme de la séparation des sulfamides et du sulfatroxazole ($\lambda_{\text{excitation}} : 405 \text{ nm} - \lambda_{\text{émission}} : 495 \text{ nm}$)

13.4.5. Caractérisation de la méthode

Les paramètres utilisés pour caractériser la méthode sont de deux ordres : les limites de détection (propre à chaque molécule), ainsi que les paramètres purement chromatographiques (le facteur de résolution R , le facteur de séparation α et le facteur de rétention k').

Le facteur de résolution permet de traduire la séparation entre deux composés en chiffrant la différence entre deux pics, selon la formule :

$$R = 2 \cdot \frac{T_{R(2)} - T_{R(1)}}{\omega_2 + \omega_1}$$

dans laquelle $T_{R(i)}$ représente le temps de rétention du composé et ω_i sa hauteur à 13,4 %.

Le facteur de séparation (ou sélectivité) précise les positions relatives de deux composés adjacents sur un chromatogramme, selon la formule :

$$\alpha = \frac{T'_{R(2)}}{T'_{R(1)}}$$

dans laquelle $T'_{R(i)}$ représente le temps de rétention relatif de chacun des composés.

Il ne peut, en aucun cas, être inférieur à 1.

Le facteur de rétention (ou capacité) rend compte du potentiel de la colonne à retenir les différents composés. Dans la pratique, ce facteur ne dépassera jamais 10, pour ne pas allonger les temps de rétention des composés. Il est calculé selon la formule suivante :

$$k' = \frac{T'_R}{T_M}$$

dans laquelle T'_R représente le temps de rétention relatif du composé et T_M , le temps mort ou le temps nécessaire à l'élution d'un composé non retenu sur la colonne.

Pour réaliser cette caractérisation, deux mélanges ont été préparés et injectés en HPLC. Le premier mélange contenait les sulfamides suivants : sulfanilamide (SI), sulfadiazine, sulfacétamide, sulfaméthizole et sulfadiméthoxine. Le second contenait les sulfamides suivants : sulfanilamide (SI), sulfamérazine, sulfaméthazine, sulfamonométhoxine, sulfameter et sulfaméthoxazole. Les concentrations utilisées pour ces mélanges étaient de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour chacune des molécules et de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la sulfanilamide, utilisée comme standard interne.

La caractérisation de la méthode a été faite sur base du calcul du facteur de résolution, du facteur de séparation et du facteur de rétention (**Tableau 13-5**).

Tableau 13-5. Paramètres chromatographiques calculés pour la méthode de séparation des sulfamides développée – facteur de résolution (R), facteur de séparation (α) et facteur de rétention (k')

Sulfamide	T_R (min)	Largeur de pic 13,4 % hauteur	R	α	k'
Sulfanilamide	8,18	0,3566			2,72
Sulfadiazine	9,07	0,3788	2,62	1,13	3,08
Sulfacétamide	9,67	0,3858	1,50	1,08	3,31
Sulfamérazine	9,80	0,3750	1,52	1,04	3,45
Sulfaméthazine	10,54	0,4365	2,13	1,12	3,79
Sulfamonométhoxine	11,54	0,4275	3,07	1,10	4,16
Sulfaméthizole	11,66	0,4483	2,79	1,10	4,30
Sulfameter	12,98	0,9920	2,13	1,03	4,90
Sulfaméthoxazole	17,39	0,5826	6,38	1,14	6,90
Sulfadiméthoxine	20,47	0,7256	4,93	1,20	8,30

Le calcul du facteur de résolution R permet d'affirmer qu'il n'y a pas de paires critiques, dans les conditions chromatographiques définies pour l'évaluation de la méthode.

Le second paramètre, destiné à caractériser la méthode, consiste à calculer les limites de détection propres à chacune des molécules. La droite de calibrage est calculée directement pour des concentrations en sulfamides, les standards utilisés étant préparés directement dans le lait. Cette droite comprend 7 points ($0 - 10 - 25 - 50 - 100 - 150$ et $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Elle couvre ainsi la LMR propre à chacune des molécules ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les limites de détection et de quantification ont été calculée pour chaque sulfamide étudié (**Tableau 13-6**). Pour 2 sulfamides, la limite de

quantification n'est égale qu'à 0,2*LMR (sulfaméthazine et sulfadiméthoxine). Pour les autres molécules, la limite de détection est excellente.

Tableau 13-6. Limites de détection calculées pour les différents sulfamides étudiés

Sulfamide	T_R (min)	Limite de détection ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Limite de quantification ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Sulfadiazine	9,07	4	10
Sulfacétamide	9,67	2	5
Sulfamérazine	9,80	2	5
Sulfaméthazine	10,54	6	20
Sulfamonométhoxine	11,54	≈ 1	< 5
Sulfaméthizole	11,66	≈ 1	< 5
Sulfameter	12,98	≈ 1	< 5
Sulfaméthoxazole	17,39	4	10
Sulfadiméthoxine	20,47	7	20

13.4.6. Analyse d'échantillons

13.4.6.1. Cinétique d'élimination de sulfamides

La méthode développée a été appliquée pour suivre l'élimination de sulfamides après traitement thérapeutique. Ainsi, deux situations particulières vont illustrer ce suivi.

Tableau 13-7. Suivi de la cinétique d'élimination de la sulfaméthazine dans le lait après traitement intra-utérin – mise en situation

Paramètre	
Pathologie	Métrite
Nombre de vaches traitées	4
Traitement appliqué (vaches 1 et 2)	1 * 75 mL Sulfaphénicol® en intra-utérin
Traitement appliqué (vaches 3 et 4)	2 * 75 mL Sulfaphénicol® en intra-utérin (6 jours d'intervalle)
Dose recommandée	30 à 50 mL dans l'utérus
Composition	par mL : 100 mg de sulfadimidine (ou sulfaméthazine) et 5 mg de chloramphénicol
Délai d'attente	aucune indication (Claessens P., 1993)

Dans un premier cas, le lait provenant de 4 vaches traitées au Sulfaphénicol® pour métrite est analysé (**Tableau 13-7**).

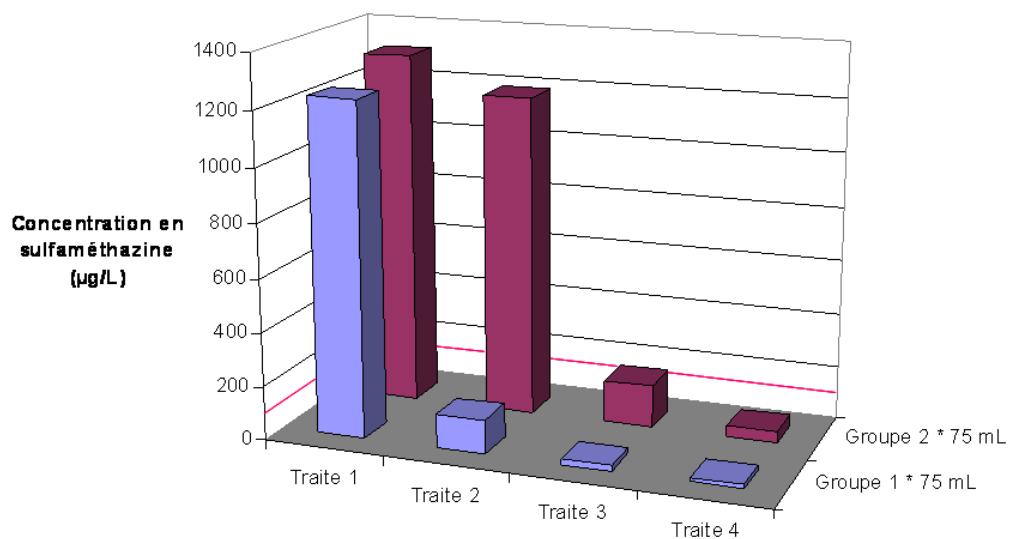


Figure 13-14. Cinétique d'élimination de la sulfaméthazine après traitement intra-utérin au Sulfaphénicol®

Un échantillon de lait, représentatif des quatre quartiers du pis, a été prélevé pendant 10 traites après la dernière application du traitement. Ces échantillons de lait ont été analysés par méthodes microbiologique et chromatographique, selon le protocole développé ci-dessus.

Tableau 13-8. Suivi de la cinétique d'élimination différents sulfamides dans le lait après traitement par injection intra-veineuse – mise en situation

Paramètre		
Pathologie		Métrite
Nombre de vaches traitées		1
Traitement appliqué		150 cc de Tétramidan® i.v. 30 cc Terramycine 100® i.v.
Dose recommandée (Tetramidan®)		0,25 mL par kg de poids vif
Composition (par mL)	Sulfathiazolum natr. 100 mg – Sulfadimidinium natr. 80 mg – Sulfamerazinum natr. 80 mg – Sulfadiazinum natr. 40 mg	
Délai d'attente	3 jours (Claessens P., 1993)	

Les résultats obtenus (Figure 13-14), montrent que la teneur en sulfaméthazine à la première traite après le traitement est particulièrement élevée : pour les deux vaches ayant reçu une application de Sulfaphénicol®, la concentration est de l'ordre de $1200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et pour les deux vaches ayant reçu les deux applications, elle est de l'ordre de $1300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Pour ces deux dernières vaches, la concentration à la seconde traite est de l'ordre de $1200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Il faut par ailleurs attendre la quatrième traite pour que la teneur en sulfaméthazine passe sous le seuil des $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LMR de ce groupe de molécules.

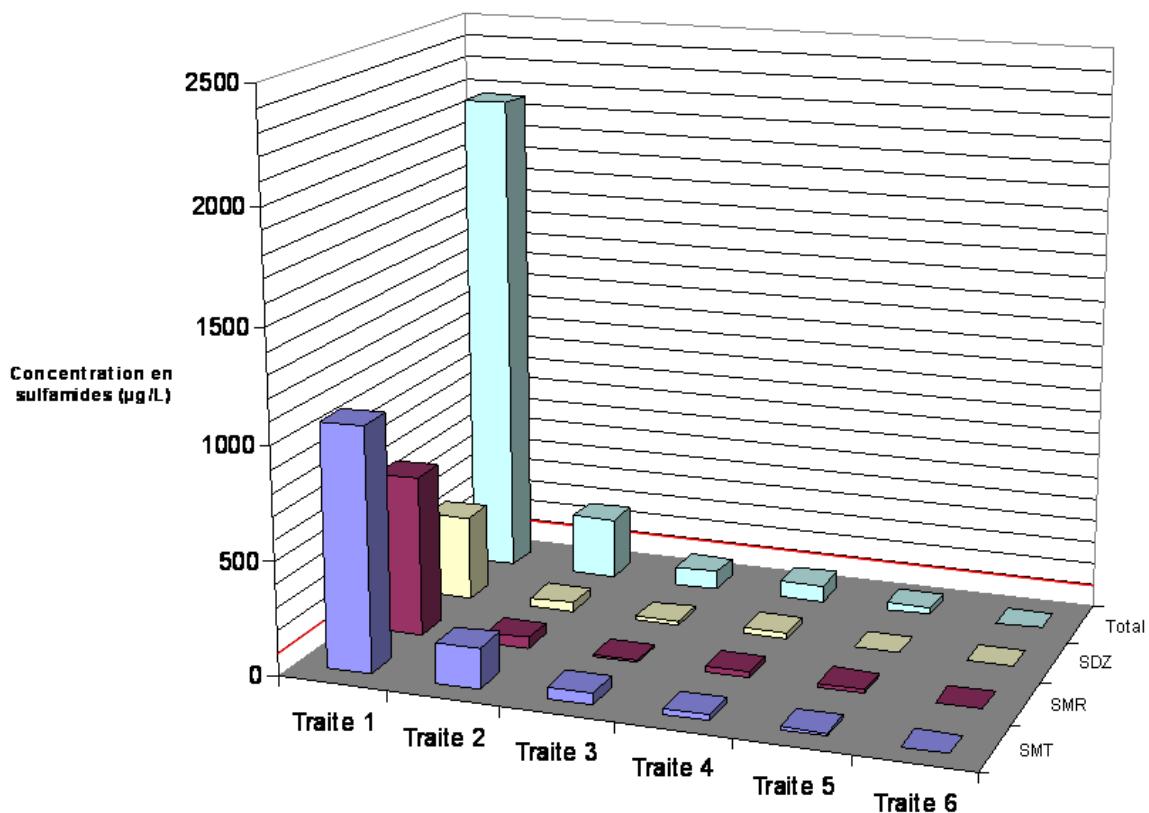


Figure 13-15. Cinétique d'élimination de sulfamides après traitement intra-veineux au Tétramidan®

Les concentrations mesurées dans les laits collectés après l'application du traitement montrent qu'une quinzaine de vaches sont nécessaires, à côté de chaque vache traitée, pour ramener la teneur en sulfaméthazine sous le seuil de la limite autorisée (LMR). Dans le cas étudié, l'étable doit compter une soixantaine de vaches pour éviter un dépassement. Ces données sont en contradiction avec les prescriptions de la notice du médicament, puisque celle-ci ne préconise aucun délai d'attente.

Dans le second cas, le lait provenant d'une vache traitée au moyen de Tetramidan® pour métrite est analysé (**Tableau 13-8**).

Un échantillon de lait, représentatif des quatre quartiers du pis, a été prélevé pendant 10 traites après l'application du traitement, conduisant au calcul d'une cinétique d'élimination (**Figure 13-15**).

Les concentrations mesurées dans les laits collectés après l'application du traitement montrent des teneurs en sulfamides particulièrement élevées lors de la première traite : globalement, pour les trois molécules dosées, un total de plus de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ est mesuré. Ce total chute à environ $300 \mu\text{g L}^{-1}$ lors de la seconde traite. A partir de la troisième traite, les teneurs mesurées sont inférieures à la limite autorisée ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ par molécule et pour le groupe des sulfamides), la sixième traite ne présentant pas de traces pour les trois sulfamides dosés. Il faudrait inclure dans la méthode le quatrième sulfamide présent dans le médicament pour avoir une vue complète de la cinétique d'élimination.

Dans ce cas, le délai d'attente préconisé est respecté, si le quatrième sulfamide présente le même type de cinétique que les trois premiers, à savoir une maximum d'élimination lors de la première traite et une chute rapide des teneurs mesurées à partir de la seconde traite.

13.4.6.2. Confirmation de résultats positifs aux tests de screening

L'outil analytique développé a été utilisé pour confirmer des résultats positifs lors de tests de screening. Ces tests de screening consistaient en une épreuve microbiologique, dont la sensibilité aux sulfamides a été augmentée, ou en tests ELISA, ces derniers étant spécifiques de la sulfaméthazine. La mise en évidence du groupe des sulfamides a pu se faire par le biais de « receptor-tests ».

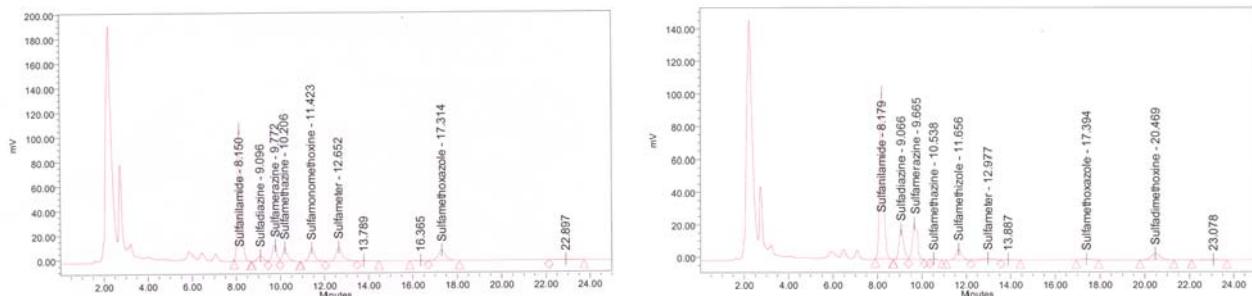


Figure 13-16. Illustrations de la séparation des sulfamides pour des échantillons provenant de la filière laitière - chromatogrammes

Les chromatogrammes obtenus sur des échantillons de la filière (Figure 13-16) permettent d'illustrer la séparation des sulfamides sur échantillons réels.

La présence de sulfamides a été confirmée dans 13 échantillons positifs aux tests de screening « Sulfamides » (Tableau 13-9). L'analyse de ces résultats montrent qu'aucun des échantillons, bien qu'ayant donné un résultat positif au screening, ne dépasse la LMR ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ par molécule ou pour le groupe de sulfamides). Les trois échantillons de lait de camion (1 à 3) présentent des traces de résidus, non quantifiables. Les échantillons provenant des laits de ferme

présentent des traces qui peuvent se révéler importantes (échantillon 10 : 58 µg·L⁻¹ – échantillon 12 : 53 µg·L⁻¹).

Tableau 13-9. Confirmation de la présence et dosage des sulfamides (µg·L⁻¹) présents dans des échantillons positifs aux tests de screening « Sulfamides »

	Sulfadiazine	Sulfacétamide	Sulfamérazine	Sulfaméthazine	Sulfamonométhoxine	Sulfaméthizole	Sulfamer	Sulfaméthoxazole	Sulfadiméthoxine
LOQ (µg·L ⁻¹)	10	5	5	20	< 5	< 5	< 5	10	20
LOD (µg·L ⁻¹)	4	2	2	6	≈1	≈1	≈1	4	7
Camions	1 ^d	< LOD ^a	n.d. ^b	< LOD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	< LOD	n.d.	< LOD	< LOD	n.d.	< LOD	n.d.	< LOD
	3	< LOD	n.d.	< LOD	< LOD	n.d.	< LOD	n.d.	< LOD
Lait de ferme	4	11	n.d.	n.d.	7 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	5	10	n.d.	n.d.	11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	6	12	n.d.	n.d.	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	7	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	8	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	9	16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6	n.d.	n.d.
	10	58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	11	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	n.d.	n.d.
	12	34	n.d.	12	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	13	12	n.d.	11	< LOD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a : présence d'un pic mais non quantifiable

^b : absence de pic

^c : présence d'un pic quantifiable dont l'intégration conduit à une concentration comprise entre la LOD et la LOQ

^d : lait de camion – les autres échantillons sont des laits de ferme

La sulfadiazine apparaît comme étant le sulfamide majoritaire dans les échantillons analysés. Il est cependant difficile d'établir une conclusion à partir de ces quelques résultats. En effet, il s'agit d'échantillons sélectionnés dans un contexte de monitoring et ayant donné un résultat positif à l'un des tests de screening et pour lesquels le groupe des sulfamides a été mis en évidence par l'analyse des groupes présents. Cette façon de faire réduit l'information initiale par une succession de filtres sélectifs : si le premier test présente une sensibilité moindre à l'un ou

l'autre groupe de molécules, il est normal que ces dernières ne soient plus décelées lors des dernières analyses, généralement physico-chimiques. La conclusion selon laquelle ce groupe de molécules n'est pas utilisé à la ferme devient donc caduque.

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'élimination des sulfamides dans le lait confortent cependant les résultats obtenus sur les laits de la filière : sur les vaches traitées, les concentrations individuelles mesurées dépassaient largement la limite de $100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, et donc, en fonction de la taille de l'étable, étaient aisément ramenées sous le seuil limite.

Dès lors, une question s'impose de nouveau : est-il logique d'utiliser les mêmes limites (LMR) tout au long de la filière, sans tenir compte de ces facteurs de dilution ?

13.5. Conclusions

La volonté de contrôler le respect de la législation en matière de LMR et le souhait de relier les résultats positifs des tests de screening à la présence effective de molécules à action antibiotique imposent le développement de méthodes analytiques performantes. Dans ce contexte, un outil alliant la séparation chromatographique et la spécificité de la réaction de fluorescence entre la fluorescamine et une amine primaire a été utilisé pour détecter, identifier et quantifier une dizaine de sulfamides dans le lait. La méthode développée, simple dans la préparation des échantillons, permet de séparer dix sulfamides, dont un ayant fonction de standard interne, en un temps d'analyse de 25 minutes. Les limites de quantification obtenues sur ces dix molécules varient entre <5 et $20 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ce qui permet de couvrir correctement la LMR des sulfamides ($100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

L'utilisation du standard interne compense la perte de fluorescence mesurée au cours de 24 heures de stockage des échantillons. Cette perte est acceptable (de l'ordre de 20 %) si les échantillons sont stockés à 4°C . Elle devient nettement plus importante (de l'ordre de 70 %) si le stockage se fait à température ambiante. Le choix d'un HPLC équipé d'un passeur d'échantillons thermostaté permet de programmer l'analyse de séries d'échantillons sans perte de sensibilité.

L'analyse d'échantillons de lait provenant d'animaux traités au moyen de sulfamides a montré que certaines notices présentaient des lacunes en matière de temps d'attente. Ainsi, des teneurs en sulfamides très élevées (de l'ordre de 10 fois la LMR) ont pu être mesurées dans les premières traites suivant l'application du Sulfaphénicol® alors que sa notice ne prévoyait pas de temps d'attente avant livraison du lait. Par contre, les mesures réalisées après l'application de Tétramidan® indiquent que le délai prévu dans la notice respecte la LMR.

L'analyse de d'échantillons de la filière (camions et laits de ferme) ayant donné une réponse positive à l'un ou l'autre test de screening ayant identifié la présence de sulfamides a permis de détecter différents sulfamides dont le plus important semble être la sulfadiazine. Il est cependant difficile de transposer ces résultats directement à la ferme et de conclure à l'utilisation prépondérante de médicament à base de sulfadiazine.

CHAPITRE 14 : SUIVI DU MÉTABOLISME DE *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* VAR. *CALIDOLACTIS* PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

14.1. Introduction

La nécessité de disposer d'un outil de quantification du métabolisme autre que le pH ou la teneur en germes du milieu nous a conduit à nous tourner vers la chromatographie liquide. En effet, un des outils analytiques développés repose sur le dosage de l'acide lactique, le constituant majeur produit lors du métabolisme de la souche test, dont la présence dans le milieu acidifie la gélose et permet le virage de l'indicateur de pH.

Les données recueillies en HPLC pourront ensuite être transférées vers la spectrométrie infra rouge, limitant ainsi les manipulations.

14.2. Objectifs

Les essais développés dans ce chapitre vont mettre en évidence l'évolution d'un chromatogramme obtenu à partir du milieu de croissance de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* après une période d'incubation conduisant au développement de la souche dans le milieu. Les pics d'intérêt, présentant une évolution exploitable (modification en l'absence de résidus inhibiteurs et statu quo en présence de ces mêmes résidus) seront identifiés dans la mesure du possible.

L'activité antibactérienne de différentes molécules sera aussi évaluée et l'impact sur le métabolisme identifié.

14.3. Matériel et méthode

14.3.1. Mise en évidence du métabolisme

Pour mettre en évidence le métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, un fermenteur (**Figure 14-1**) contenant le milieu de culture additionné de lait estensemencé au moyen de spores.

L'évolution de la composition du milieu est suivie au cours du temps par l'analyse HPLC d'un échantillon prélevé toutes les 15 minutes pendant 3 heures, un dernier échantillon étant prélevé après 24 heures d'incubation. Afin de vérifier la stabilité du milieu avantensemencement, le suivi est réalisé de la même manière avant inoculation (un échantillon prélevé toutes les 15 minutes pendant 3 heures et analyse HPLC).

Le milieu contenu dans le fermenteur présente la composition suivante :

- 400 mL de milieu liquide (2,5 g d'extrait de levure – 5,0 g de tryptone – 1,0 g de glucose, portés à 1 litre dans de l'eau distillée)
- 200 mL de lait

Le fermenteur, préalablement thermostaté à 64°C, est mis sous agitation.

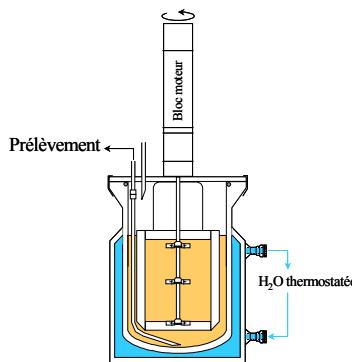


Figure 14-1. Schéma du fermenteur

Après 3 heures, 8 mL d'une suspension de spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* sont ajoutées dans le fermenteur.

Les échantillons sont préparés, en double, selon le point au point 14.3.2. Méthode Macro – préparation des échantillons en vue de leur injection en HPLC (14.3.4. Conditions chromatographiques).

14.3.2 Méthode Macro – préparation des échantillons

Les échantillons sont déprotéinés par ajout de réactifs de Carrez.

14.3.2.1. Réactifs

Solution de Carrez 1 : solution de K₄Fe(CN)₆.3H₂O à 3,88 % (p/v)

Solution de Carrez 2 : solution de ZnSO₄.7H₂O à 7,2 % (p/v)

Eau osmosée (système Elix 10 – Millipore)

Eau ultrapure (système MilliQ - Millipore)

14.3.2.2. Protocole

Peser précisément 5,0000 g d'échantillon (ou 5 mL de la solution standard) dans un tube pour centrifugeuse

Ajouter 7,5 mL de la solution de Carrez 1
Ajouter 7,5 mL de la solution de Carrez 2
Centrifuger le mélange 10 minutes à 4.000 g
Filtrer dans la fiole HPLC sur filtre 0,45 µm
Stocker les échantillons prêts à être analysés à 4°C

14.3.3. Méthode Micro – préparation des échantillons

14.3.3.1. Réactifs

Les réactifs utilisés dans cette méthode Micro sont identiques à ceux décrits pour la méthode Macro (point 14.3.2.1).

14.3.3.2. Protocole

Peser précisément 250 µg d'échantillon dans une cupule Ependorf
Ajouter 375 µl de la solution de Carrez 1
Ajouter 375 µl de la solution de Carrez 2
Centrifuger le mélange 10 minutes à 4.000 g
Filtrer dans la fiole HPLC sur filtre 0,45 µm (un insert est placé dans la fiole pour réduire le volume utile à 300 µl)
Stocker les échantillons prêts à être analysés à 4°C

14.3.4. Conditions chromatographiques

Chaîne HPLC Alliance – Waters 2690
Détecteur UV – diode array – Waters 996
Traitement des données (spectres ou chromatogrammes) : logiciel Millenium
Phase mobile : H₂SO₄ 0,01 N – Débit : 0,7 mL/minute
Volume d'injection : 20 µl
Colonne : Bio-Rad HPX-87H (300 * 7,8 mm) munie d'une pré-colonne Bio-Rad (40 * 4,6 mm) cation-H
Température de la colonne : 60°C

14.3.5. Identification des pics d'intérêt

Pour quantifier le métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, différents composés susceptibles de se retrouver dans les schémas métaboliques vont être injectés en HPLC afin d'identifier les constituants responsables des modifications de la composition du milieu après incubation et métabolisme des spores. Aux produits du métabolisme seront ajoutés les constituants importants du milieu comme les sucres.

Les composants du milieu analysés sont :

- du lactose à $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- du glucose à 1 g/L et $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- de l'extrait de levure à $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- de la tryptone à $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Les réactifs de Carrez sont également été analysés car ils entrent dans la composition de l'extrait injecté en chromatographie.

Parmi les produits du métabolisme analysables, quatre acides organiques ont été suivis. Il s'agit des acides acétique, orotique, hippurique et lactique. D'autres acides ont été injectés (acides oxalique, citrique, malique, succinique et formique) afin de vérifier si leur présence pouvait être décelée dans le milieu après incubation.

14.3.6. Suivi du métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* en microplaques

Cette manipulation a pour but de vérifier si *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* présente le même métabolisme en microplaques qu'en fermenteur. Le suivi portera sur le milieu seul, le milieu additionné de lait, le milieu additionné de spores et le milieu additionné de lait et de spores.

Tableau 14-1. Composition des mélanges en vue du suivi du métabolisme en microplaques

	Milieu liquide (mL)	Lait (mL)	Spores (mL)
	2,5 g d'extrait de levure – 5,0 g de tryptone – 1,0 g de glucose Dissoudre ces composés dans 1 litre d'eau distillée	Lait entier UHT	$6 \cdot 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$
ML	120	-	-
ML + L	80	40	-
ML + S	80	-	1,6
ML + L + S	80	40	1,6

Les différents mélanges sont préparés (**Tableau 14-1**) et répartis en microplaques (**Figure 14-2**) (300 µL par puits).

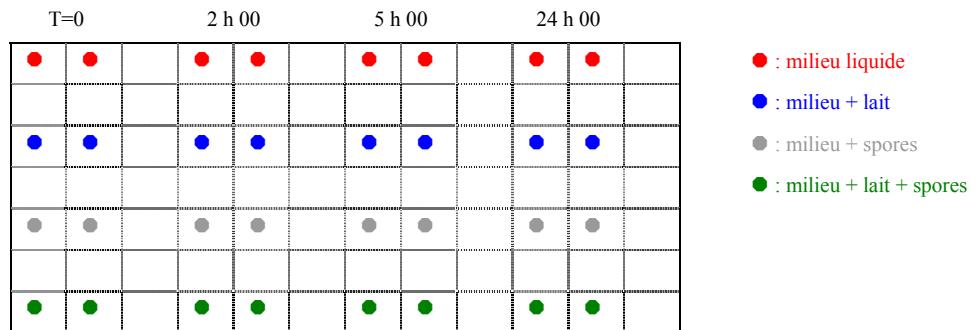


Figure 14-2. Schéma expérimental pour évaluer l'activité de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* en microplaques

La préparation des échantillons (en double) se fait sur un volume de 250 µL selon le protocole décrit au point 14.3.3. Méthode Micro – préparation des échantillons en vue de leur injection en HPLC (14.3.4. Conditions chromatographiques).

14.3.7. Mise en évidence, en microplaques, de l'activité antibactérienne de certains antibiotiques sur *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*

Cette manipulation a pour but de vérifier l'activité antibactérienne (bactéricide ou bactériostatique) de certains composés antibiotiques sur *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*. Le suivi analytique portera sur différents échantillons (**Tableau 14-2**).

Tableau 14-2. Composition des mélanges en vue du suivi de l'activité antibactérienne de différents composés antibiotiques

	Milieu liquide (mL)	Lait (mL) ^a	Spores (mL)
	2,5 g d'extrait de levure – 5,0 g de tryptone – 1,0 g de glucose Dissoudre ces composés dans 1 litre d'eau distillée	Lait entier UHT	6·10 ⁶ UFC·mL ⁻¹
Blanco milieu	80	40	-
Echantillons « Lait »	80	40	1,6

^a : le lait utilisé est composé de lait UHT pour le blanco, de laits dopés respectivement à 3 ppb de pénicilline, à 60 ppb de cloxacilline, à 100 ppb de sulfadiazine et à 250 ppb d'oxytétracycline

Les échantillons sont répartis sur la microplaques (**Figure 14-3**) et mis à incuber à 64°C. La préparation des échantillons (en double) se fait sur un volume de 250 µL selon le protocole décrit au point 14.3.3. Méthode Micro – préparation des échantillons en vue de leur injection en HPLC (14.3.4. Conditions chromatographiques).

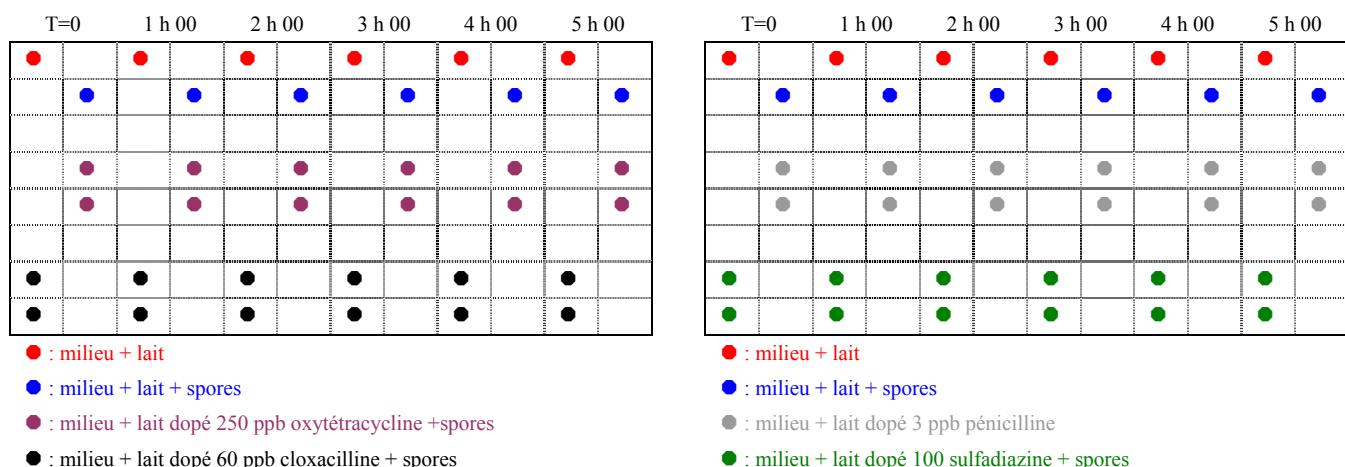


Figure 14-3. Schéma expérimental pour évaluer, en microplaques, l'activité antibactérienne de 4 antibiotiques sur *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*

14.3.8. Détermination de la limite de détection pour différents antibiotiques rencontrés sur le terrain (pénicilline, cloxacilline, sulfadiazine, oxytétracycline, tylosine, dihydrostreptomycine)

Cette manipulation a pour but de déterminer la limite de détection pour quelques antibiotiques utilisés en thérapeutique vétérinaire (**Tableau 14-3**), sur *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*. Le suivi analytique se fait sur 24 heures, avec une fréquence de prélèvement plus intense durant les trois premières heures.

Tableau 14-3. Antibiotiques étudiés et concentrations testées

Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentrations étudiées ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Pénicilline G	4	0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5
Cloxacilline	30	10 – 20 – 30 – 40 – 50 – 60 – 70
Sulfadiazine	100	50 – 75 – 100 – 125 – 150 – 175 – 200
Sulfadiazine	100	200 – 250 – 300 – 350 – 400 – 450 – 500
Oxytétracycline	100	100 – 150 – 200 – 250 – 300 – 350 – 400
Tylosine	50	15 – 20 – 25 – 30 – 35 – 40 – 45
Tylosine	50	40 – 50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100
Dihydrostreptomycine	200	750 – 850 – 900 – 1.000 – 1.100 – 1.150 – 1.600

Les échantillons sont prélevés des microplaques après différents temps d'incubation. Le premier prélèvement correspond au temps $T = 0$ et représente le chromatogramme initial. Pendant l'incubation, un prélèvement est effectué toutes les 30 minutes entre $T = 1$ heure et $T = 5$ heures. Un dernier prélèvement est fait après 24 heures d'incubation. Cela représente pour chaque concentration d'antibiotiques, 11 échantillons à analyser.

Pour préparer les différents échantillons dopés, par antibiotique, 80 mL de milieu liquide (**Tableau 14-2**) sont préparés et inoculés avec 1,6 mL de spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*. Ce milieu est réparti dans 8 flacons de 10 mL (1 blanco + 7 dilutions). A chacun de ces flacons sont ajoutés 5 mL de lait dopé à la concentration testée. L'échantillon obtenu est alors réparti en microplaques (300 μ L par puits). Pour chaque concentration, douze puits sont remplis de manière à obtenir une cinétique aux temps de prélèvement suivants (minutes) : 0 – 60 – 90 – 120 – 150 – 180 – 210 – 240 – 270 – 300 et 1.440 (24 heures).

Après chaque période d'incubation, les échantillons correspondants sont analysés selon le protocole décrit au 12.3.1. Méthode Macro – préparation des échantillons.

14.4. Résultats

14.4.1. Mise en évidence du métabolisme

Le milieu contenant les éléments nutritifs et le lait ne présente aucune évolution au cours des trois heures à 64°C (**Figure 14-4 A**). Par contre, l'ajout de spores conduit, après les trois premières heures d'incubation à l'apparition d'un pic majoritaire à $T_R = 10,9$ minutes (**Figure 14-4 B**).

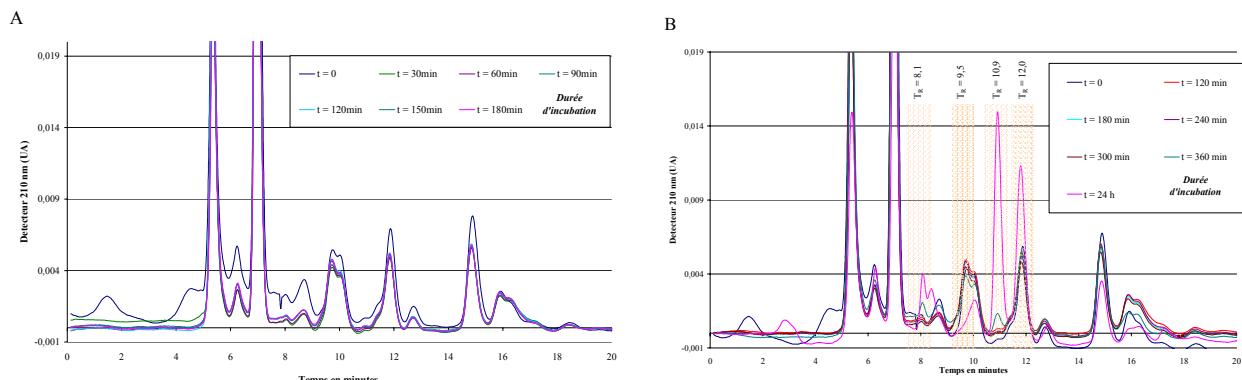


Figure 14-4. Évolution du milieu de culture en l'absence (A : incubation 3 heures sans spores) et en présence de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* (B : incubation pendant 24 heures après l'ajout de spores)

D'autres modifications (apparition de pics à $T_R = 8,1$ minutes, $T_R = 12,0$ minutes et disparition d'un pic à $T_R = 9,5$ min) viennent renforcer, après 24 heures d'incubation, cette première modification (**Figure 14-4 B**).

14.4.2. Identification des pics d'intérêt

Il est nécessaire de définir les composés susceptibles de modifier le profil chromatographique du milieu au cours de l'incubation.

L'injection successive des acides organiques susceptibles de se trouver dans les voies métaboliques a conduit à l'identification de l'acide lactique comme principal composant résultant du métabolisme des spores (Fig. 14-5 A).

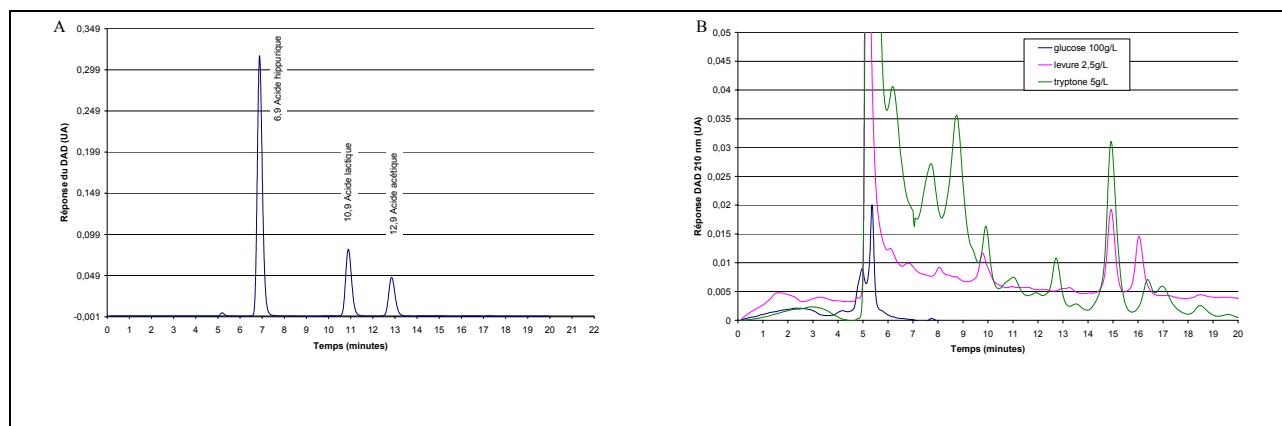


Figure 14-5. Identification des pics d'intérêt (A : mélange d'acides – B : constituants du milieu)

Aucun des constituants du milieu ne présente des pics correspondant aux pics d'intérêt (Figure 14-5 B), c'est-à-dire aux pics présentant une évolution consécutive au métabolisme de la souche.. Le suivi analytique de l'évolution du milieu suite au métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* sera basé essentiellement sur la production d'acide lactique, principal métabolite.

14.4.3. Suivi du métabolisme de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* en microplaques

Comme pour le suivi en fermenteur, le milieu additionné de lait, sans spores, ne présente aucune évolution au cours du temps.

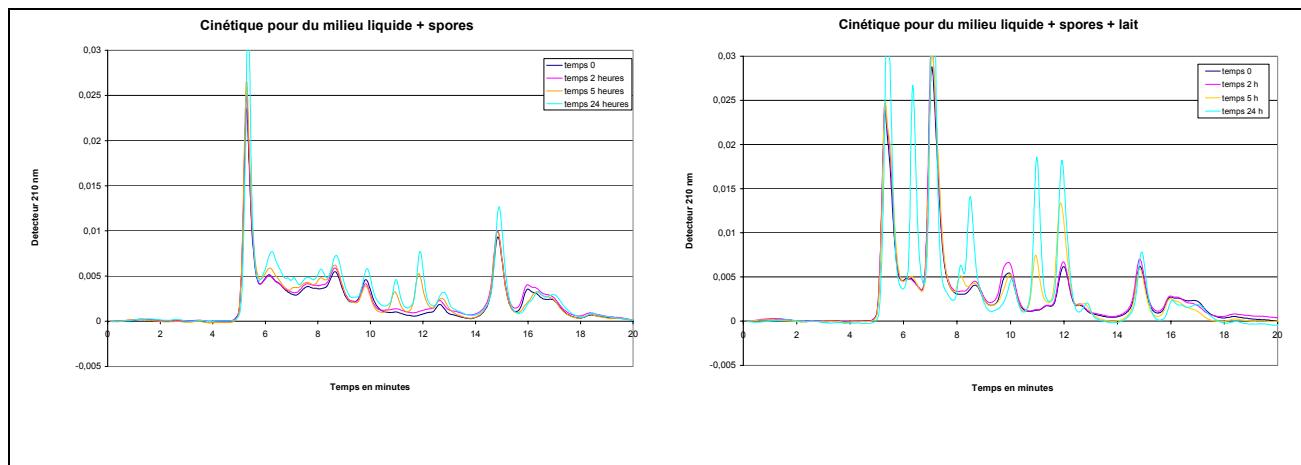


Figure 14-6. Cinétique de la croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* en microplaques (A : milieu liquide et spores – B : milieu liquide, lait et spores)

Les variations observées lorsque les spores sont ajoutées au milieu seul (Fig. 14-6 A) ou au milieu en présence de lait (Figure 14-6 B) sont similaires à celles observées en grand volume, dans le fermenteur. L'acide lactique est le principal composé résultant du métabolisme de la souche utilisée. Il sera considéré comme indicateur de la croissance de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*.

La présence de lait dans le milieu conduit à des variations nettement plus importantes que lors de l'incubation du milieu liquide seul.

14.4.4. Mise en évidence, en microplaques, de l'activité antibactérienne de certains antibiotiques sur *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*

Lors de ces essais, les 4 antibiotiques étudiés sont les molécules utilisées dans le schéma officiel de détermination de la qualité du lait, en vue de son paiement : pénicilline G ($3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), cloxacilline ($60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sulfadiazine ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et oxytétracycline ($250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Une cinétique a pu être tracée pour chacune des molécules sur une période de 5 heures d'incubation et a été comparée à la cinétique obtenue pour un lait exempt de substance inhibitrice (blanco).

L'indicateur principal du métabolisme reste l'acide lactique produit par la souche lors de sa croissance. Cette production peut cependant être relativement faible ou difficile à visualiser sur les chromatogrammes. Aussi, pour mieux mettre en évidence le métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, différentes zones chromatographiques, présentant des variations positives ont été intégrée dans le calcul d'un indicateur. Ces variations correspondent aux pics éluant aux temps de rétention suivants (environ) : 8 minutes – 10,9 minutes (acide

lactique) et 11,9 minutes. Un dernier pic, restant stable au cours du temps, est utilisé pour standardiser les réponses. Il s'agit du composé éluant à 14,9 minutes.

L'indicateur M est calculé selon l'équation 5

$$M = \frac{A + B + C}{D} \cdot 100$$

Équation 5

dans laquelle A, B, C et D représentent les hauteurs respectives des différents pics utilisés dans le calcul (**Figure 14-7**).

Cette formule de calcul pourrait être étendue à d'autres pics à variation positive (par exemple, le pic à $T_R = 12,8$ minutes) en employant l'équation 6 :

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{H_{\text{Standardisation}}} \cdot 100$$

Équation 6

Il est dès lors possible de suivre l'évolution de cet indicateur au cours du temps et en présence des molécules possédant des propriétés antibactériennes.

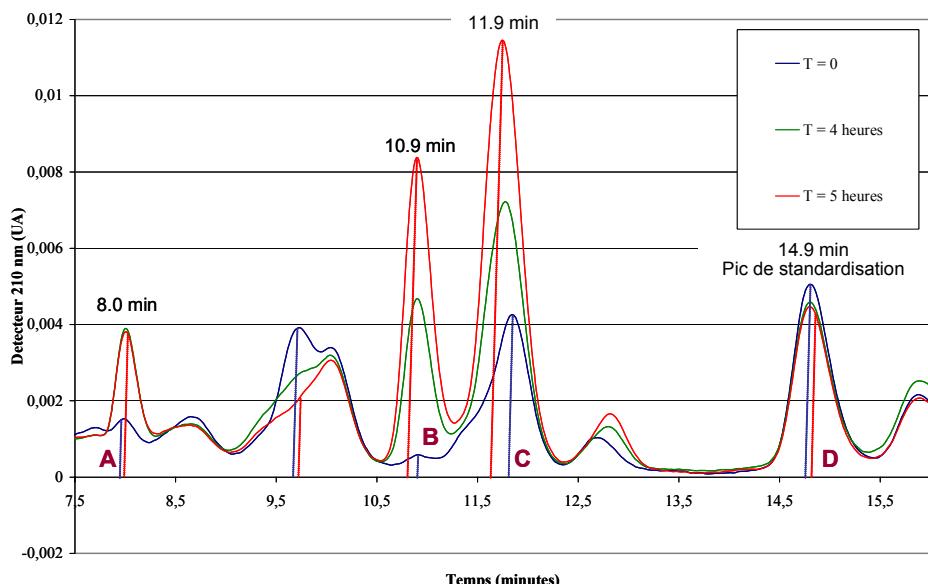


Figure 14-7. Indicateur du métabolisme M – paramètres de calcul

L'application de cette notion est illustrée (**Figure 14-8**), dans laquelle sont comparées les évolutions de l'indicateur de métabolisme M pour le milieu (milieu liquide additionné de lait) et pour le milieu ensemencé avec les spores de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*.

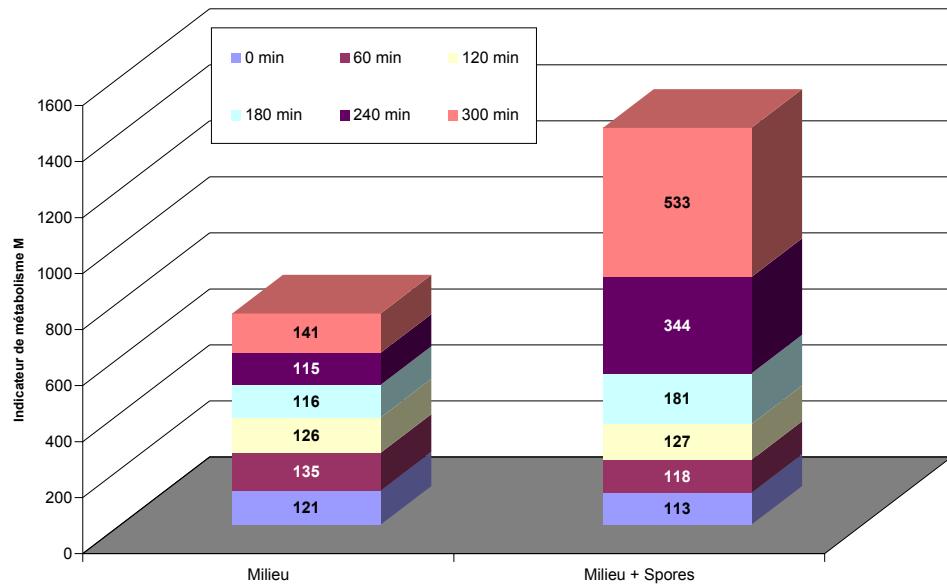


Figure 14-8. Evolution de l'indicateur de métabolisme M au cours du temps : milieu liquide additionné de lait et milieu liquide ensemencé, additionné de lait

La valeur de M reste constante au cours des 5 heures d'incubation pour le milieu non ensemencé alors que, pour le milieu ensemencé, elle augmente sensiblement à partir de 3 heures d'incubation.

Le calcul de l'indicateur M pour les échantillons de lait dopé (pénicilline G $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ – cloxacilline $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ – sulfadiazine $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ – oxytétracycline $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) permet de suivre l'activité de ces molécules (**Figure 14-9**).

L'utilisation de l'indicateur de métabolisme M ne permet cependant pas de connaître le composé responsable de l'évolution. La synthèse de l'activité antibactérienne des antibiotiques, en fonction de l'évolution des différents pics suivis (**Tableau 14-4**) montre qu'il faut attendre 3 heures avant de visualiser l'apparition des modifications dans le chromatogramme en l'absence de substance inhibitrice.

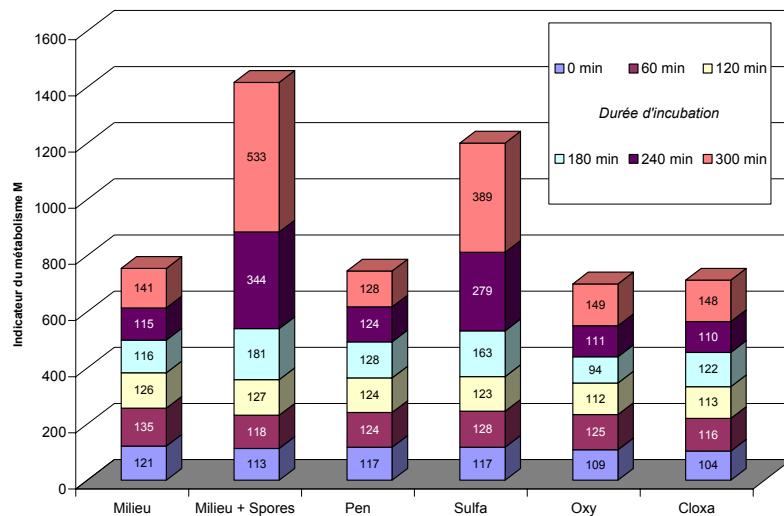


Figure 14-9. Activité antibactérienne de la pénicilline G ($3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), de la cloxacilline ($60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), de la sulfadiazine ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) et de l'oxytétracycline ($250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) sur *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* en microplaqué – Indicateur de métabolisme M

La pénicilline G présente une action bactéricide à une concentration de $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En effet, aucune modification chromatographique n'est apparue au cours de l'incubation. Pour la cloxacilline, la concentration de $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ conduit à l'apparition d'un très léger pic d'acide lactique après 5 heures d'incubation. L'oxytétracycline à une concentration de $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ permet la production de ce même acide après 5 heures d'incubation, tout en constatant l'apparition simultanée du pic à $T_R = 8$ minutes. L'activité antibactérienne de la sulfadiazine n'est pas mise en évidence pour une concentration de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ puisque la cinétique est identique à la cinétique obtenue pour le blanco.

Tableau 14-4. Synthèse de l'activité des antibiotiques sur le métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* en microplaques

Temps d'incubation (minutes)	0	60	120	180	240	300
Pic $T_R = 8$ min (croissance)	-	-	-	B – S	B – S	B – S – O
Pic $T_R = 9$ min (décroissance)	-	-	-	-	B	B – S
Pic $T_R = 10,9$ min (apparition – croissance) – acide lactique	-	-	-	B – S	B – S	B – S – C – O
Pic $T_R = 11,9$ min (croissance)	-	-	-	B – S	B – S	B – S

14.4.5. Détermination de la limite de détection pour différents antibiotiques rencontrés sur le terrain (pénicilline, cloxacilline, sulfadiazine, oxytétracycline, tylosine, dihydrostreptomycine)

Une limite de détection analytique, directement basée sur une modification de la composition du milieu, traduite dans une modification du chromatogramme, peut être déterminée pour chacune des molécules étudiées. Cette limite correspond à la concentration la plus basse pour laquelle aucune modification du chromatogramme n'est visualisée. Si la notion d'indicateur de métabolisme M est utilisée, tel que défini au point 14.4.4., la limite correspond à la concentration la plus basse pour laquelle l'indicateur M reste constant.

Après 5 heures d'incubation, la croissance de la souche n'est pas inhibée par des concentrations en pénicilline G allant jusqu'à $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Par contre, aucune trace d'acide lactique, principal métabolite produit lors de la croissance de la souche n'est décelée pour des concentrations en pénicilline G supérieures ou égale à $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. L'indicateur ne présente aucune variation pour les concentrations supérieures à $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour toutes les durées d'incubation (**Figure 14-10**).

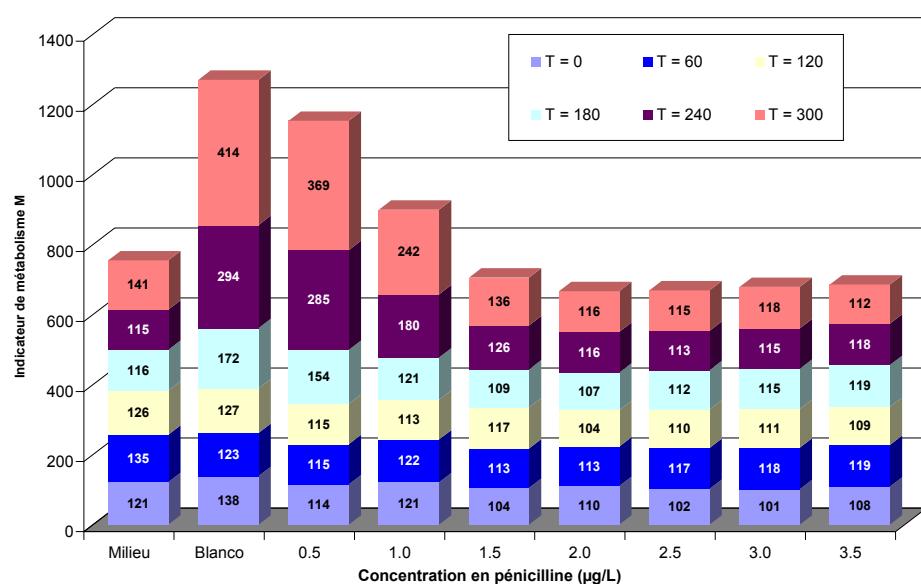


Figure 14-10. Limite de détection de la pénicilline G – indicateur de métabolisme M

La limite de détection calculée, soit $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, conforte le résultat obtenu avec le standard utilisé dans le cadre de la détermination de la qualité du lait en vue de son paiement (Pénicilline G : $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) : inhibition totale de la souche après 5 heures d'incubation.

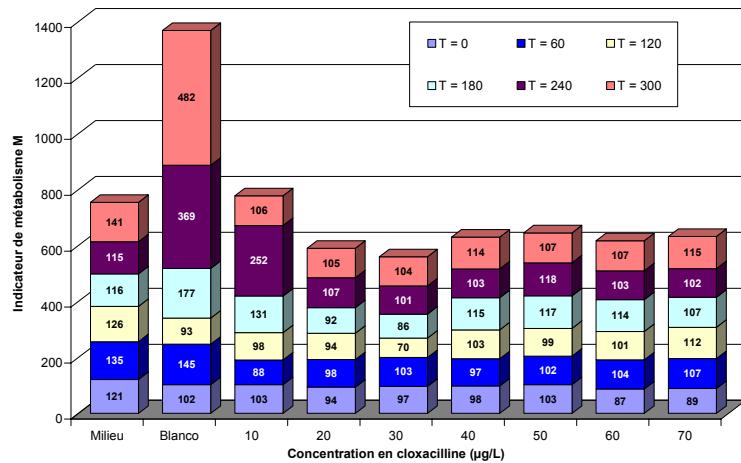


Figure 14-11. Limite de détection de la cloxacilline – indicateur de métabolisme M

Le standard à $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloxacilline présente, après 5 heures d’incubation, une légère augmentation de l’indicateur M (**Figure 14-11**). L’analyse du résultat des différentes concentrations préparées (10 à $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) montre que la concentration de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ est la limite de détection de la cloxacilline (**Figure 14-11**). En effet, pour cette concentration et toutes les concentrations supérieures, après 5 heures d’incubation, aucune trace d’acide lactique n’est décelée.

Au bout de 3 heures d’incubation, l’analyse du milieu de culture, en présence de sulfadiazine à une concentration de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, permettait de mettre en évidence la présence d’acide lactique.

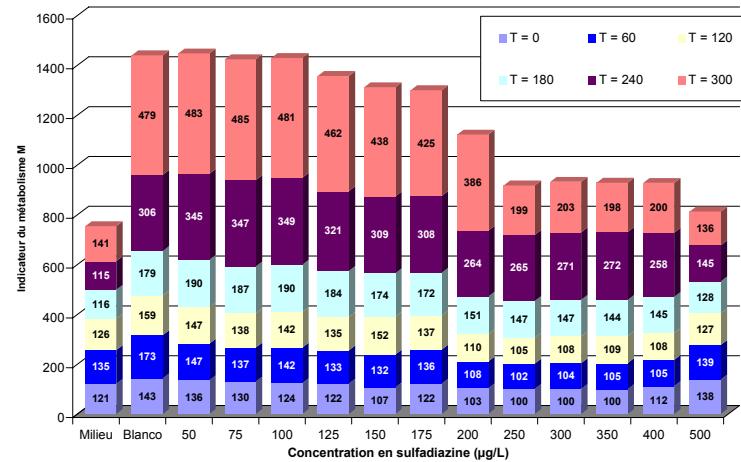


Figure 14-12. Limite de détection de la sulfadiazine – indicateur de métabolisme M

L’analyse des échantillons correspondant aux différentes concentrations analysées (50 à $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) permet de mettre en évidence le inhibiteur de la sulfadiazine. En effet, pour les

concentrations inférieures à $125 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, aucun effet inhibiteur n'est visible, l'indicateur de métabolisme M étant identique pour les trois concentrations testées et pour le blanco. Pour les concentrations allant de $125 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $250 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, l'indice de métabolisme montre un ralentissement de la croissance de la souche. Ce ralentissement est difficilement quantifiable si on se limite à la seule analyse de l'acide lactique. Les concentrations de $250 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $500 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ montrent un métabolisme presque inhibé, l'indice de métabolisme M étant identiques pour toutes les concentrations. A la concentration de $500 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, dans les conditions mises en œuvre, la sulfadiazine inhibe la souche de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* (**Figure 14-12**).

Bien que présentant un indice de métabolisme M supérieur à l'indice de métabolisme du milieu, les échantillons contenant de l'oxytétracycline à des teneurs inférieures à $300 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ montrent un ralentissement dans la croissance de la souche. En effet, l'indice de métabolisme est largement inférieur à celui du blanco (**Figure 14-13**). Pour ces concentrations, après 5 heures d'incubation, le pic d'acide lactique apparaît dans le chromatogramme, ainsi que le pic à $T_R = 8$ minutes. Par contre, pour les concentrations de $300 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $400 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, aucune trace d'acide lactique n'est décelée après 5 heures d'incubation. La concentration de $400 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ correspond à la limite de détection car l'indice M ne présente plus de variation par rapport à l'indice M_{Milieu} .

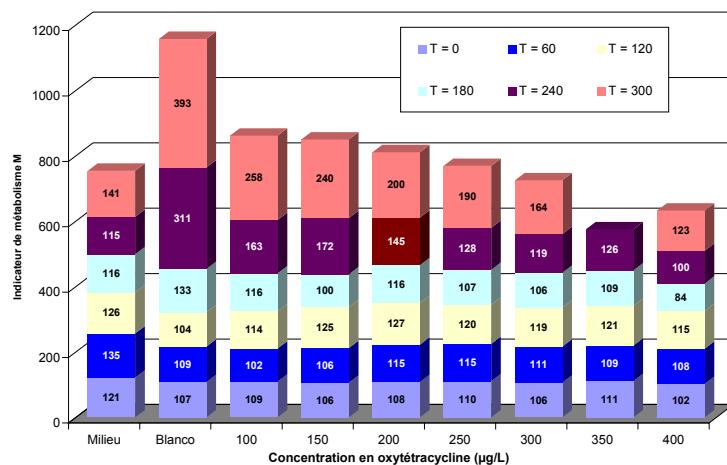


Figure 14-13. Limite de détection de l'oxytétracycline – Indice du métabolisme M

Le caractère bactériostatique de l'oxytétracycline est bien identifié, le métabolisme de la souche de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* étant rétabli après les 24 heures d'incubation.

La limite de détection de la tylosine s'est avérée difficile à définir (**Figure 14-14**).

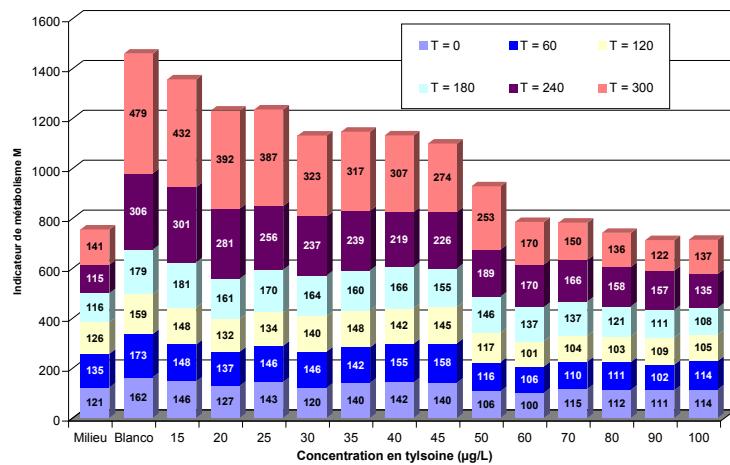


Figure 14-14. Limite de détection de la tylosine – Indice de métabolisme M

En effet, le calcul de l'indice M présente quatre zones. La première zone reprend la concentration de $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ qui n'apparaît affecter le métabolisme de la souche, bien que l'indice M soit légèrement inférieur à celui du blanco. La seconde zone correspond à un palier (entre $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pour lequel les différentes concentrations en tylosine n'inhibe pas totalement la souche mais la ralentissent fortement. Les concentrations de $45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ montrent une augmentation de l'inhibition (zone 3) pour aboutir à une inhibition totale (zone 4) pour les concentrations égale ou supérieures à $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. On peut donc assimiler la limite à une concentration de $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

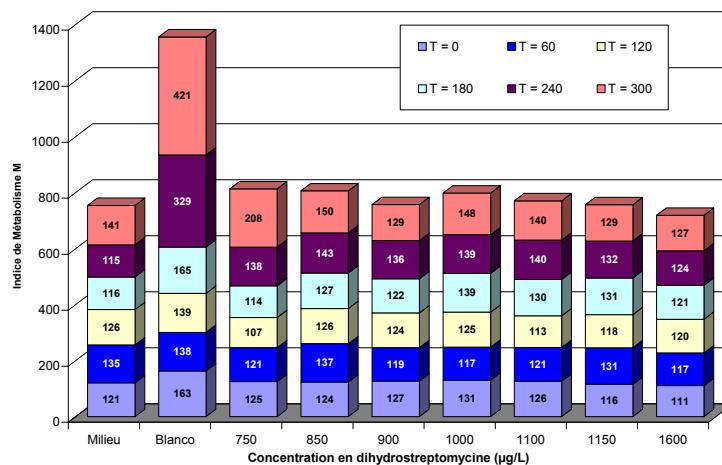


Figure 14-15. Limite de détection de la dihydrostreptomycine – Indicateur de métabolisme M

La dihydrostreptomycine, dernière molécule à être analysée, inhibe *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* à une concentration de $850 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et aux concentrations supérieures (Figure 14-15).

La concentration de $750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ montre une légère inhibition de la souche utilisée comme micro-organisme test (indice de métabolisme M inférieur à M_{Blanco} mais supérieur à M_{Milieu}). Les concentrations supérieures conduisent à un indice de métabolisme équivalent à celui du milieu.

14.5. Conclusions

Dans les conditions opératoires données, le milieu ne présente pas d'évolution lorsqu'il est placé dans les conditions d'incubation du test (64°C pendant 3 heures).

Le principal indicateur du métabolisme reste l'acide lactique, résultant de la fermentation du glucose présent dans le milieu par *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. D'autres modifications du chromatogramme pourraient être utilisées comme indicateurs, mais pour quantifier le métabolisme, leur identification est nécessaire.

L'activité antibactérienne de plusieurs antibiotiques a pu être mise en évidence en définissant une limite de détection pour plusieurs d'entre eux. C'est ainsi que le suivi analytique du milieu de culture, conduit, après 5 heures d'incubation, aux limites suivantes :

- Pénicilline G : $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Cloxacilline : $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Oxytétracycline : $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Sulfadiazine : $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Tylosine : $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Dihydrostreptomycine : $750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Pour la pénicilline et la cloxacilline, la limite est inférieure à la LMR, ce qui peut se résoudre analysant un échantillon de lait après dilution. Par contre, pour les autres molécules, la limite de détection est supérieure aux LMR. Pour résoudre ce problème, il faudrait, par exemple, diminuer la quantité de souche présente dans le milieu ou, pour augmenter la sensibilité du test à la sulfadiazine, incorporer une quantité de triméthoprime, afin d'abaisser la limite de détection.

CHAPITRE 15 : CARACTÉRISATION DU MÉTABOLISME DE *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* VAR. *CALIDOLACTIS* PAR SPECTROMÉTRIE DANS LE MOYEN INFRA-ROUGE

15.1. Introduction

Les manipulations visant à mettre en évidence la production d'acide lactique restent particulièrement lourdes en terme de travail analytique (méthode HPLC développée et décrite au chapitre 14 « Développement d'outils analytiques pour l'identification et le dosage de composés indicateurs du métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* »). Celles destinées à montrer la croissance de la souche par un comptage microbien, si elles permettent la mise en évidence de la cinétique de la croissance, laissent apparaître leurs limites en terme d'intéférences physiques (Chapitre 1 « Mise au point d'une méthode de comptage rapide de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* ») : la présence de composés insolubles conduit à un blocage de l'équipement destiné à l'analyse.

Le suivi de produits fermentés lors de leur préparation (yoghourt, notamment) par spectrométrie dans le moyen infra-rouge (Van Reusel *et al.*, 1996) laisse à penser que cette même technologie serait applicable au métabolisme mis en œuvre dans la détection des substances à activité antimicrobienne (dont les antibiotiques).

15.2. Objectif

L'objectif majeur de ces essais réside dans l'évaluation du potentiel de la spectrométrie dans le moyen infra-rouge de suivre le métabolisme de *Gsc* en absence et en présence de molécules à activité antibactérienne. Ce suivi, notamment par le suivi de la production d'acide lactique, devrait permettre la détection de ces molécules à une limite se rapprochant de la LMR, en un temps bien déterminé.

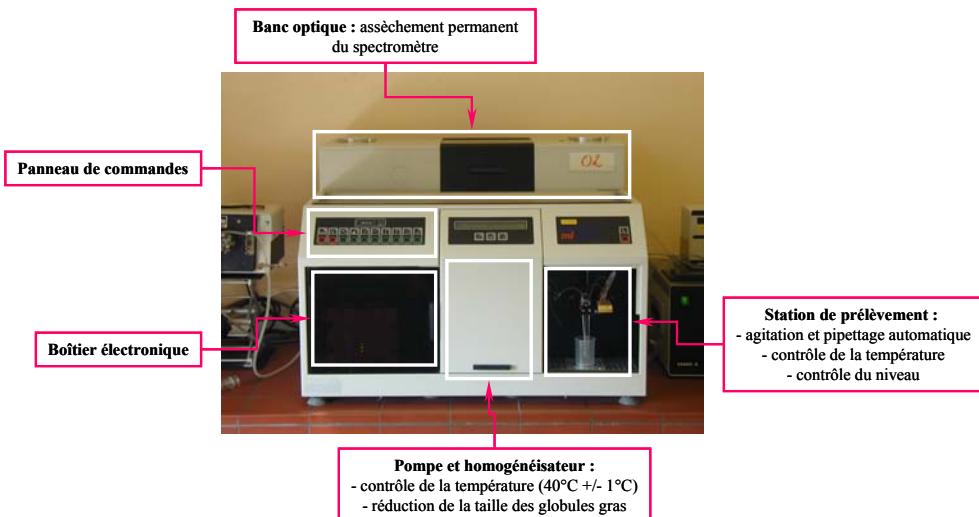
Les résultats spectraux obtenus seront mis en relation avec les résultats analytiques (comptage bactérien, pH, dosage de l'acide lactique produit par la souche) afin d'expliquer certaines évolutions spectrales.

15.3. Matériel et méthode

15.3.1. Equipement utilisé

Le suivi du métabolisme de *Gsc* dans la spectrométrie moyen infra-rouge se fait au moyen d'un Anadis AEGYS Mi 200 (**Figure 15-1**) initialement prévu pour les analyses de composition

du lait. Il s'agit d'un spectromètre moyen infra-rouge à transformée de Fourier, équipé d'une



cellule de transmission ou d'une cellule de réflexion.

Figure 15-1. Appareil Anadis AEGYS Mi 200

Les échantillons, d'un volume de l'ordre de 50 mL, sont mis à incuber à 64°C +/- 1°C en bain marie. Après cette incubation, ils sont amenés à une température de 42°C +/- 1°C. Il s'agit de la température d'homogénéisation et d'injection des échantillons dans le spectromètre. Avant d'être thermostatés à cette température, les échantillons sont refroidis par passage dans un bain d'eau glacée (environ 1°C) pour ralentir fortement le métabolisme de la souche. La température de 40°C, si elle ne correspond pas à une température d'inhibition de la souche (l'optimum de température se situe aux alentours de 55°C pour la forme active), permet cependant de ralentir son métabolisme pendant la période de mesure.



Figure 15-2. Cellule de pompage de l'Anadis AEGYS Mi 200

Après thermostatation, les échantillons sont placés dans la cellule de prélèvement en vue de leur analyse (**Figure 15-2**). Une sonde thermique, couplée à l'aiguille de prélèvement, permet

le contrôle de chaque échantillon et de le refuser si sa température n'est pas comprise dans l'intervalle 37°C – 43°C. Pendant l'homogénéisation de l'échantillon, une première mesure est réalisée sur de l'eau (tank de réserve). Cette mesure constitue la référence. Ensuite, l'échantillon est prélevé : une aspiration permet de rincer la cellule de mesure (**Figure 15-3**) avant la mesure proprement-dite.

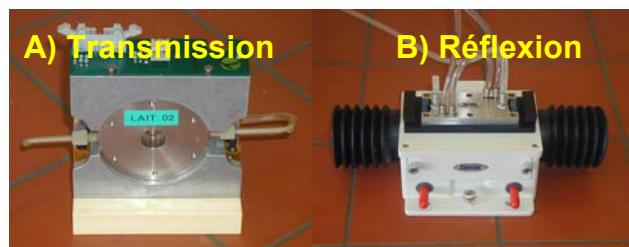


Figure 15-3. Cellules de l'Anadis AEGYS Mi 200

15.3.2. Milieux et réactifs

15.3.2.1. Bouillon ElPcGl (Extrait de levure – peptone de caséine – glucose)

Dans une bouteille SCHOTT de 200 mL, peser

- 0,50 g de peptone de caséine.
- 0,25 g d'extrait de levure.
- 0,10 g de glucose.

Ajouter 100 mL d'eau osmosée et mélanger pour dissoudre.

Stériliser le milieu à 121 °C pendant 15 minutes à l'autoclave.

Refroidir à température ambiante et conserver au réfrigérateur.

15.3.2.2. Bouillon ElPcLc (Extrait de levure – peptone de caséine – lactose » - bouillon ElPcLc)

Dans une bouteille SCHOTT de 200 mL, peser

- 0,50 g de peptone de caséine.
- 0,25 g d'extrait de levure.
- 0,10 g de lactose.

Ajouter 100 mL d'eau osmosée et mélanger pour dissoudre la poudre.

Stériliser le milieu à 121 °C pendant 15 minutes à l'autoclave.

Refroidir à température ambiante et conserver au réfrigérateur.

15.3.2.3. Solution de lactose

- Dans une bouteille SCHOTT stérilisée, peser 5 g de lactose et ajouter 100 mL d'eau osmosée stérile.
- Agiter et passer au bain à ultrasons.

15.3.2.4. Solution de carbonate de calcium

- Dans une bouteille SCHOTT stérilisée, peser 12,5 g de carbonate de calcium et ajouter 100 mL d'eau osmosée stérile.
- Agiter pour dissoudre.

15.4. Résultats

15.4.1. Détermination des conditions de préparation des échantillons pour analyse à l'Anadis AEGYS Mi 200 : stabilisation de la température de l'échantillon

La température des échantillons, pour l'analyse au spectromètre Anadis AEGYS Mi 200, doit être comprise dans l'intervalle 37°C – 43°C. Cela implique donc que les échantillons, incubés à 64°C pour permettre la levée de la dormance de la souche bactérienne, doivent être ramenés à la température d'analyse le plus rapidement possible, afin de réduire le métabolisme de la souche pendant la période d'attente avant l'analyse et pendant l'analyse proprement-dite (42,3°C). Afin de déterminer le meilleur protocole de refroidissement, cinq flacons contenant le milieu réactionnel ont été placés en étuve à 65°C pendant 1 heure. Ils ont ensuite été refroidis dans un bain d'eau glacée pendant 1 ou 2 minutes et ensuite placés dans un bain thermostaté à 42,3°C (**Tableau 15-1**).

Tableau 15-1. Temps de passage dans les deux bains (eau glacée et eau à 42,3°C)

Flacon	Temps de passage dans le bain d'eau glacée	Temps de passage dans le bain à 42,3°C
1	2 min	10 min
2	2 min	4 min
3	2 min	1 min 30
4	1 min 30	1 min 30
5	1 min 30	1 min 30

Les enregistrements des températures mesurées au sein de chaque échantillon à partir du moment où ils sont placés dans le bain d'eau glacée (**Figure 15-4**) montrent que les différentes

conditions de thermostatisation permettent à la température des échantillons de revenir plus ou moins rapidement dans l'intervalle 37°C – 43°C. Cependant, les conditions 1, 2 et 3 (passage de 2 minutes dans le bain d'eau glacée) montrent un refroidissement jusqu'à presque 30°C. De plus, après 8 minutes de stabilisation à 42,3 °C, la température de ces échantillons est toujours proche de 40°C. Il est donc encore nécessaire de les chauffer pour les amener à la température de mesure (42,3°C). Les conditions 4 et 5 (1,30 minute dans le bain d'eau glacée et 1,30 minutes dans le bain à 42,3°C) sont donc les conditions retenues pour la thermostatisation des échantillons avant leur analyse.

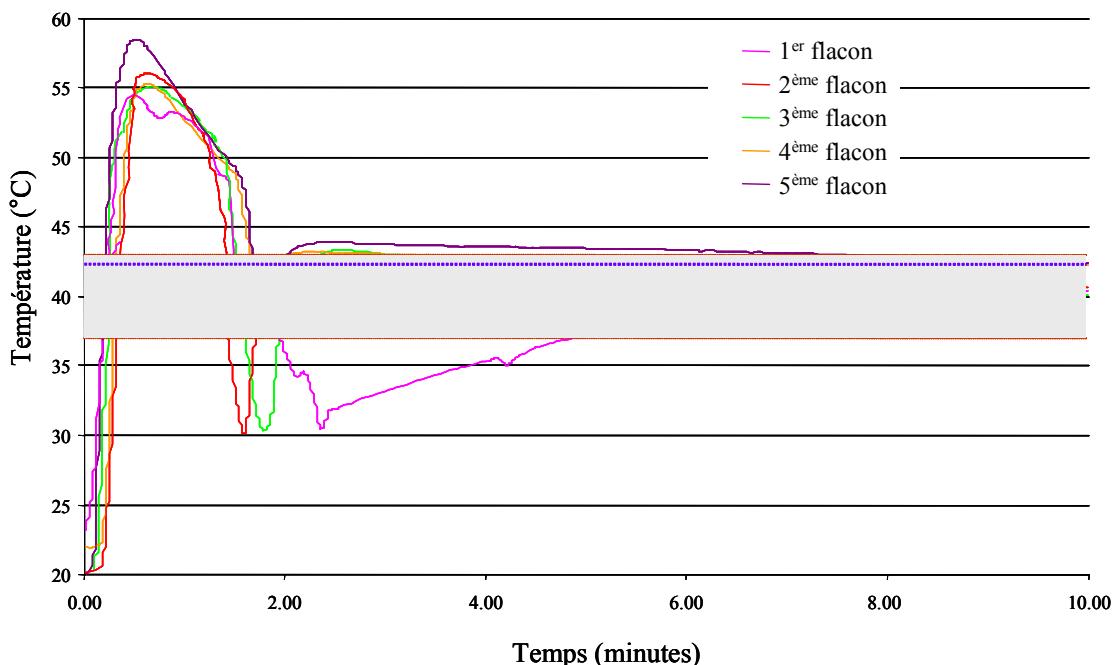


Figure 15-4. Evolution de la température dans les échantillons plongés dans les bains d'eau glacée et à 42,3°C

15.4.2. Mise en évidence du métabolisme

15.4.2.1. Cellule de transmission

Le choix de la cellule de mesure s'est porté sur la cellule de transmission (**Figure 15-3**).

La mise en évidence du métabolisme de *Gsc* repose sur la différence observée entre un spectre mesuré après un certain temps d'incubation (T_{incub}) et le spectre mesuré avant la mise à incuber (T_0). La variation spectrale observée traduit la modification du milieu résultant de son évolution (naturelle ou métabolisme de la souche). Un pic positif, apparaissant lors du calcul

d'un « Delta Spectre », correspond à l'apparition d'un composé ou plus précisément d'une fonction chimique, un pic négatif correspondant, quant à lui, à la disparition d'un composé ou d'une fonction chimique. Le calcul du « Delta Spectre » se fait en soustrayant le spectre après incubation du spectre initial, selon la formule suivante :

$$\text{Delta Spectre (ou Delta D.O.)} = \text{Spectre } T_0 - \text{Spectre } T_{\text{Incub}}$$

Il faut cependant ne pas perdre de vue que la mesure du spectre infra-rouge correspond à la photo d'un équilibre. En effet, si le métabolisme correspond à la transformation d'un composé en un autre composé présentant les mêmes fonctions chimiques et si cette transformation est chimiquement équilibrée en ce qui concerne les fonctions, rien ne sera visible d'un point de vue spectral.

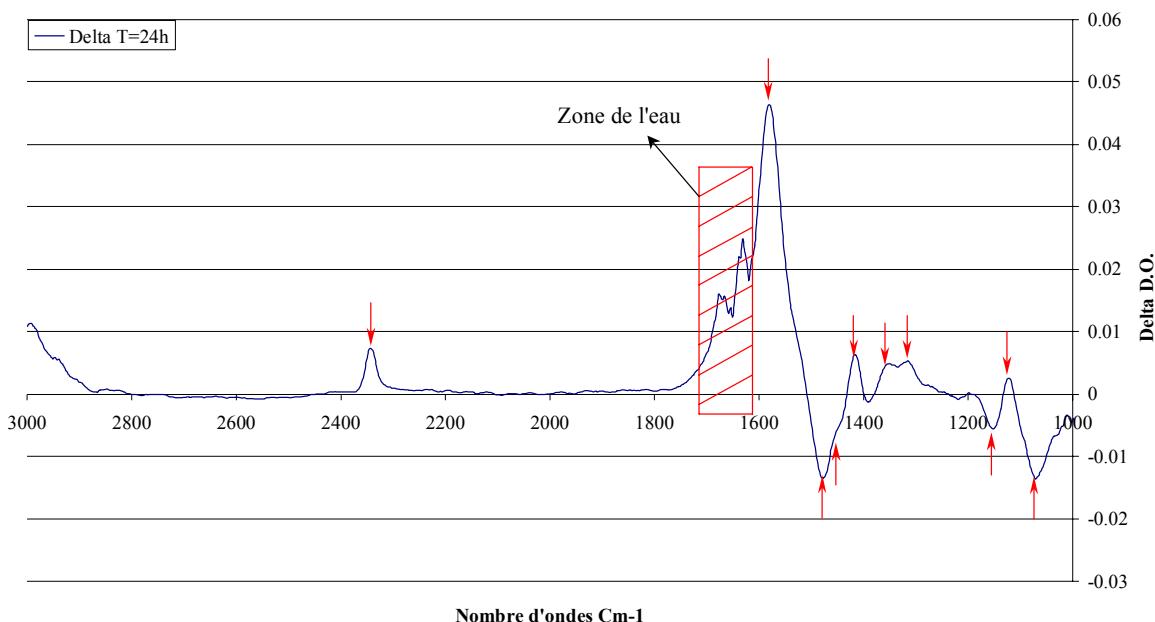


Figure 15-5. Métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* en l'absence d'antibiotiques, mise en évidence par différence spectrale (calcul du Delta Spectre) après 24 heures d'incubation à 64°C

L'incubation à 64°C pendant 24 heures d'un échantillon constitué de 150 mL de milieu *ElPcGl* (16.3.2.1. Bouillon *ElPcGl*), de 375 mL de lait UHT et de 8 mL de spores de *Gsc* permet de visualiser l'évolution du milieu de culture (Figure 15-5). Ainsi, plusieurs bandes spectrales d'intérêt apparaissent clairement dans le delta spectre mesuré (Tableau 15-2).

La zone spectrale mesurée entre 1.600 et 1.700 cm^{-1} présente de nombreuses variations. Cette zone correspond à la zone d'absorption de l'eau. Elle est difficilement exploitable en terme d'indicateur de métabolisme.

Tableau 15-2. Identification des zones spectrales (cm^{-1}) d'intérêt – mesure du delta spectre après 24 heures d'incubation en l'absence de résidus inhibiteurs

Zone	Variation (Delta spectre) positive	Variation (Delta spectre) négative
1	1.120	1.075
2	1.317	1.192
3	1.350	1.450
4	1.417	1.475
5	1.584	
6	2.342	

En effet, le détecteur est souvent saturé dans cette zone et le delta spectre calculé ne permet pas de conclure à la modification du milieu. En effet, cette zone spectrale est particulièrement instable (**Figure 15-6**) : mesure à quatre reprises du bouillon *ElPcGl* (15.3.2.1. *Bouillon ElPcGl*).

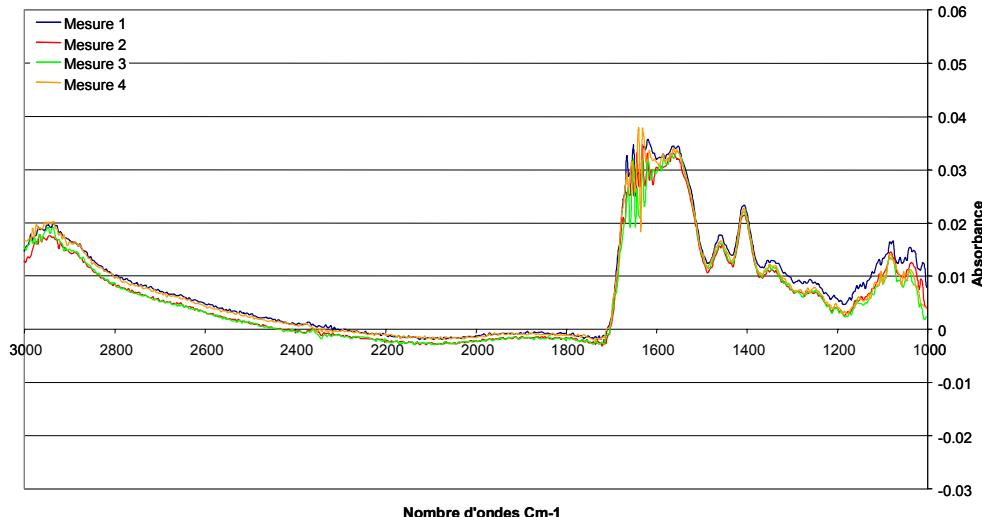


Figure 15-6. Mesure du bouillon *ElPcGl* (4 répétitions)

Deux composés ont été mesurés afin d'identifier les constituants responsables des variations spectrales observées. Ainsi, le glucose, sucre présent dans le milieu de culture et métabolisé par la bactérie test, et l'acide lactique, produit de cette métabolisation, ont été analysés en solution aqueuse (5 % dans de l'eau osmosée). Les spectres (absorbance) ont été

superposés au delta spectre (Delta absorbance) obtenu après une croissance de 24 heures de la bactérie (**Figure 15-7**).

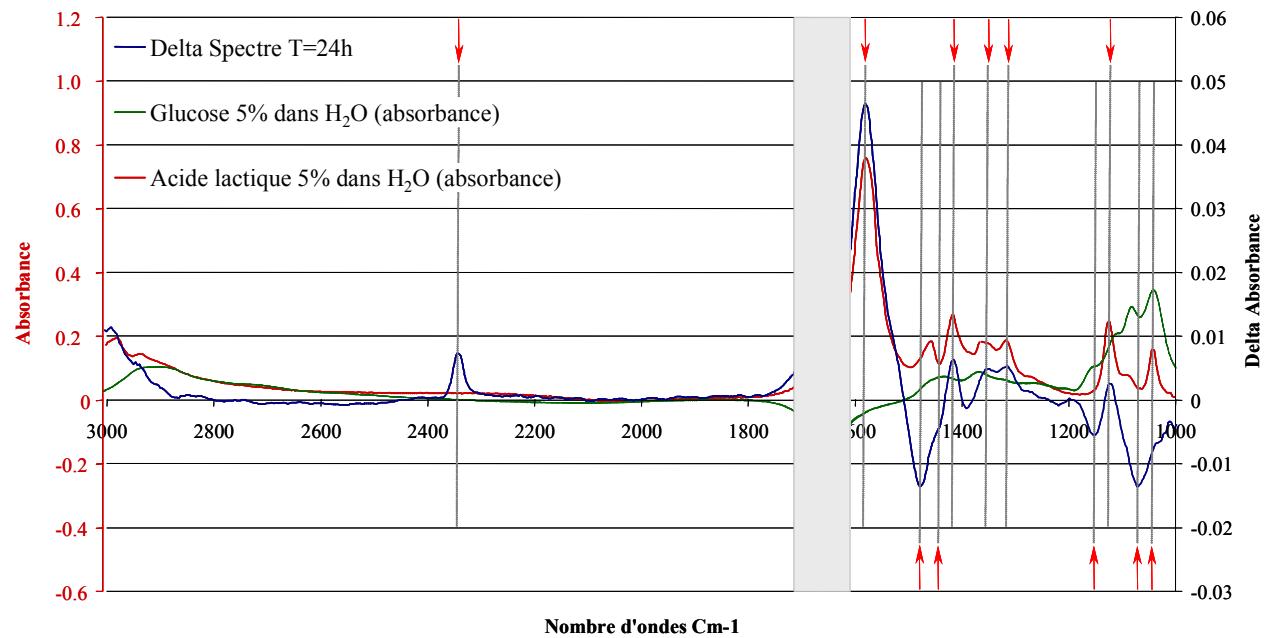


Figure 15-7. Superposition du delta spectre (24 heures d'incubation), du glucose (5 % dans H₂O) et de l'acide lactique (5 % dans H₂O)

La superposition des informations (**Figure 15-7**) permet d'expliquer l'apparition ou la disparition de certaines bandes spectrales. Ainsi, l'ensemble des variations positives (hormis le pic présent à 2.342 cm⁻¹) sont attribuables à l'acide lactique. De plus, dans les variations négatives correspondant effectivement au glucose, deux épaulements sont visibles (1.042 cm⁻¹ et 1.450 cm⁻¹). Ces deux épaulements correspondent à deux pics d'absorption de l'acide lactique. Ils présentent ainsi le phénomène de compensation décrit plus haut, dans lequel un composé disparaît et un autre présentant les mêmes bandes spectrales apparaît.

15.4.2.2. Cellule de réflexion thermostatée

La cellule de transmission utilisée nécessite des volumes d'échantillon relativement importants (de l'ordre de 50 mL). Cette contrainte matérielle nous a amené à envisager l'utilisation de la cellule ATR (**Figure 15-3**) comme moyen de mise en évidence du métabolisme de *Gsc*. Cette cellule permet l'analyse d'échantillons de plus petite taille (de l'ordre de quelques mL).

La première étape du développement consiste à évaluer la méthode de rinçage de la cellule. En effet, la plupart des échantillons liquides analysés sur la cellule ATR sont difficiles à éliminer

de la surface du cristal (huile, notamment). Il convient donc de déterminer quel solvant utiliser pour éviter toute contamination lors d'analyses en série.

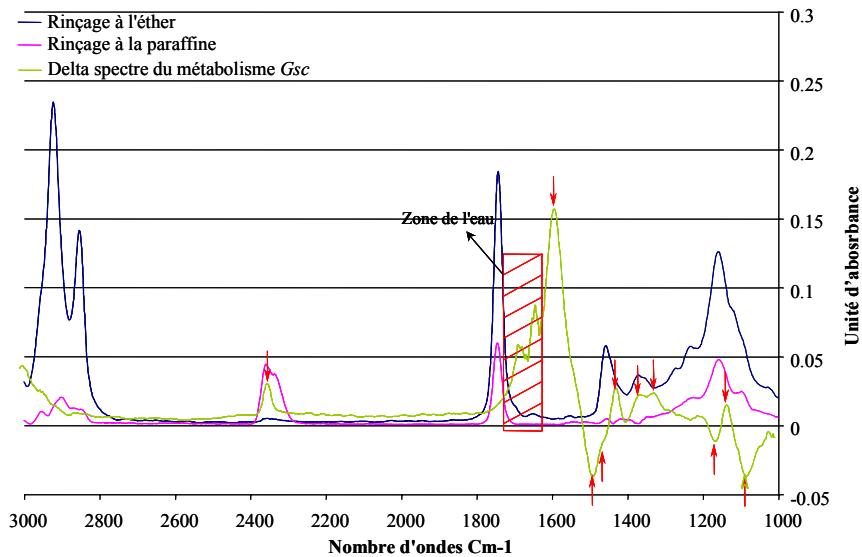


Figure 15-8. Déviation standard (unité d'absorbance) mesurée sur 5 séries de rinçage (éther ou paraffine)

La mise au point du rinçage est basé sur l'élimination d'une huile de friture, liquide gras et visqueux. Le nettoyage de la cellule est effectué avec de l'éther d'une part et de la paraffine d'autre part (**Figure 15-8**).

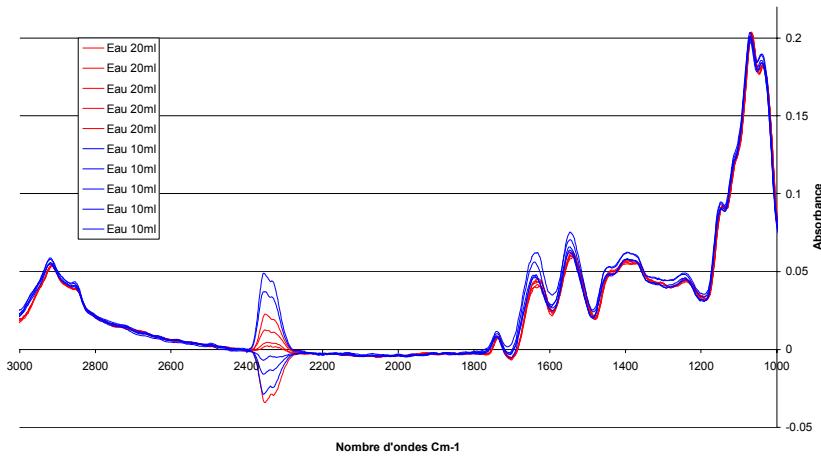


Figure 15-9. Rinçage de la cellule à l'eau osmosée – matrice étudiée : lait

La comparaison des deux modes de rinçage montre que le rinçage à la paraffine, sans être parfait, présente de meilleures résultats que le rinçage à l'éther. En effet, seule la zone du delta spectre comprise entre 1.000 cm^{-1} et 1.200 cm^{-1} est interférée par le rinçage de la cellule à la

paraffine. Le pic présent à 2.340 cm^{-1} (CO_2) n'est pas utilisé lors du suivi du métabolisme. Lors du rinçage à l'éther, seul le pic à 1.584 cm^{-1} est utilisable, ce qui réduit fortement l'intérêt de l'empreinte spectrale. Cette variation plus importante est due à l'utilisation d'un solvant organique qui peut dissoudre certaines colles se trouvant dans la cellule ATR.

Pour résoudre l'usage de solvant organique et simplifier la manipulation, le rinçage de la cellule à l'eau osmosée a été testé sur le lait, constituant majeur du milieu à analyser lors du suivi de métabolisme. Deux volumes de rinçage (10 mL et 20 mL) ont été envisagés lors de cet essai.

Les variations observées lors du rinçage avec le volume de 10 mL sont plus importantes dans la zone spectrale d'intérêt (1.000 à 1.600 cm^{-1}). Il est donc préférable de rincer la cellule avec 20 mL d'eau pour ne pas altérer l'information collectée lors de l'analyse des échantillons (**Figure 15-9**).

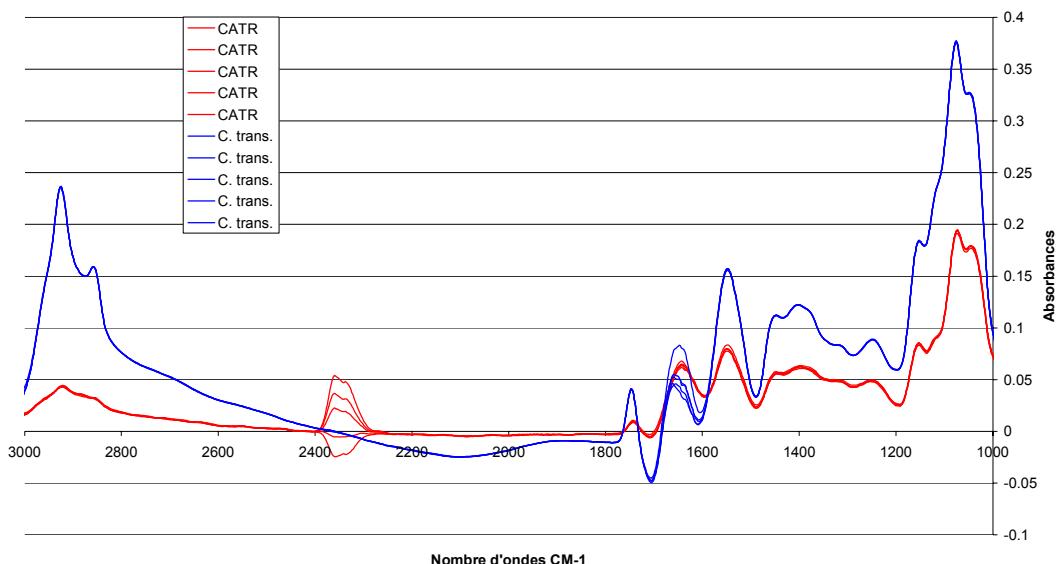


Figure 15-10. Comparaison des spectres obtenus sur cellule de transmission et sur cellule ATR pour le lait – $n = 5$

Les premiers essais ayant été réalisés avec la cellule de transmission, il est nécessaire de vérifier si l'information collectée avec la cellule ATR est comparable : est-il possible de tirer la même information au départ des mesures réalisées ? Plusieurs mesures du lait ont été réalisées pour cette comparaison.

Les différences spectrales qui apparaissent entre les deux cellules sont dues au trajet optique du rayonnement infra-rouge (**Figure 15-10**). En effet, le trajet dans la cellule de transmission est plus long, ce qui conduit à une plus grande absorption du rayonnement. De

plus, dans la cellule ATR, le rayonnement infra-rouge est atténué dans le cristal. Ces deux éléments conduisent à l'obtention de spectres plus intenses avec la cellule de transmission. D'un point de vue qualitatif, les mêmes bandes spectrales apparaissent dans les deux analyses. Seul le pic du CO_2 (environ 2.340 cm^{-1}) apparaît dans le spectre ATR, de manière très variable, alors qu'il est absent dans le spectre de transmission.

La similitude des informations récoltées avec les deux types de cellule permet d'envisager l'usage de la cellule ATR pour suivre l'évolution du milieu au cours du métabolisme de *Gsc*. La diminution de l'intensité de la réponse risque cependant d'altérer les résultats. En effet, l'analyse d'une cinétique réalisée en l'absence de résidus inhibiteurs (**Figure 15-11**) montre que les Delta spectres obtenus sur la cellule ATR sont difficilement exploitables.

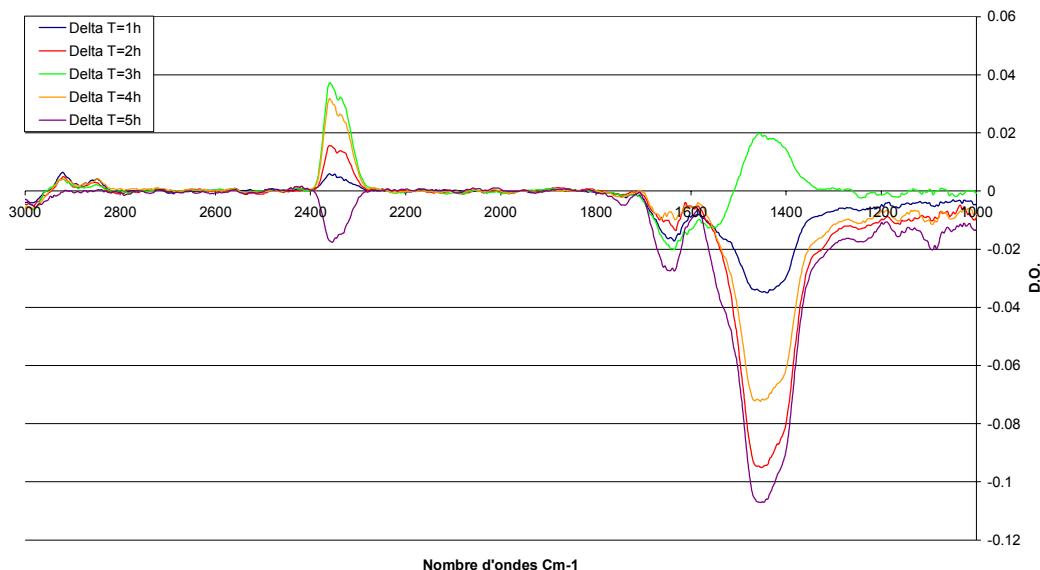


Figure 15-11. Cinétique du métabolisme de *Gsc* mesurée sur cellule ATR

Ainsi, les pics d'intérêts observés avec la cellule de transmission ont disparu : la zone du métabolisme des sucres (1.000 à 1.300 cm^{-1}), l'acide lactique (1.540 cm^{-1}). Seul, le pic du CO_2 se retrouve dans ces delta spectres. La variation apparaissant aux alentours de 1.450 cm^{-1} n'est pas exploitable, son intensité n'étant pas liée au temps d'incubation.

La présence systématique du pic du CO_2 laisse à penser que ce composé est un indicateur potentiel du métabolisme. La maîtrise des conditions ambiantes (conditions de fermentation : utilisation d'un fermenteur ne permettant pas les échanges gazeux avec l'extérieur – condition d'analyse de la cellule : purge de la cellule ATR avec un gaz inerte exempt de dioxyde de

carbone) a permis de mesurer la quantité de gaz produite au cours du métabolisme de *Gsc* et de montrer que ce paramètre métabolique n'est pas exploitable pour traduire de manière quantitative la croissance de la souche *Gsc*.

Bien qu'elle soit plus intéressante en terme de manipulation, la difficulté de mettre en œuvre la cellule ATR sur le milieu particulier, constitué d'un bouillon de culture liquide, de lait et d'une souche bactérienne en développement, est la principale raison de l'abandon de cette technique.

15.4.3. Activité de certains antibiotiques

Le suivi de l'activité de certains antibiotiques a été réalisé au cours de cinétiques de *Gsc*. Différentes voies ont été étudiées : l'action de composés à noyau β -lactame, connus pour être efficaces sur la souche test, l'action synergique d'un sulfamide et du triméthoprime ainsi que la perte d'efficacité de la tétracycline en présence de carbonate de calcium.

15.4.3.1. Activité de la pénicilline G et de l'amoxicilline, deux antibiotiques à noyau β -lactame

L'utilisation importante de molécules à noyau β -lactame et l'efficacité de ces molécules sur les différentes souches microbiennes mises en œuvre dans l'industrie de la transformation des produits laitiers rend fondamentale la détection de ces résidus. Deux composés appartenant à cette famille d'antibiotiques, la pénicilline G et l'amoxicilline, sont testés afin de visualiser leur action sur le métabolisme de *Gsc*, traduite dans le spectre MIR.

Tableau 15-3. Conditions d'étude de l'activité de la pénicilline G et de l'amoxicilline sur *Gsc*, traduite dans le spectre MIR

Molécule	Présence de pénicillinase ⁵¹	Concentrations mises en œuvre ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Pénicilline G	Non	1 – 2 – 3 – 4
Pénicilline G	Oui	1 – 2 – 3 – 4
Amoxicilline	Non	1 – 2 – 3 – 4

Cet essai reprend différentes concentrations pour chacun des antibiotiques, ainsi que l'action de la pénicillinase (**Tableau 15-3**).

⁵¹ Genzyme ref 1545 – penicillinase (freeze dried) E.C. 3.5.2.6 – ex : *Bacillus cereus* 569/H9 – Batch : 137596

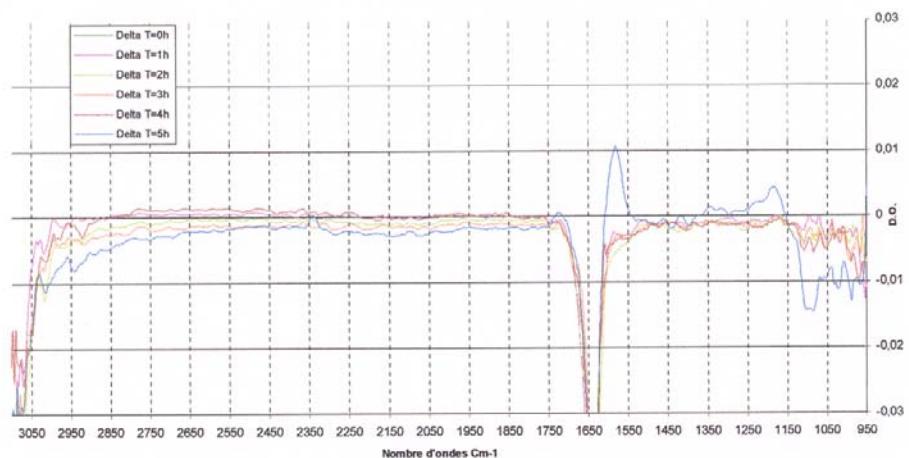


Figure 15-12. Cinétique du métabolisme de *Gsc* en présence d'amoxicilline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Lors des essais en absence de pénicillinase, l'ensemble des concentrations mises en œuvre inhibent le métabolisme de *Gsc*, hormis l'amoxicilline à $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ qui présente, après 5 heures d'incubation, un Delta spectre différent de 0. Les pics d'intérêt définis pour le métabolisme se retrouvent bien ce Delta spectre (**Figure 15-12**).

L'ajout de pénicillinase aux laits par la pénicilline G a montré que cette enzyme permettait la reprise du métabolisme (**Figure 15-13**) et sa visualisation après les 5 heures d'incubation.

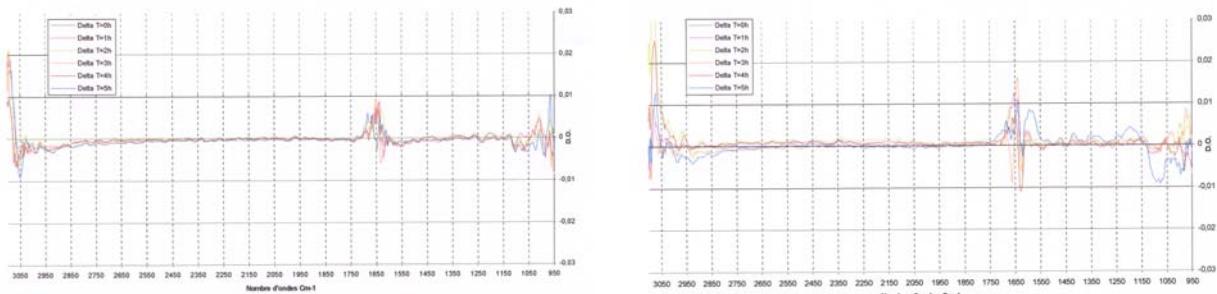


Figure 15-13. Cinétique du métabolisme de *Gsc* en présence de pénicilline G ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) seule (à gauche) et additionnée de pénicillinase (à droite)

15.4.3.2. Action synergique de sulfamide et de triméthoprime

La présence simultanée de composés appartenant à des groupes d'antibiotiques différents peut conduire à différents effets : antagonisme, addition, synergie ou indifférence. Une action synergique peut être recherchée, permet ainsi une utilisation réduite de certains composés pour une optimisation de l'efficacité recherchée. Cet effet est connu pour l'association « sulfamides –

triméthoprime ». Cette dernière association se retrouve dans plusieurs médicaments destinés au traitement de pathologies bovines⁵² (**Tableau 15-4**).

Tableau 15-4. Médicaments vétérinaires utilisant l'association « Sulfamide – Triméthoprime » (*Compendium des médicaments vétérinaires de l'AGIM – AVGI-AGIM, 2001*)

Médicament	Sulfamide	Triméthoprime	Période de retrait - lait	Période de retrait - viande
DUOPRIM®	Sulfadoxine 200 mg	40 mg	48 heures	3 jours
DUPHATROXIM®	Sulfadiazine 200 mg	40 mg	48 heures	18 jours
TRIBRISSEN® 48 %	Sulfadiazine 400 mg	80 mg	7 jours	28 jours
TRIMA-kel® 24 %	Sulfamethoxazole 200 mg	40 mg	48 heures	5 jours
TRISUPRIME®	Sulfadiazine 20 %	4 %	48 heures	18 jours
VETITRIM®	Sulfadimethoxin sodium 200 mg	40 mg	48 heures	4 jours

Ces deux molécules, initialement bactériostatiques, présentent un schéma d'action de deux mécanismes évoluant de façon séquentielle. Les deux principes actifs, associés de cette manière, exercent alors une action bactéricide. Le mode d'action, consistant à inhiber la synthèse de l'acide folique, s'applique à deux niveaux différents (**Figure 15-14**) : la sulfadiazine empêche la synthèse de l'acide dihydrofolique à partir de l'acide *p*-aminobenzoïque et le triméthoprime inhibe la dihydrofolate réductase, ce qui conduit à empêcher la production d'acide tétrahydrofolique à partir de l'acide dihydrofolique, avec pour conséquence la non-production de précurseurs de l'acide nucléique. Les micro-organismes qui doivent synthétiser leur propre acide folique sont sensibles à ce type d'inhibiteurs ou à cette association de molécules.

Cette action bactéricide constitue une exception aux lois de Jawetz et Gunisson⁵³. En effet, ces règles peuvent s'énoncer de la manière suivante :

- L'association de deux antibiotiques bactéricides peut produire un effet synergique.
- L'association de deux antibiotiques bactériostatiques donnent généralement un effet additif.
- L'association d'un antibiotique bactéricide et d'un antibiotique bactériostatique peut donner un effet antagoniste.

⁵² Compendium des médicaments vétérinaires de l'AGIM – AVGI-AGIM, 2001

⁵³ <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/atbq/tabldeux.html> (2008-08-11)

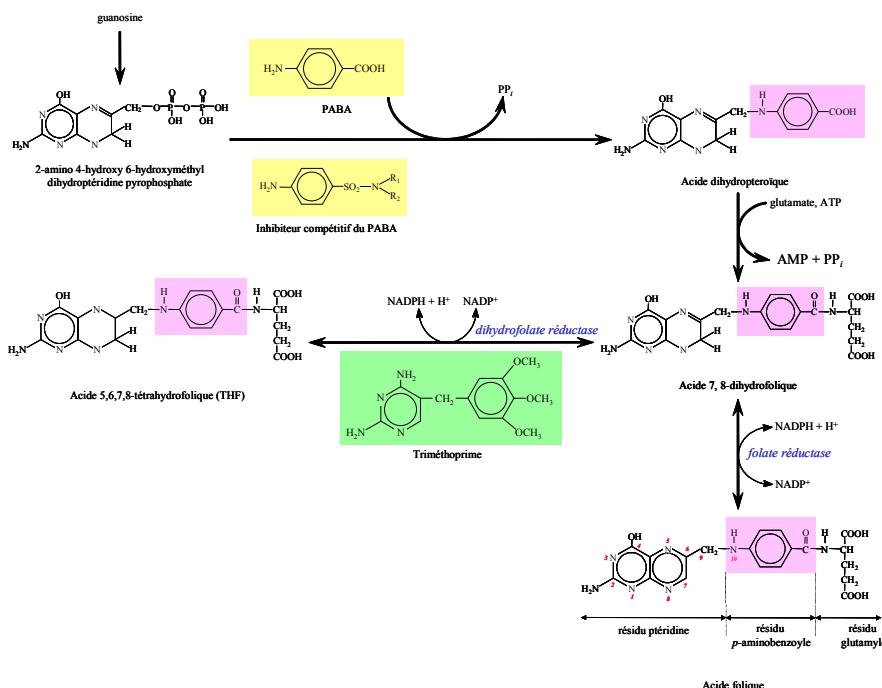


Figure 15-14. Mode d'action des sulfamides et du triméthoprime (adapté de *Encyclopédia Universalis*)

Deux exceptions sont bien établies en ce qui concerne les antibiotiques bactériostatiques :

- L'association « *triméthoprime – sulfamide* » est synergique alors que les deux types de molécules sont bactériostatiques.
- Les associations « *macrolide – chloramphénicol* », « *macrolide – lincosamide* » ou « *macrolide – macrolide* » sont antagonistes, alors que toutes ces molécules sont bactériostatiques.

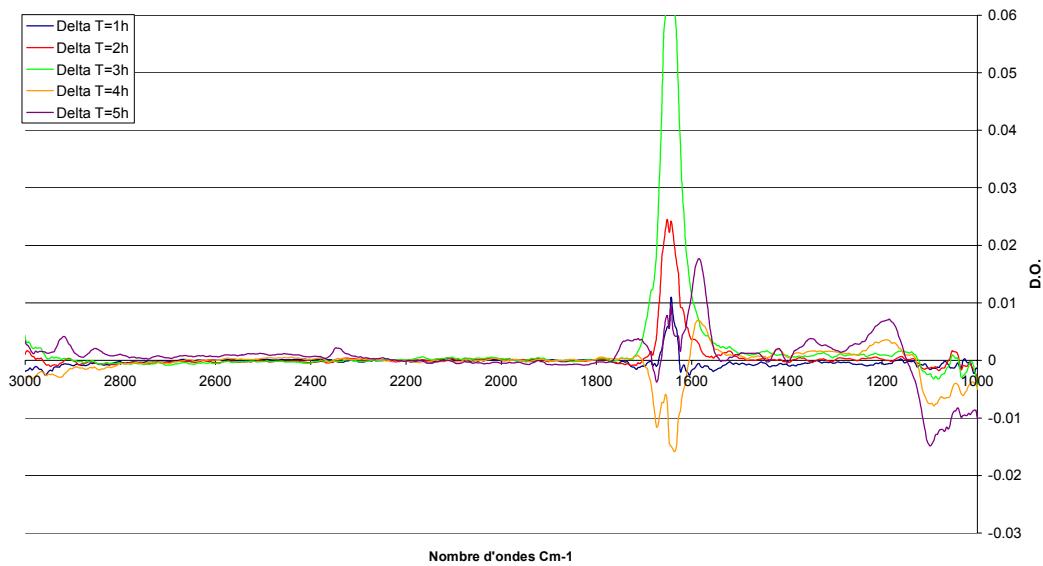


Figure 15-15. Cinétique de *Gsc* réalisée dans du lait dopé avec 10 ppb de sulfamérazine et 50 ppb de triméthoprime

Sans constituer une règle absolue, les lois de Jawtez et Gunisson permettent d'éviter certaines associations malencontreuses : association d'un antibiotique à noyau β -lactame avec une tétracycline ou avec un macrolide ou avec un phénicol. Elles sont cependant à vérifier sur les souches bactériennes à traiter ou utilisées comme organismes tests.

Tableau 15-5. Mise en évidence de l'effet synergique « *Sulfamide – Triméthoprime* » - concentrations mises en œuvre

Cinétique	Sulfamérazine ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Triméthoprime ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	10	50
2	30	50
3	50	50

Pour vérifier cet effet de synergie, une série de cinétiques en présence des deux molécules, inactives aux concentrations mises en œuvre, a été réalisée.

Dans ces cinétiques, la concentration en triméthoprime reste constante et la concentration en sulfamérazine varie (**Tableau 15-5**). La cinétique est calculée sur 5 heures, en soustrayant le spectre initial des spectres acquis au cours du temps.

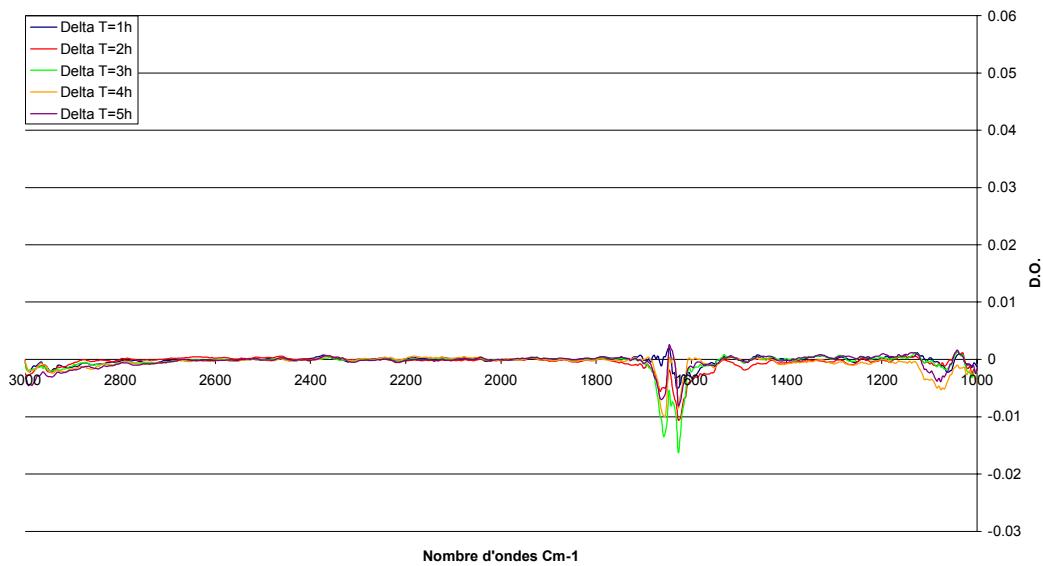


Figure 15-16. Cinétique de *Gsc* réalisée dans du lait dopé avec 50 ppb de sulfamérazine et 50 ppb de triméthoprime

Bien que ces deux molécules ne soient pas actives aux concentrations mises en œuvre, leur effet combiné est clairement mis en évidence. En effet, la combinaison de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de chacune des molécules conduit à l'inhibition totale de la souche (**Figure 15-16**) alors que $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfamérazine associés à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triméthoprime n'ont aucun effet sur la croissance bactérienne (**Figure 15-15**). La cinétique réalisée avec le mélange intermédiaire présente, elle aussi, l'inhibition de la souche.

15.4.3.3. Interaction entre le carbonate de calcium et les tétracyclines

La présence de calcium dans le milieu conduit à réduire l'activité des tétracyclines, par le biais de la formation d'un chélate. Cette réaction, déjà connue⁵⁴, pourrait conduire à une non-détection de l'antibiotique.

Pour mettre en évidence la diminution de l'activité de la tétracycline en présence de calcium, différentes cinétiques dans le milieu liquide ont été réalisées. Pour ces cinétiques, la concentration en tétracycline reste constante, contrairement à celle en carbonate de calcium.

⁵⁴ <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/atbq/sensibilite.html#intro> (2008-08-11)

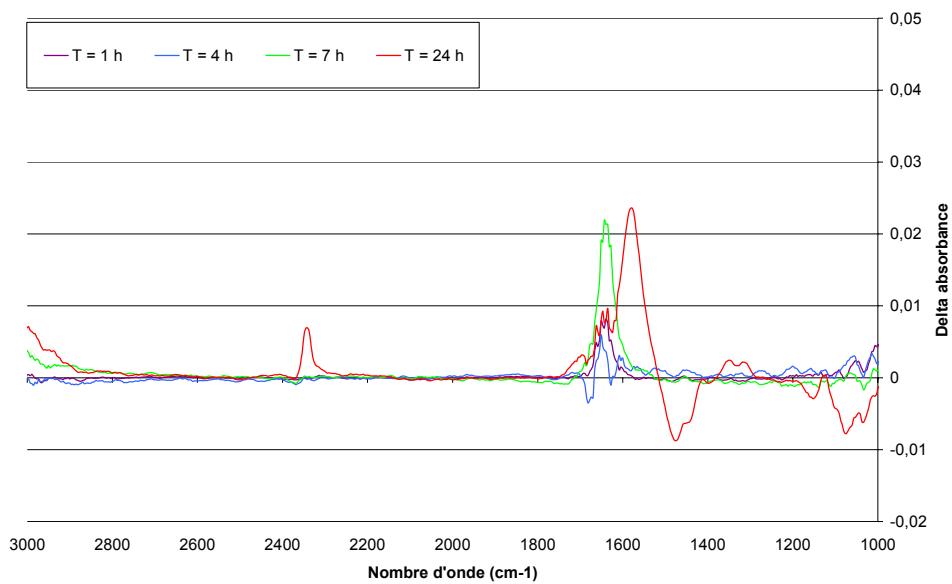


Figure 15-17. Cinétique de *Gsc* réalisée dans du milieu *EIPcGl* en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium (0,75 %)

L'augmentation de la teneur en carbonate de calcium dans le milieu conduit à une augmentation du métabolisme de *Gsc* (**Figure 15-17** – **Figure 15-18** – **Figure 15-19**). Cette dernière est à mettre en rapport avec la disparition sous forme d'un chélate, de la tétracycline présente.

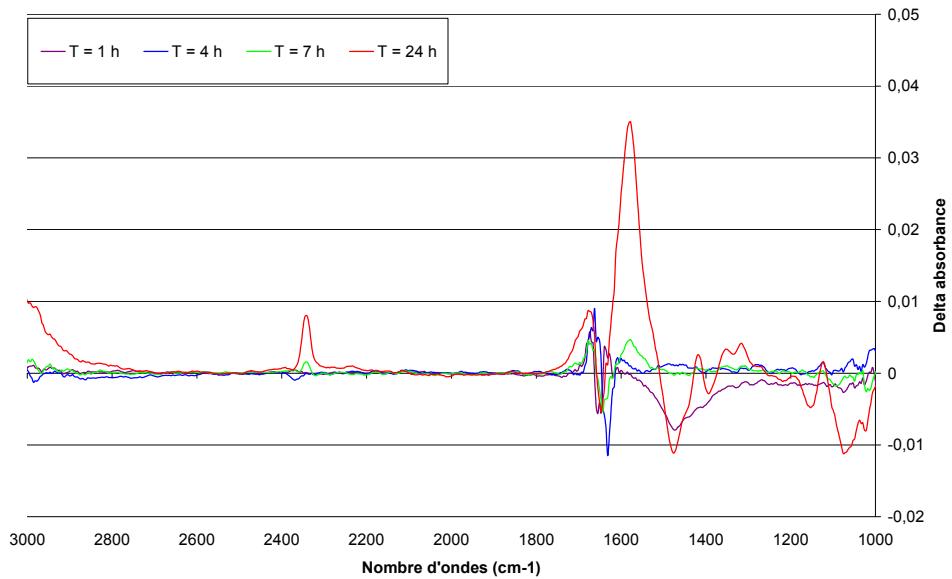


Figure 15-18. Cinétique de *Gsc* réalisée dans du milieu *EIPcGl* en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium (2,25 %)

Comme cela a été fait pour le suivi du métabolisme par chromatographie liquide, il est possible de définir un indice de métabolisme M' , basé sur quelques nombres d'onde caractéristiques. Cet indice M' est calculé de la manière suivante :

$$M' = \sum_{i=1}^6 |\Delta_{Absorbance}|$$

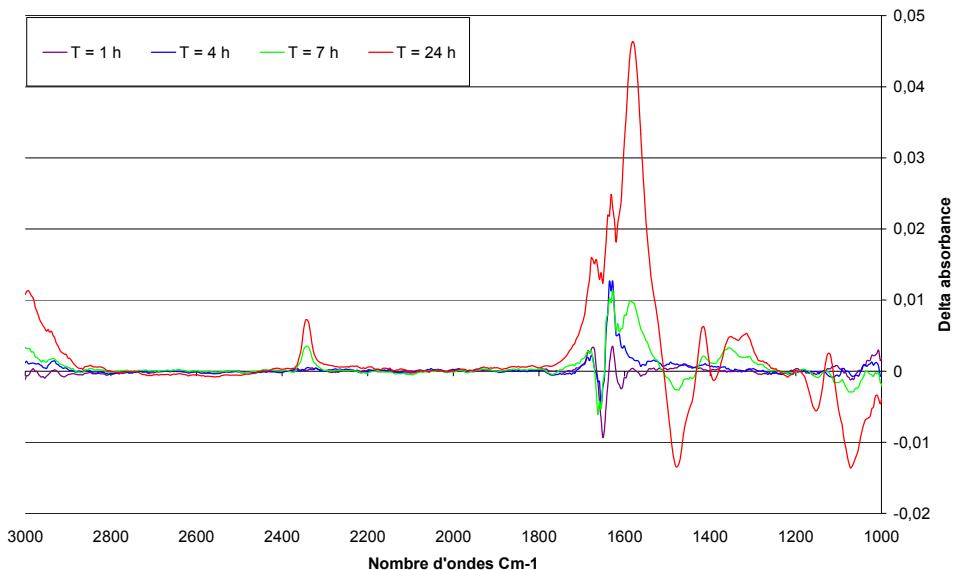


Figure 15-19. Cinétique de *Gsc* réalisée dans du milieu *E/PcGl* en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium (3,75 %)

Les $\Delta_{Absorbance}$ mesurés pour les différents nombres d'onde d'intérêt sont synthétisés (**Tableau 15-6**).

Tableau 15-6. $\Delta_{Absorbance}$ mesurés pour les différents nombre d'onde – mise en évidence du complexe « Tétracycline – Carbonate de calcium »

Nombre d'onde (cm⁻¹)	0,75 % Tétracycline – 0,75 % carbonate de calcium				0,75 % Tétracycline – 2,25 % carbonate de calcium				0,75 % Tétracycline – 3,75 % carbonate de calcium			
	<i>T = 1 h</i>	<i>T = 4 h</i>	<i>T = 7 h</i>	<i>T = 24 h</i>	<i>T = 1 h</i>	<i>T = 4 h</i>	<i>T = 7 h</i>	<i>T = 24 h</i>	<i>T = 1 h</i>	<i>T = 4 h</i>	<i>T = 7 h</i>	<i>T = 24 h</i>
1072	0,0002	0,0009	0,0013	-0,0073	-0,0006	-0,0001	-0,0006	-0,0111	-0,0014	-0,0009	-0,0039	-0,0154
1323	-0,0006	-0,0008	-0,0001	0,0021	-0,0004	-0,0006	0,0004	0,0037	-0,0002	-0,0003	0,0010	0,0032
1358	-0,0004	-0,0012	0,0000	0,0024	-0,0003	-0,0002	0,0007	0,0031	-0,0001	0,0000	0,0023	0,0028
1419	-0,0004	-0,0011	0,0002	-0,0006	-0,0001	-0,0002	0,0005	0,0026	0,0002	0,0005	0,0010	0,0042
1481	-0,0006	-0,0013	0,0002	-0,0082	-0,0001	0,0003	-0,0002	-0,0105	0,0003	0,0005	-0,0036	-0,0152
1581	0,0002	-0,0005	0,0026	0,0238	0,0002	0,0002	0,0044	0,0349	0,0002	0,0014	0,0087	0,0445
M'	0,002393	0,005797	0,004415	0,044472	0,001735	0,001541	0,006828	0,065840	0,002399	0,003622	0,020459	0,085393

Le calcul des indices de métabolisme pour les différentes conditions d'incubation et la représentation graphique de ceux-ci illustrent clairement l'effet de l'augmentation de la teneur en carbonate de calcium sur l'activité de la tétracycline (**Figure 15-20**). Cet effet n'est cependant visible qu'après 7 heures d'incubation, durée non utilisable pour des échantillons contenant du lait, ceux-ci précipitant à cause de leur acidification.

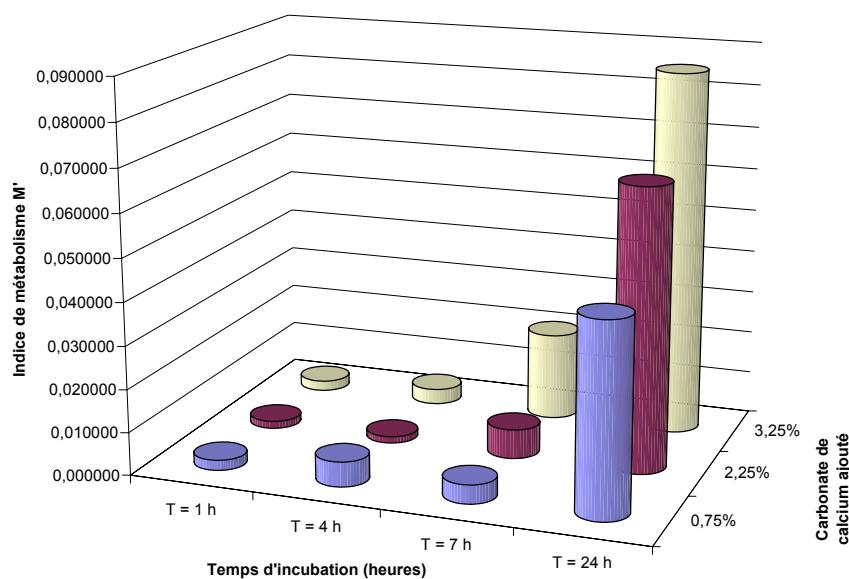


Figure 15-20. Cinétiques de *Gsc* réalisées dans du milieu *EIPcGl* en présence de tétracycline (0,75 %) et de carbonate de calcium – indice de métabolisme M'

Les cinétiques réalisées dans le milieu *EIPcGl* seul et dans le même milieu additionné de lait, en présence de carbonate de calcium (0,75 %) et en l'absence de tétracycline, conduisent à des indices de métabolisme M' équivalents. Ce qui permet de conclure que le carbonate de calcium seul n'a pas d'influence sur le métabolisme de la souche *Gsc*.

15.4.4. Influence du pH du lait

L'une des difficultés rencontrées lors de l'utilisation des tests de diffusion basés sur le changement de coloration dû à l'acidification du milieu était liée à la nature du lait et à son pH. En effet, un lait présentant un pH plus élevé voyait le temps de virage du test allongé et un lait présentant un pH plus faible voyait le temps de virage du test raccourci ou voyait le virage de l'indicateur malgré l'inhibition de la souche.

L'influence du pH du lait sur les Delta spectres mesurés au cours d'une cinétique de croissance de *Gsc* a été évaluée par spectrométrie MIR. Ainsi, un lait de pH initial 6,65 a été

porté à un pH de 7,50 (NaOH) et à un pH de 6,50 (HCl), des cinétiques étant mises en œuvre avec ces trois laits.

Le moment de virage de l'indicateur, traduisant le pH du milieu au cours de la cinétique, a été noté pour chacune des séries ainsi que le pH après les 5 heures d'incubation.

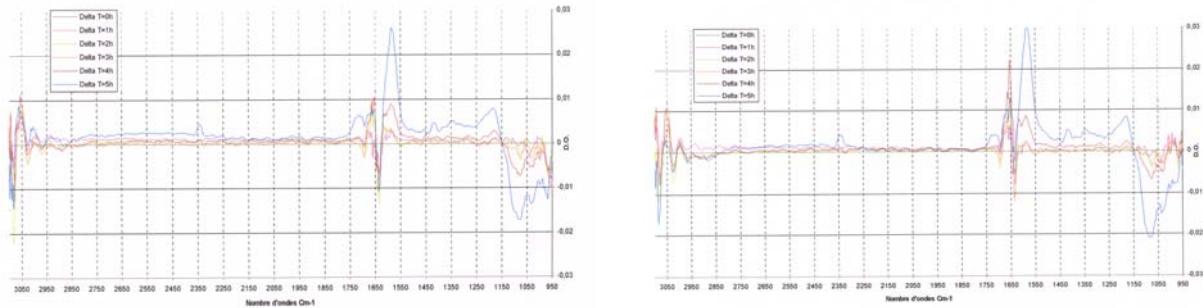


Figure 15-21. Cinétiques de *Gsc* réalisées dans des laits de pH différents (pH = 6,65 à gauche et pH = 7,50 à droite)

Les Delta spectres observés sont semblables pour les trois cinétiques, cela signifie donc que le pH du lait n'a pas d'influence sur le Delta spectre (**Figure 15-21**).

Par contre, le lait dont le pH initial a été amené à 7,50 a viré 15 minutes après les deux autres laits. La globalisation des résultats (**Tableau 15-7**) montre que les spectres MIR, et par calcul, les Delta spectres correspondant, permettent de limiter l'impact du pH initial du lait sur le résultat et sur la visualisation du métabolisme de *Gsc*.

Tableau 15-7. Mise en évidence de l'influence du pH du lait sur le métabolisme de *Gsc* – globalisation des résultats

Cinétique	pH initial	pH final	Virage de l'indicateur	Influence sur Delta spectre
1	6,50	5,70	4 h 15	Non
2	6,65	5,71	4 h 15	Non
3	7,50	5,89	4 h 30	Non

15.4.5. Confrontation de résultats MIR, chromatographiques et biologiques

Un ensemble d'échantillons ont été analysés en utilisant les différents outils développés : le comptage microbiologique, la chromatographie liquide et la spectrométrie MIR. A ces résultats a été ajouté la mesure du pH. Tous ces résultats ont ensuite été globalisés afin de vérifier si des relations pouvaient être mises en évidence entre ces différents paramètres.

15.4.5.1. Spectrométrie MIR : élimination des résultats aberrants

Les spectres MIR ont été regroupés en un seul graphique (**Figure 15-22**) de manière à visualiser la présence éventuelle de spectres aberrants.

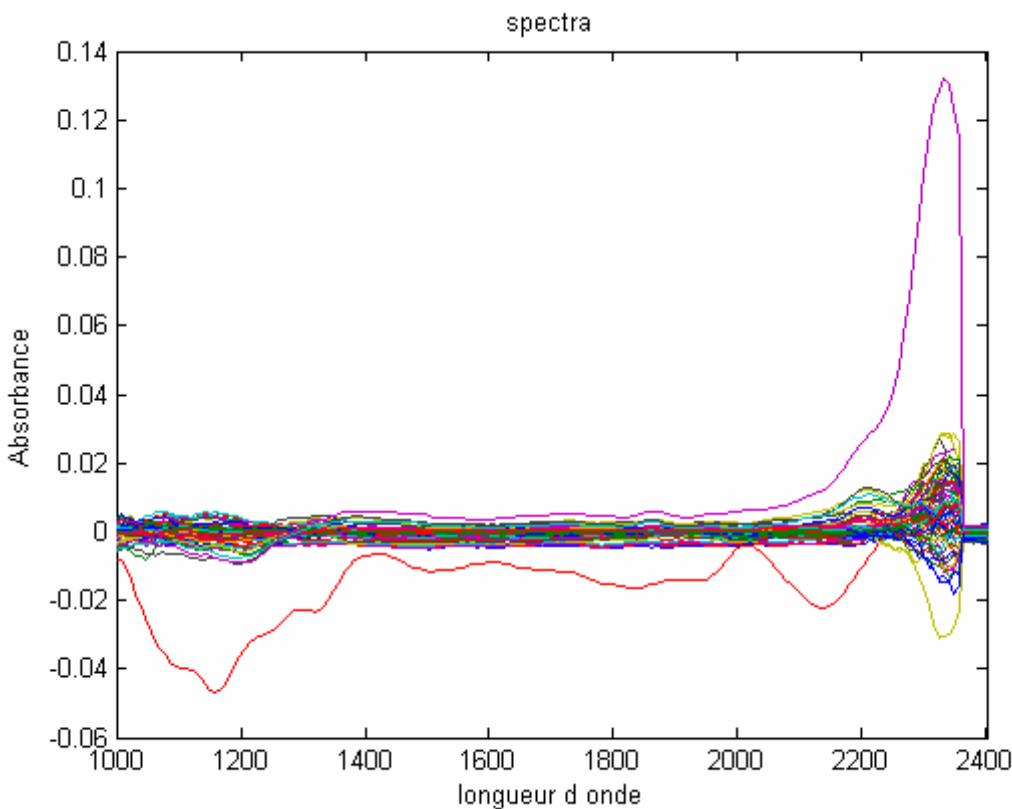


Figure 15-22. Globalisation des Delta spectres obtenus – élimination des aberrants

Trois échantillons conduisent à des Delta spectres totalement incohérents par rapport à l'ensemble des résultats. Ces trois échantillons seront éliminés de la base spectrale car ils pourraient influencer de manière importante l'ensemble du traitement des résultats.

Les résultats aberrants ont été également mis en évidence lors de l'analyse des spectres en composantes principales (ACP). Ce type d'analyse est particulièrement bien adapté à l'étude de données spectrales car elle permet la réduction des spectres en un seul point. Dans une représentation synthétique et visuelle (carte de ressemblance ou carte factorielle), chaque spectre est représenté par un point, présentant des similitudes avec les points adjacents. Les spectres ayant des ressemblances sont donc placés à des positions proches sur la carte. Si un spectre se retrouve à l'extérieur du groupe formé par les autres spectres, il peut être considéré comme aberrant.

L'analyse en composantes principales des Delta spectres étudiés (**Figure 15-23**) permet, dans les deux premières composantes, de retrouver deux des échantillons aberrants (38 et 75). Le troisième Delta spectre aberrant correspond à un troisième échantillon mis en évidence dans une autre composante.

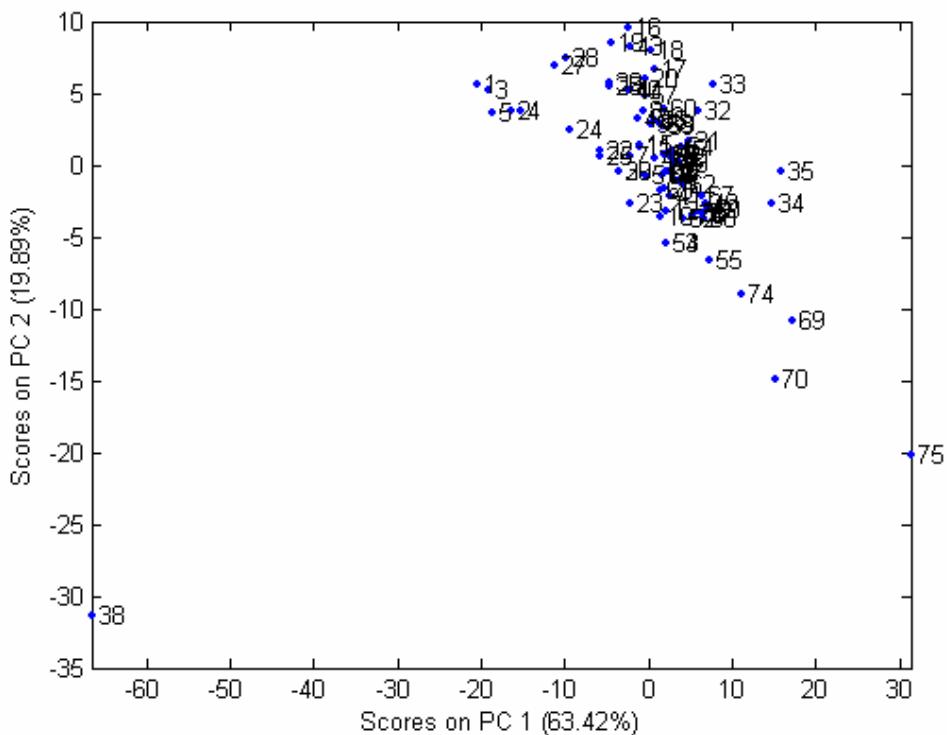


Figure 15-23. Analyse en composantes principales des Delta spectres ($n = 75$)

15.4.5.2. Relation pH – Delta spectre

La première relation étudiée concerne le pH et le Delta spectre : est-il possible de prédire le pH sur base du Delta spectre mesuré pour un échantillon ?

L'application d'un modèle de régression linéaire sur les données pH – Delta spectre a permis de répondre à cette question (**Figure 15-24**).

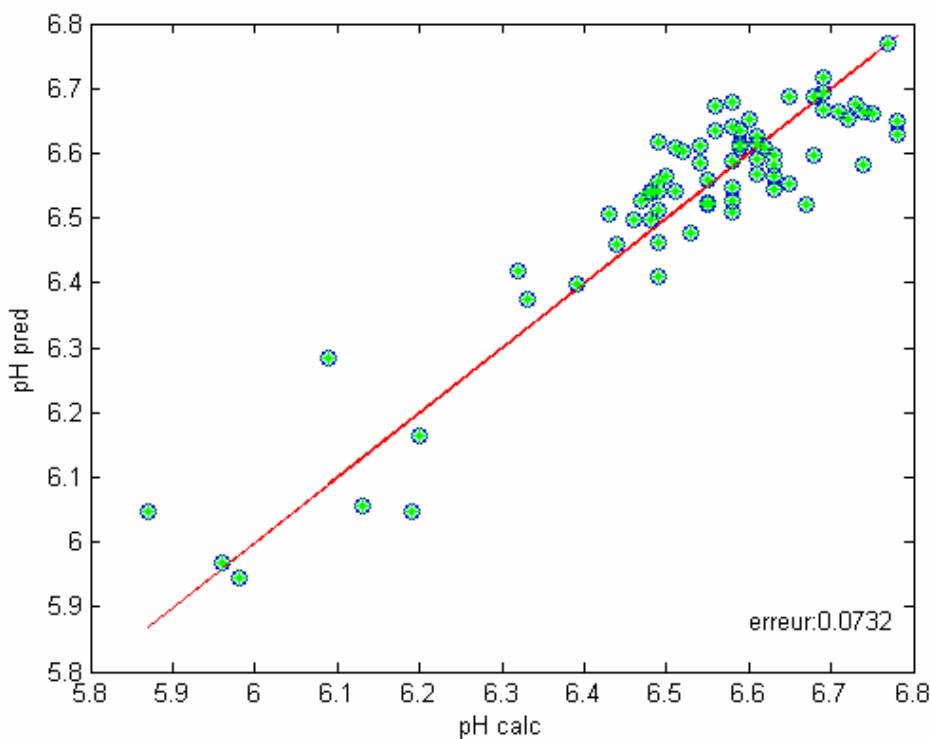


Figure 15-24. Relation entre pH prédict et pH mesuré ($n = 75$)

Le modèle linéaire développé (erreur = 0,0732) permet donc le calcul du pH sur la base du Delta spectre calculé.

15.4.5.3. Globalisation des données (comptages microbiologiques, déterminations chromatographiques, spectres MIR et pH)

L'analyse en composantes principales des différents paramètres mesurés (hormis les spectres MIR) est représentée dans une carte factorielle (**Figure 15-25**). Une première observation de la carte permet de réduire le rôle joué par les acides orotique (orot), citrique (citr) et urique (uriq) dans le métabolisme de *Gsc*. En effet, leur position sur la carte montre qu'ils présentent pas de variation pour les échantillons analysés, par rapport aux autres paramètres étudiés. Ils peuvent cependant présenter des corrélations entre eux.

Les six derniers paramètres se répartissent en deux groupes de variations opposées : le pH et un pic chromatographique identifié seulement par son T_R (10,30) d'une part et les acides pyruvique (pyru) et lactique (lact), le comptage bactérien (compt) et un composé identifié par son seul T_R (12,76) d'autre part.

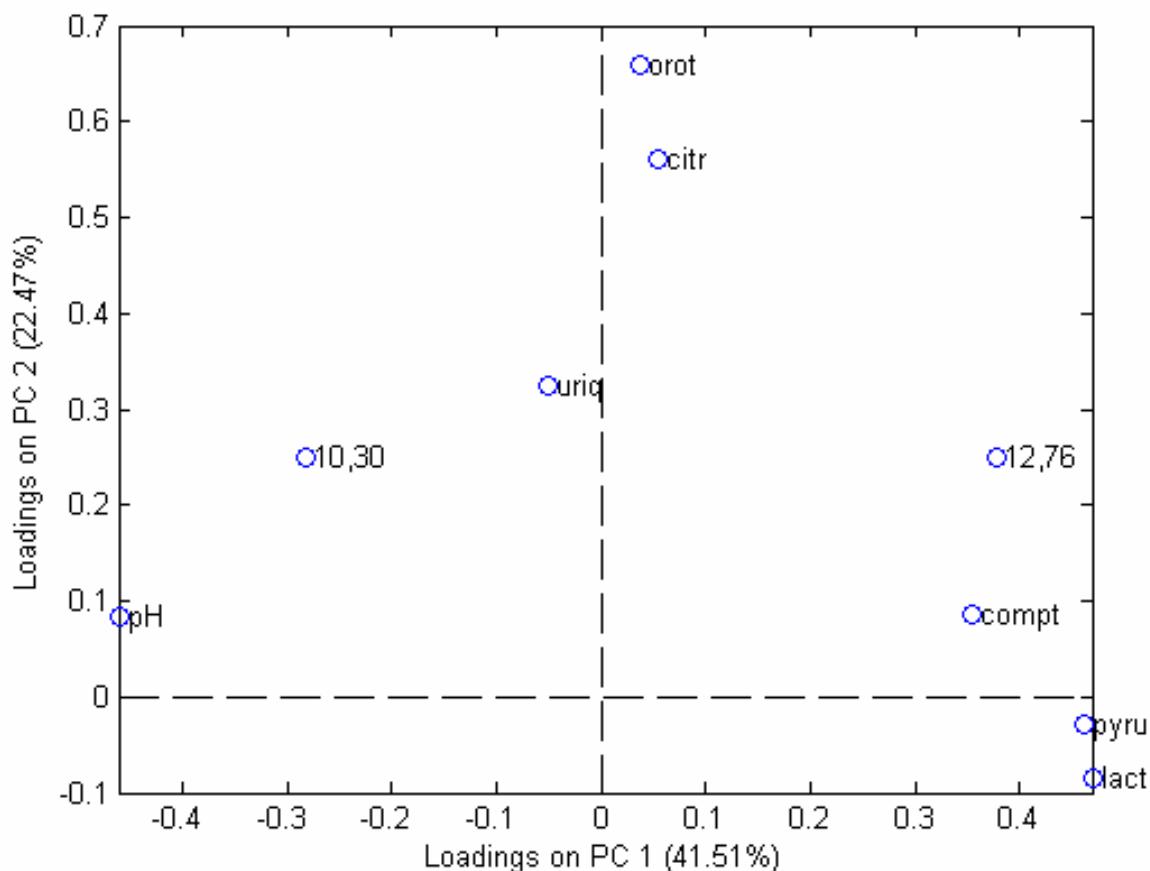


Figure 15-25. Carte factorielle des différents résultats obtenus : pH, comptages microbiologiques, déterminations chromatographiques ($n = 75$)

Les acides lactique et pyruvique sont fortement corrélés entre eux, ce qui est confirmé par le métabolisme, l'acide pyruvique étant précurseur de l'acide lactique dans la fermentation. Ces deux acides sont aussi directement corrélés au comptage bactérien et au composé $T_R = 12,76$, qui présentent le même type de variation. Ils sont par contre, inversement corrélés au pH et au composé $T_R = 10,30$.

La projection des Delta spectres calculés sur les mêmes échantillons (**Figure 15-26**) ne permet pas de discriminer les échantillons contenant des antibiotiques (dont le métabolisme est bloqué) des échantillons ne contenant pas de résidus inhibiteurs.

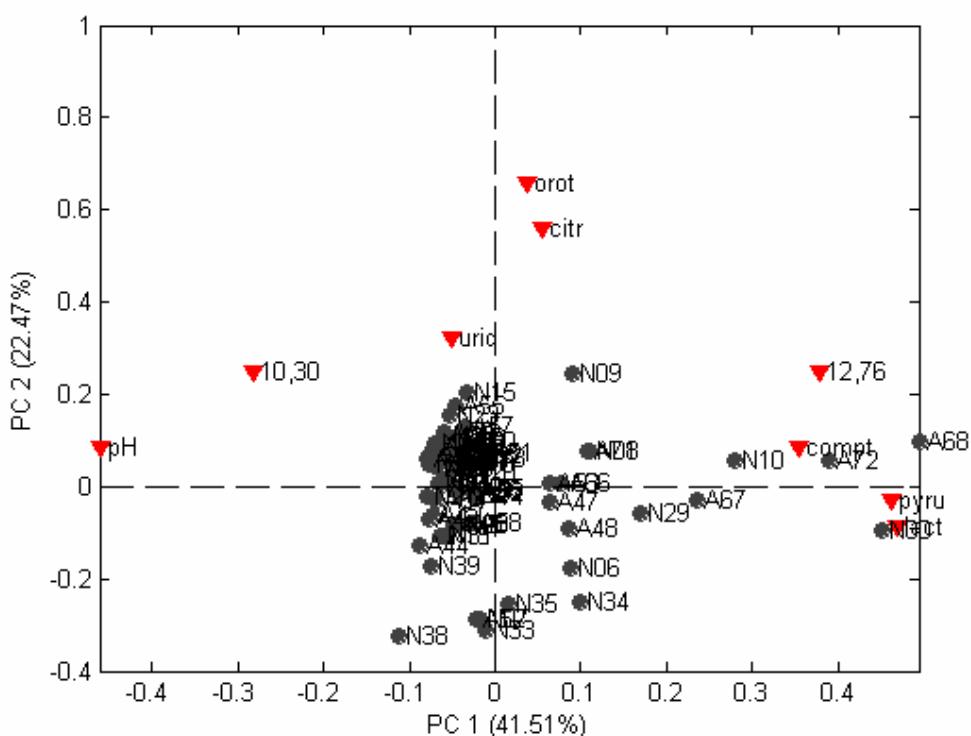


Figure 15-26. Projection des Delta spectres sur la carte factorielle des différents résultats obtenus : pH, comptages microbiologiques, déterminations chromatographiques (n = 75)

Dans cette carte, les échantillons contenant un antibiotique sont représentés par la lettre A, suivie de 2 chiffres se rapportant à l'échantillon et les échantillons n'en contenant pas sont représentés par la lettre N, suivie de deux chiffres se rapportant à l'échantillon.

Bien que la majorité des échantillons se trouvent rassemblés dans le centre du graphique, plusieurs zones peuvent cependant être distinguées d'un point de vue spectral (Delta spectre) sans pour autant pouvoir les rattacher à un type d'échantillons ou à un autre (**Figure 15-27**). La série [A66:A72] comprend des échantillons dopés à la sulfadiazine ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), échantillons qui se dénotent quelque peu par rapport au reste de la série. La série [N32:N39], échantillons non dopés, semblent former une autre série.

L'approche de l'analyse en composantes principales n'apparaît pas suffisamment puissante, du moins pour le nombre d'échantillons analysés, pour permettre la discrimination entre les échantillons contenant des antibiotiques et les autres. Pour les échantillons ne contenant pas de résidus d'antibiotiques, les premiers points des cinétiques sont assimilables aux échantillons dont le métabolisme est inhibé par une molécule antibactérienne.

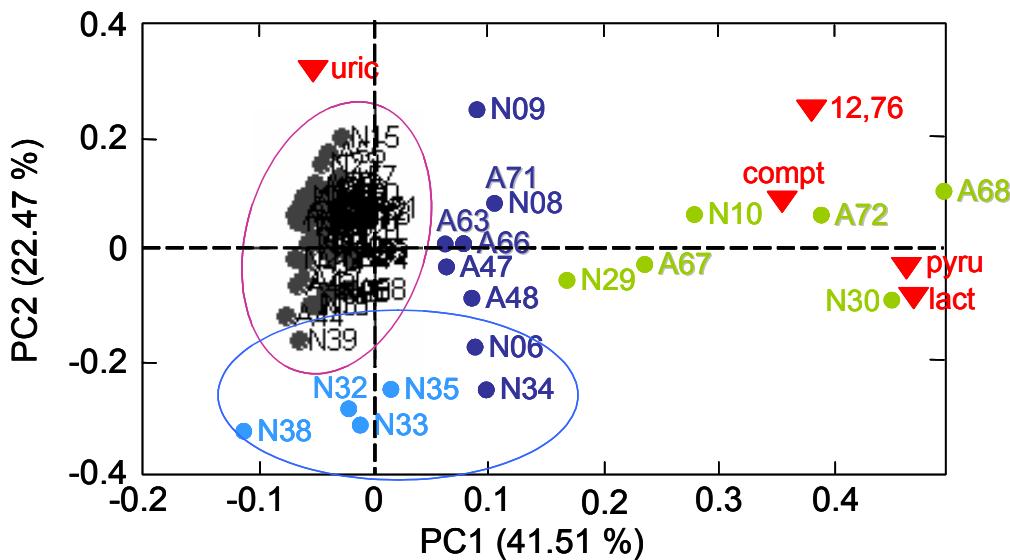


Figure 15-27. Projection des Delta spectres sur la carte factorielle des différents résultats obtenus : répartition en classes

En privilégiant cette approche, il est possible d'expliquer la position des échantillons N10, N29, N30, A72, et dans une moindre mesure A68, qui sont des échantillons de fin de cinétique, sans antibiotiques ou avec des antibiotiques inactifs à la concentration présente. Ces échantillons vont donc présenter un métabolisme qui les différencie des autres (simplement, présence de l'acide lactique).

L'analyse est basée dans ce cas, sur l'ensemble du Delta spectre. La réduction des données chromatographiques à l'indice de métabolisme M ([14.3.7. Mise en évidence, en microplaques, de l'activité antibactérienne de certains antibiotiques sur *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*](#)) et la réduction du spectre à l'indice de métabolisme M' auraient sans doute pu apporter une information complémentaire, permettant ainsi une meilleure discrimination.

15.5. Conclusions

Dans cette série d'essais, le potentiel de la spectrométrie dans le moyen infra rouge a été évalué dans le suivi du métabolisme de *Gsc*. Lors de l'usage d'une cellule de mesure à transmission, le métabolisme a pu être mis en évidence par le calcul d'un Delta spectre, correspondant à la soustraction du spectre T_T , mesuré après un temps T d'incubation, du spectre initial T_0 . Les variations observées dans le Delta spectre correspondent majoritairement à l'apparition de l'acide lactique, principal composé résultant du métabolisme de la souche (variations positives), et à la disparition du glucose, principal composé métabolisé (variations négatives).

Lors de l'utilisation de la cellule ATR, l'apparition d'un pic dû à la présence de dioxyde de carbone a pu être mis en évidence mais, ce paramètre, simple à mesurer, puisque dans une zone particulièrement pauvre en signal, ne peut être mis en relation avec le métabolisme de la souche test. Les résultats obtenus avec la cellule ATR sont, dans l'ensemble, beaucoup moins exploitables que les résultats obtenus avec la cellule à transmission.

L'activité d'antibiotiques à noyau β -lactame (pénicilline G et amoxicilline) a été suivie par le biais du Delta spectre, au cours de cinétique de 5 heures. A bout de cette période d'incubation, la souche est toujours inactive en présence de pénicilline G à une concentration de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, alors que la concentration de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'amoxicilline est nécessaire pour inhiber le métabolisme après les 5 heures d'incubation.

La synergie observée entre le triméthoprime et les sulfamides a été mise en évidence lors du suivi du métabolisme en présence de ces deux molécules. Une teneur de $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfamérazine ajoutée à une teneur de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triméthoprime a inhibé la croissance de la souche test. Ces deux concentrations seules ne présentent aucun effet sur la souche.

Le suivi par spectrométrie MIR du l'inactivation de la tétracycline par le carbonate de calcium présent dans le milieu a pu être réalisé : une teneur croissante en carbonate de calcium a conduit à l'inactivation de la tétracycline par chélation. Le métabolisme de la souche *Gsc* a été rétabli par le seul ajout de sel.

La mise en évidence de l'inhibition, lors de l'utilisation d'un indicateur de pH, est influencée par le pH initial du lait. L'étude de laits identiques mais dont le pH a été modifié a montré qu'une augmentation du pH, bien qu'entraînant un retard dans le virage de l'indicateur de pH, ne perturbait en rien le Delta spectre mesuré, l'intensité du métabolisme étant constante.

L'analyse en composantes principales des résultats obtenus pour différents paramètres (pH, comptages microbiologiques, dosages chromatographiques, spectres MIR) a corrélé de manière positive le comptage, le dosage des acides lactique et pyruvique et un composé non identifié, caractérisé par un temps de rétention de 12,76 minutes. Elle a corrélé de manière négative le pH des échantillons et un composé identifié par un temps de rétention de 10,30 minutes.

La projection des spectres MIR dans le même système d'ACP montre que les échantillons dont le métabolisme n'est pas inhibé, se distinguent des autres échantillons.

Un plus grand nombre d'analyses est cependant nécessaire pour développer un modèle qui soit exploitable. De plus, la configuration de spectromètre utilisé impose la mise en œuvre de volume d'échantillon important, raison pour laquelle la cellule ATR avait été envisagée. Afin de

poursuivre les recherches, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de fibres optiques de faible dimension, permettant l'analyse directement au sein de l'échantillon, en s'affranchissant ainsi des contraintes de volume mais aussi du caractère liquide indispensable lors du pompage de la matrice.

La spectromètre dans le moyen infra-rouge présente malgré tout un potentiel avéré lors de la mise en œuvre du métabolisme de la souche *Gsc*, utilisée dans la détection des antibiotiques dans le lait.

CHAPITRE 16 : SUIVI DU MÉTABOLISME DE *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* VAR. *CALIDOLACTIS* PAR SPECTROMÉTRIE DANS LE PROCHE INFRA-ROUGE

16.1. Introduction

Le suivi de l'inhibition de la croissance de la souche de référence, utilisée pour la mise en évidence de la présence de résidus d'antibiotiques, par spectrométrie dans le moyen infra-rouge a montré un potentiel intéressant. La configuration de l'équipement disponible au laboratoire a conduit à chercher une autre possibilité d'analyse, permettant l'analyse simultanée de plusieurs échantillons. Le choix s'est porté vers la spectrométrie proche infra-rouge (SPIR)

16.2. Objectif

L'objectif majeur de ces essais réside dans l'évaluation du potentiel de la spectrométrie dans le proche infra-rouge de suivre le métabolisme de *Gsc* en absence et en présence de molécules à activité antibactérienne. Ce suivi, notamment par le suivi de la production d'acide lactique, devrait permettre la détection de ces molécules à une limite se rapprochant de la LMR, en un temps bien déterminé.

Les résultats spectraux obtenus seront mis, dans la mesure du possible, en relation avec les résultats analytiques (dosage des différents acides et calculs de l'indice M) afin d'expliquer certaines évolutions spectrales.

16.3. Matériel et méthode

16.3.1. Equipement utilisé

Les différentes analyses ont été réalisées sur une caméra SPIR « Matrix NIR » (**Figure 16-1**), mesurant les spectres de 900 à 1700 nm. Dans une première configuration, la surface analysée est de l'ordre de 5 cm². La seconde configuration permet l'analyse d'une micro-plaque entière, en une seule mesure.

La taille de l'image, dans la première configuration est de 240 * 320 pixels, un pixel ayant une dimension de 50 µm de côté. A chaque pixel analysé est associé le spectre infra-rouge correspondant. Pour chaque image mesurée, un fichier reprenant 76.800 (320 * 240) spectres infra-rouge est généré.

Les spectres infra-rouges produits pour chaque mesure sont traités de manière à réduire les données et à les rendre exploitables.

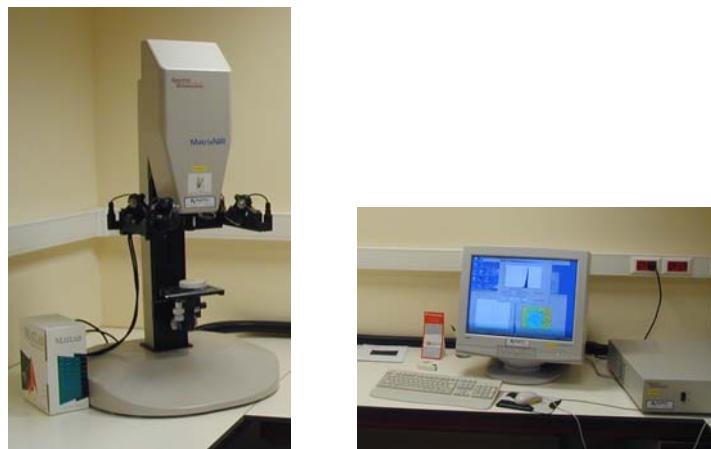


Figure 16-1. Caméra SPIR « Matrix »

16.3.2. Protocole de l'étude par caméra SPIR

16.3.2.1. Essais préliminaires

Un premier essai a été mis en place pour vérifier le potentiel de mise en évidence de l'acide lactique produit lors de la croissance de la souche de référence. Quelques trous d'une micro-plaque de Copan Milk Test ont été dopés au moyen d'eau et d'acide lactique en solution (**Figure 16-2**). La micro-plaque a été laissée à température ambiante de manière à permettre la diffusion des solutions dans la gélose, afin de rendre la mesure homogène.

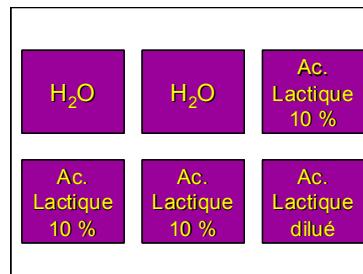


Figure 16-2. Essai préliminaire : répartition sur la micro-plaque Copan Milk Test

Un second essai a été mené pour estimer la visualisation du métabolisme de la souche de référence après 24 heures d'incubation. Deux échantillons ont été préparés (**Tableau 16-1**) et répartis aléatoirement dans une micro-plaque en nalgène. La micro-plaque ainsi préparée a été mise à incuber pendant 24 heures à 64°C. Une photo a été prise à la caméra SPIR au temps $T = 0$ et au temps $T = 24$ heures. Pour cet essai, seule la moitié de la micro-plaque est utilisée, la configuration de la caméra ne permettant pas de photographier l'entièreté de la micro-plaque.

Tableau 16-1. Essai préliminaire – visualisation du métabolisme après 24 heures d'incubation

Echantillon	Volume de lait (mL)	Volume de milieu (mL)	Volume de spore (mL)	Pénicilline	Nombre de puits
1	25	50	2,5	Oui ($20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	24
2	25	50	2,5	Non	24

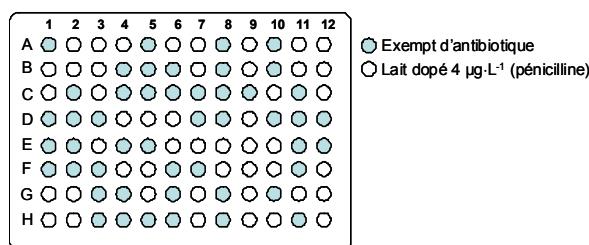
Un troisième essai a été mené pour évaluer l'homogénéité de l'éclairage de la micro-plaque. Pour mener à bien cet essai, deux nouvelles micro-plaques en quartz sont acquises : l'une est constituée d'un bloc de quartz transparent et fonds de puits transparents, l'autre est constituée d'un bloc en quartz noir avec les fonds de puits transparents. Ces deux micro-plaques sont dédiées à l'analyse en spectroscopie infra-rouge.

Deux échantillons sont préparés (**Tableau 16-2**) et répartis aléatoirement sur la micro-plaque. Ainsi, 48 puits sont affectés à chacun des échantillons. Cette répartition est différente pour les deux micro-plaques utilisées (Black et Transparente).

Tableau 16-2. Essai préliminaire – homogénéité de l'éclairage de la micro-plaque

Echantillon	Volume de lait (mL)	Volume de milieu (mL)	Volume de spore (mL)	Pénicilline	Nombre de puits
1	25	50	2,5	Oui ($4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	48
2	25	50	2,5	Non	48

La répartition mise en place pour la micro-plaque à bords noirs (*Black*) a été faite de manière aléatoire (**Figure 16-3**).

**Figure 16-3.** Essai préliminaire : homogénéité de l'éclairage – répartition sur la micro-plaque en quartz à bords noirs

16.3.2.2. Etude globale

La seconde série d'essais est destinée à vérifier le potentiel de la caméra pour la mise en évidence d'échantillons de lait contenant un inhibiteur (antibiotique ou sulfamide à différentes concentrations).

16.4. Résultats

16.4.1. Essai préliminaire

16.4.1.1. *Mise en évidence de l'acide lactique*

Dans ce premier essai, le potentiel de mise en évidence de l'acide lactique par la caméra SPIR a été évalué. La diffusion d'eau et de solution d'acide lactique au sein d'une micro-plaque de CMT a été mesurée (**Figure 16-4**).

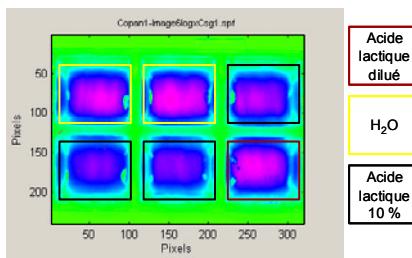


Figure 16-4. Essai préliminaire : diffusion de l'acide lactique dans la micro-plaque de CMT – photo prise à la caméra SPIR

Les résultats obtenus laissent entrevoir de légères différences dans la globalisation de la mesure spectrale. Ainsi, les trois puits contenant de l'acide lactique 10 % sont différenciés des puits contenant l'eau ou l'acide lactique dilué. Autour des puits gélosés, la forme trapézoïdale des puits de la micro-plaque montrent cependant une zone difficilement exploitable (interférences du plastique).

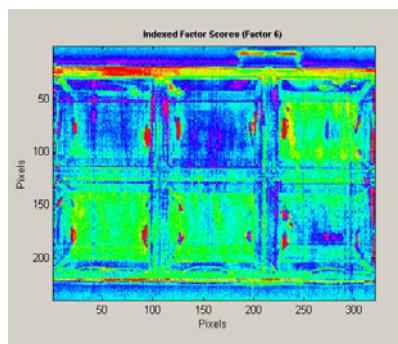


Figure 16-5. Diffusion de l'acide lactique dans la micro-plaque de CMT – *Indexed Factor Scores (Factor 6)*

Pour affiner ces résultats, un premier traitement est appliqué aux données brutes. Ce traitement permet de mieux différencier les différents échantillons (**Figure 16-5**).

A ce stade, la caméra, dans la configuration utilisée, semble permettre la distinction entre une eau ultra-pure, une solution d'acide lactique dilué et une solution d'acide lactique à 10 %. Il

est cependant important de réduire l'information de chaque puits à une zone interne éliminant l'interférence des bords.

Pour confirmer cette distinction et l'implémenter dans le suivi du métabolisme de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, l'inhibition bactérienne en présence de résidus antibiotiques a été suivie.

16.4.1.2. Mise en évidence de l'inhibition bactérienne

Lors de cet essai de mise en évidence de l'inhibition bactérienne, la souche de GSC a été placée en présence d'un lait contenant $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de pénicilline G. Les échantillons (lait blanc d'une part et lait dopé d'autre part), mélangés au milieu de croissance contenant les spores, ont été répartis aléatoirement dans les puits d'une micro-plaque Nalgène. La micro-plaque a été mise à incuber à $64^\circ\text{C} +/- 1^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. Au terme de cette incubation, une photo infrarouge a été prise à la caméra.

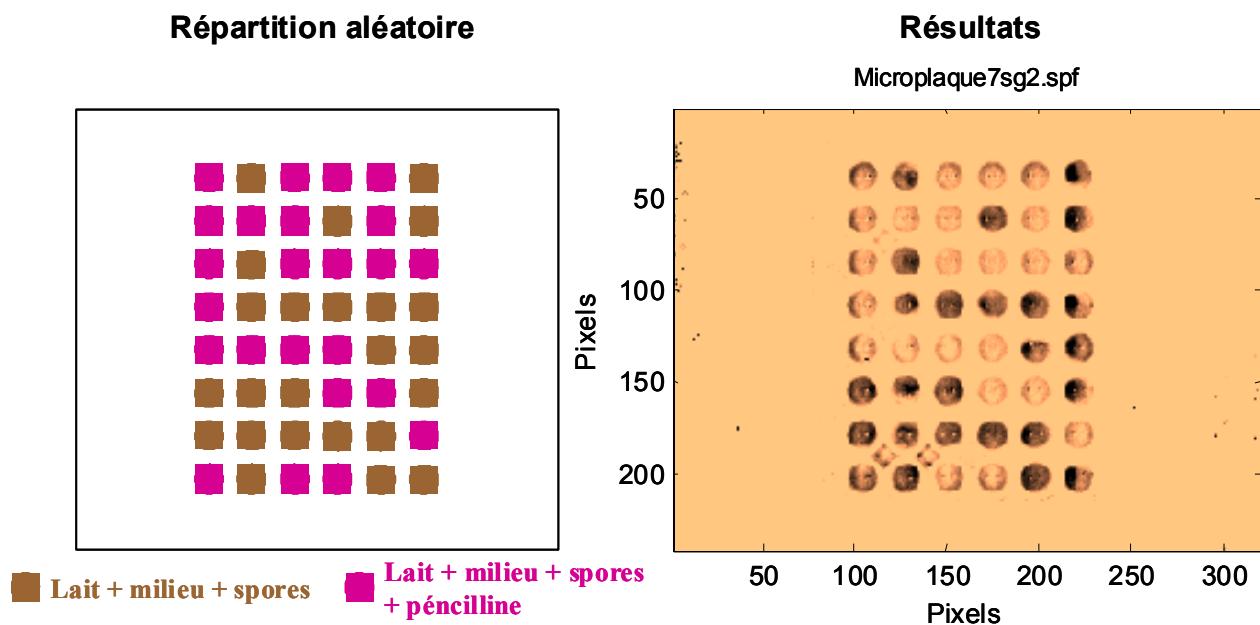


Figure 16-6. Mise en évidence de l'inhibition de *Gsc* après 24 heures d'incubation en présence de résidus de pénicilline G ($20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

16.4.2. Etude globale

Les résultats obtenus lors de l'étude globale ont montré que le système de caméra n'était suffisamment homogène pour permettre son implémentation dans un schéma tel que souhaité. Ainsi, lors du premier essai de confirmation de la mise en évidence de l'inhibition, les deux groupes attendus (lait non dopé d'une part et lait dopé à $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de pénicilline) n'ont pu être

dissociés. En effet, la répartition en deux groupes sur la microplaque s'est fait en fonction de la position et non plus en fonction de la croissance ou de la non-croissance de la souche bactérienne (**Figure 16-7**).

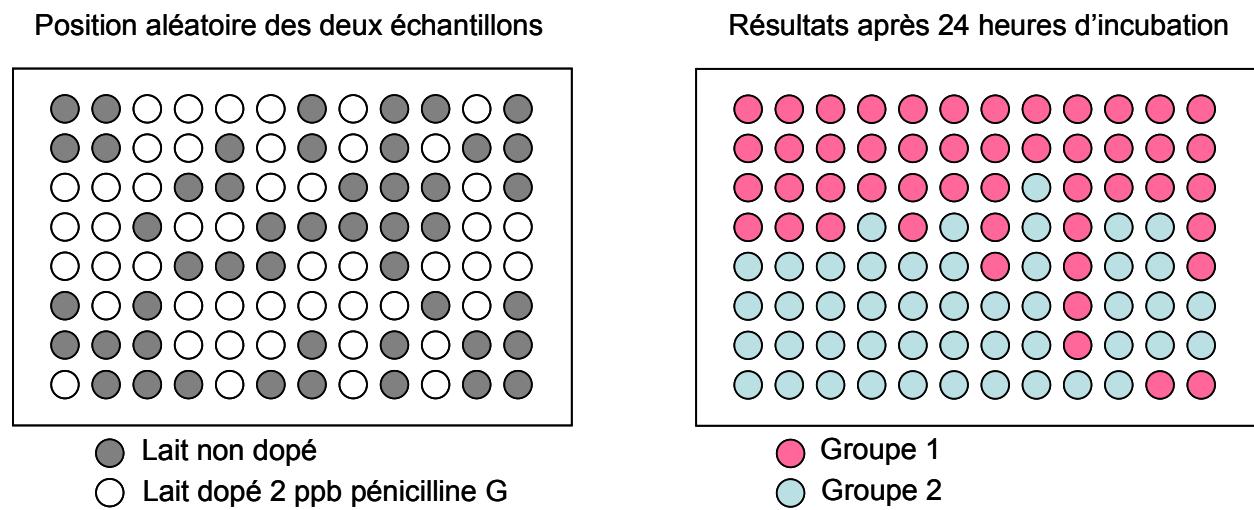


Figure 16-7. Mise en évidence de l'inhibition de *Gsc* après 24 heures d'incubation

L'ensemble des résultats obtenu lors de cette partie de l'étude a présenté le même profil.

16.5. Conclusions

Le potentiel de la caméra est indéniable mais le passage à des photos de plus grande taille conduit à une perte de l'homogénéité de l'éclairage. C'est cette différence qui est en fait mesurée sur ces grandes images. Il serait sans aucun doute intéressant de maintenir la prise de photos de plus petite taille afin de conserver l'homogénéité au sein même de l'image.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Evaluation de kits de détection disponibles pour les producteurs

Cette étude a montré la difficulté d'établir un délai d'attente valable pour tous les cas possibles. En effet, l'association de médicaments (injection de cocktails d'antibiotiques), l'usage prolongé d'une molécule ou un traitement plus important que préconisé par la notice, allongent généralement la période de rémanence des résidus dans le lait, quel que soit le mode d'injection et quelle que soit l'infection traitée. Il est donc fondamental de tenir compte de l'intensité du traitement pour fixer une période de retrait, période durant laquelle le lait est susceptible de donner une réponse positive lors de la détection des résidus inhibiteurs.

Le suivi régulier du lait prélevé sur des vaches ayant subi un traitement à base d'antibiotiques révèle la présence de résidus inhibiteurs dans le lait dans 65 % des cas étudiés. Ces résultats ne signifient pour autant pas que le lait ne respecte pas la législation en matière de LMR. En effet, la sensibilité des tests microbiologiques aux différentes molécules peut conduire à des résultats positifs pour des concentrations inférieures aux LMR.

Pour répondre au second objectif de l'étude, différents kits de détection, susceptibles d'être utilisés à la ferme pour prévenir la contamination du lait de collecte, ont été comparés. Les performances de ces kits sont particulièrement intéressantes. Cependant, il leur est difficile de répondre à l'ensemble de la législation en vigueur (LMR). Le respect de ces limites impose la conception de tests spécifiques, au moins par groupe de molécules. Dès lors, l'utilisation de ce type de tests est conditionnée par la connaissance précise des molécules mises en œuvre, sans quoi l'analyse peut conduire à une réponse totalement erronée. De plus, les tests basés sur l'inhibition bactérienne d'une souche de référence sont difficilement évaluables lorsque plusieurs molécules entrent en ligne de compte. Les effets de la combinaison des antibiotiques présents peuvent s'additionner (effet additif ou synergique) ou s'inhiber (effet antagoniste).

Delvotest SP : résultats faux positifs

Les résultats obtenus au cours de ces deux essais montrent la limite des tests microbiologiques utilisés dans la mise en évidence des substances inhibitrices. En effet, la modification de l'alimentation du troupeau (apport d'un complément minéral à une alimentation hivernale) a induit des réponses positives lors de l'application du Delvotest[®]SP.

Le complément minéral n'apparaît cependant pas comme le facteur directement responsable des réponses positives. Il semble plutôt jouer un rôle dans l'amplification d'un

phénomène déjà existant. Ce phénomène est lié à la ration alimentaire puisque la présence d'un aliment de type ensilage est nécessaire à l'induction des réponses positives.

Ces deux paramètres rejoignent les données observées sur le terrain : les problèmes surviennent dans les étables lors de la période hivernale lorsque les animaux sont à l'étable et reçoivent une alimentation à base d'ensilage.

Plusieurs paramètres devraient être étudiés afin de gérer ce problème. Il serait intéressant de varier la composition du complément minéral utilisé afin de cibler l'élément amplificateur. La même approche pourrait être appliquée aux autres parties de l'alimentation : ensilage de maïs, d'herbe, ... présentant différentes qualités. Le suivi de changements métaboliques induits par ces aliments pourrait être effectué sur le sang, le lait et au niveau du rumen. Pour effectuer ces suivis, il est cependant nécessaire d'établir une relation entre certains métabolites et les réponses positives.

Une dernière approche dans la limitation des problèmes engendrés par des réponses « faux-positifs » consiste à étudier le comportement du micro-organisme test utilisé dans la détection des antibiotiques (*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) lorsqu'il est mis en présence de laits particuliers (taux de cellules somatiques élevés, composition, début et fin de lactation, ...).

Les désinfectants

La chlorhexidine, molécule présentant des propriétés antibactériennes, est reprise dans l'annexe II du règlement 2377/90 (CE) du Conseil. Cette annexe liste les molécules pour lesquelles la définition d'une limite maximale de résidus (LMR) n'est pas nécessaire. L'utilisation de *Mamelo-1* pour désinfecter le pis de la vache laitière (usage topique du produit) permet d'appliquer la législation à la chlorhexidine qu'il contient.

La réalisation de dilutions successives dans du lait pasteurisé de *Mamelo-1* et d'une solution aqueuse de chlorhexidine a conduit à définir une limite de détection de $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (ppm) de chlorhexidine (sous forme digluconate) pour le Delvotest[®]MCS.

L'application de *Mamelo-1* en pré-traité n'a pas conduit à un résultat positif lors du test de mise en évidence de substances inhibitrices (Delvotest[®]MCS). Cette application a été effectuée au moyen d'un flacon de trempage et au moyen d'un pulvérisateur, avec et sans essuyage de la mamelle après application.

L'utilisation de Mamello-1 en pré-trempage ou en post-trempage n'est pas interférent dans la détection des substances inhibitrices. Il ne présente donc aucun risque de mise en œuvre.

Le Copan Milk Test, son évaluation

Cette étude avait pour objectif d'évaluer le CMT, test microbiologique utilisé pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait. Cette évaluation reprenait une étude d'homogénéité du test au travers différents lots, au sein de chacun des lots, la détermination de la sensibilité du test vis à vis de différents antibiotiques, le comportement du test vis à vis de laits crus de tank et la mise en évidence d'un effet éventuel de la pasteurisation (voir le protocole de détection des résidus inhibiteurs dans le lait suivi en Belgique dans le cadre officiel de la détermination de la qualité du lait).

Les essais menés dans le cadre de cette évaluation montrent que le temps d'incubation de trois heures est nécessaire pour réduire la variabilité des résultats, qu'il s'agisse de la détermination de la sensibilité du test ou de son comportement vis à vis des laits de ferme.

Le CMT présente une sensibilité proche de la LMR pour 5 des antibiotiques étudiés : pénicilline (LOD de $2,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour une LMR de $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), la cloxacilline (LOD de $21,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour LMR de $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), la tylosine (LOD de $26,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour une LMR de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), la sulfaméthazine (LOD de $97,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour une LMR de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et l'oxytétracycline (LOD de $144 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour une LMR de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Pour la dihydrostreptomycine, les concentrations initiales utilisées (basées sur des données de la littérature) n'étaient pas suffisamment basses pour déterminer la LOD. On peut cependant dire que le CMT détecte au moins $850 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DHS pour une LMR de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Le CMT présente une sensibilité équivalente à celle du Delvotest[®]MCS. Les conditions d'obtention de la meilleure sensibilité sont favorables au CMT. En effet, la durée d'incubation (fixée à 3 heures pour le CMT et variable pour chaque lot pour le Delvotest[®]MCS) et la température d'incubation ($64^\circ\text{C} +/- 1^\circ\text{C}$ pour le CMT et $64^\circ\text{C} +/- 0,5^\circ\text{C}$ pour le Delvotest[®]MCS) sont plus facilement maîtrisables au niveau du laboratoire.

En ce qui concerne l'homogénéité, un effet « Lot » est apparu lors des différents essais. Au cours du premier essai, un effet « Bloc » est aussi apparu. Cet effet n'a cependant pas pu être attribué à une variabilité entre blocs ou intra blocs, ces derniers étant constitués de plusieurs, microplaques. L'effet « Lot » a par ailleurs été mis en évidence sur le Delvotest[®]MCS lors d'essais antérieurs (Dehareng F. *et al.*, 2003).

La pasteurisation ne présente pas d'effet sur le résultat du test (exprimé sous la forme positif ou négatif). Par contre, l'utilisation des valeurs de Z conduit à un effet « Pasteurisation ».

Les résultats enregistrés pour les blancos montrent que la nature de ce blanco est importante. Les résultats obtenus pour les laits de ferme confirment ce fait. Il serait judicieux d'évaluer différents échantillons de lait avant de choisir le blanco à utiliser. De plus, la nature du blanco est importante lorsque l'échantillon a subi une pasteurisation : un effet pasteurisation a été mis en évidence. Il est donc normal de comparer les résultats obtenus pour un lait pasteurisé (échantillon en cours de confirmation) avec un blanco de même nature ou d'utiliser une valeur de Z adaptée.

Si les valeurs de Z obtenues pour les échantillons de lait de tank (crus) semblent élevées, le calibrage du scanner et sa stabilité de lecture pourraient être mis en cause. Une manière simple de vérifier cette stabilité est d'inclure, lors de chaque lecture, une carte de trois ou quatre couleurs dont la valeur de Z doit se trouver dans un intervalle donné. Cette tolérance serait déterminée lors de l'étalonnage du scanner (au moyen d'une carte colorimétrique de référence, type Kodak). Si la valeur de Z calculée pour ces trois ou quatre couleurs de référence ne correspond pas, le scanner doit être ré-étalonné. Dans le cas contraire, les valeurs relatives aux échantillons sont acceptées.

De la stabilité des standards utilisés

Le suivi des standards lors de leur conservation, par congélation ou par lyophilisation, a permis de mettre en évidence les limites de détection annoncées par la firme produisant le Delvotest®MCS étaient respectées avec une tolérance de 10 % (LOD +/- 10 %), et ce, tout au long de la période de conservation de 11 semaines, que ce soit par congélation ou par lyophilisation. Les variations observées pour les faibles concentrations lors de la conservation de la sulfadiazine par congélation ont été confirmées par méthode analytique (chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence). Bien qu'une diminution de la teneur en sulfadiazine ait été montrée aussi sur les échantillons lyophilisés, celle-ci ne s'est pas traduite dans les faits lors de l'analyse microbiologique. Cette étude sur la conservation des standards n'a pas pris en compte le paramètre « lait ». En effet, le suivi du pH lors de la conservation d'un lait cru par congélation montre une acidification du lait, paramètre interférant lors de la détection microbiologique des antibiotiques. Ce paramètre devrait faire l'objet d'études ultérieures, la congélation étant le mode de conservation des échantillons en vue d'une éventuelle nouvelle analyse.

Un test rapide, le Charm MRL BL

Les essais menés ont visés à évaluer le test *Charm MRL β-Lactame/Tétracycline* selon plusieurs paramètres :

- l'homogénéité au sein du même lot
- l'homogénéité entre lots
- la sensibilité du test à différentes molécules : pénicilline G, ampicilline, amoxicilline (groupe des antibiotiques à noyau β-lactame) – oxytétracycline, chlortétracycline (groupe des tétracyclines)
- les interférences microbiologiques : germes – cellules somatiques
- les interférences chimiques : différentes molécules susceptibles de se trouver dans le lait (antibiotiques d'autres groupes, désinfectants, antiparasitaire)
- la stabilité de la réponse du test sur des échantillons conservés par congélation

Tant au sein d'un même lot qu'entre plusieurs lots, il n'apparaît pas de différences significatives entre les interprétations des résultats obtenus sur lait cru et sur lait dopé. Il faudrait cependant étendre l'étude à des valeurs plus proches de zéro pour mieux appréhender cette homogénéité.

La sensibilité du test a été étudiée pour 5 molécules régulièrement rencontrées en médecine vétérinaire (**Tableau 11-30**).

Tableau 16-3. Limites de détection et incertitudes de mesure

Molécule	Limite de détection ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Incertitude élargie relative (%)	Incertitude élargie absolue ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Pénicilline G (commerciale)	< 1	10	0,1
Pénicilline G (Standard USP)	2	10	0,2
Amoxicilline	4	12	0,5
Ampicilline	2	16	0,3
Oxytétracycline	50	12	6
Chlortétracycline	50	12	6

Un taux de 10 % de faux positifs (6 résultats sur 60) a été obtenu lors de l'étude sur les limites de détection. Ce taux est nettement moindre pour l'ensemble de l'étude. Il est sans doute dû (4 des résultats faux positifs proviennent de la même série d'analyses) à un lait particulier ou à une erreur de manipulation.

Aucune interférence chimique ou biologique (cellules ou germes) n'a pu être mise en évidence. La réponse du test à des échantillons conservés par congélation est restée stable pendant 1 mois.

Développement d'outils analytiques : comptage rapide, HPLC sulfamides et HPLC métabolisme

L'objectif principal de ces essais résidait dans le développement d'une méthode de comptage rapide, permettant de mettre en évidence la croissance bactérienne de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, en s'affranchissant de la méthode de comptage sur boîte de pétri, particulièrement lourde à mettre en œuvre.

Cet objectif a été atteint en adaptant la méthode de dénombrement des germes dans le lait cru, une méthode basée sur le marquage des cellules par un composé fluorescent sur le comptage des impulsions générées par ce marquage, lors de l'excitation du marqueur par un rayonnement laser (BactoScan FC). Une équation de correction est établie entre les dénombrements réalisés par méthode sur boîte et le dénombrement calculé pour la technique rapide, celle-ci comptabilisant toutes les cellules, vivantes ou mortes. L'équation calculée, sur une centaine d'échantillons, conduit à un $R^2=0,88$. Les échantillons de validation permettent de rendre la droite utilisable dans le cadre de nos essais.

L'application de la technique rapide a montré l'efficacité de plusieurs antibiotiques, à la LMR, sur la souche utilisée. Ainsi, la benzylpénicilline et la cloxacilline présente un caractère bactéricide confirmé par les dénombrements réalisés sur boîte de pétri. Le caractère bactériostatique de la sulfadiazine et de l'oxytétracycline a été mis en évidence sur boîte de pétri alors qu'un simple ralentissement était constaté par le BactoScan FC. La dihydrostreptomycine, dernière molécule étudiée, ne présente aucune action sur la bactérie utilisée dans la détection des antibiotiques, tant à la concentration de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LMR) qu'à la concentration de $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (2^*LMR).

La volonté de contrôler le respect de la législation en matière de LMR et le souhait de relier les résultats positifs des tests de screening à la présence effective de molécules à action antibiotique imposent le développement de méthodes analytiques performantes. Dans ce

contexte, un outil alliant la séparation chromatographique et la spécificité de la réaction de fluorescence entre la fluorescamine et une amine primaire a été utilisé pour détecter, identifier et quantifier une dizaine de sulfamides dans le lait. La méthode développée, simple dans la préparation des échantillons, permet de séparer dix sulfamides, dont un ayant fonction de standard interne, en un temps d'analyse de 25 minutes. Les limites de quantification obtenues sur ces dix molécules varient entre <5 et $20 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ce qui permet de couvrir correctement la LMR des sulfamides ($100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

L'utilisation du standard interne compense la perte de fluorescence mesurée au cours de 24 heures de stockage des échantillons. Cette perte est acceptable (de l'ordre de 20 %) si les échantillons sont stockés à 4°C . Elle devient nettement plus importante (de l'ordre de 70 %) si le stockage se fait à température ambiante. Le choix d'un HPLC équipé d'un passeur d'échantillons thermostaté permet de programmer l'analyse de séries d'échantillons sans perte de sensibilité.

L'analyse d'échantillons de lait provenant d'animaux traités au moyen de sulfamides a montré que certaines notices présentaient des lacunes en matière de temps d'attente. Ainsi, des teneurs en sulfamides très élevées (de l'ordre de 10 fois la LMR) ont pu être mesurées dans les premières traites suivant l'application du Sulfaphénicol® alors que sa notice ne prévoyait pas de temps d'attente avant livraison du lait. Par contre, les mesures réalisées après l'application de Tétramidan® indiquent que le délai prévu dans la notice respecte la LMR.

L'analyse de d'échantillons de la filière (camions et laits de ferme) ayant donné une réponse positive à l'un ou l'autre test de screening ayant identifié la présence de sulfamides a permis de détecter différents sulfamides dont le plus important semble être la sulfadiazine. Il est cependant difficile de transposer ces résultats directement à la ferme et de conclure à l'utilisation prépondérante de médicament à base de sulfadiazine.

Dans les conditions opératoires données, le milieu ne présente pas d'évolution lorsqu'il est placé dans les conditions d'incubation du test (64°C pendant 3 heures).

Le principal indicateur du métabolisme reste l'acide lactique, résultant de la fermentation du glucose présent dans le milieu par *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. D'autres modifications du chromatogramme pourraient être utilisées comme indicateurs, mais pour quantifier le métabolisme, leur identification est nécessaire.

L'activité antibactérienne de plusieurs antibiotiques a pu être mise en évidence en définissant une limite de détection pour plusieurs d'entre eux. C'est ainsi que le suivi analytique du milieu de culture, conduit, après 5 heures d'incubation, aux limites suivantes :

- Pénicilline G : $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Cloxacilline : $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Oxytétracycline : $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Sulfadiazine : $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Tylosine : $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Dihydrostreptomycine : $750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Pour la pénicilline et la cloxacilline, la limite est inférieure à la LMR, ce qui peut se résoudre analysant un échantillon de lait après dilution. Par contre, pour les autres molécules, la limite de détection est supérieure aux LMR. Pour résoudre ce problème, il faudrait, par exemple, diminuer la quantité de souche présente dans le milieu ou, pour augmenter la sensibilité du test à la sulfadiazine, incorporer une quantité de triméthoprime, afin d'abaisser la limite de détection.

Suivi du métabolisme par infra-rouge (MIR et SPIR)

Dans cette série d'essais, le potentiel de la spectrométrie dans le moyen infra rouge a été évalué dans le suivi du métabolisme de *Gsc*. Lors de l'usage d'une cellule de mesure à transmission, le métabolisme a pu être mis en évidence par le calcul d'un Delta spectre, correspondant à la soustraction du spectre T_T , mesuré après un temps T d'incubation, du spectre initial T_0 . Les variations observées dans le Delta spectre correspondent majoritairement à l'apparition de l'acide lactique, principal composé résultant du métabolisme de la souche (variations positives), et à la disparition du glucose, principal composé métabolisé (variations négatives).

Lors de l'utilisation de la cellule ATR, l'apparition d'un pic dû à la présence de dioxyde de carbone a pu être mis en évidence mais, ce paramètre, simple à mesurer, puisque dans une zone particulièrement pauvre en signal, ne peut être mis en relation avec le métabolisme de la souche test. Les résultats obtenus avec la cellule ATR sont, dans l'ensemble, beaucoup moins exploitables que les résultats obtenus avec la cellule à transmission.

L'activité d'antibiotiques à noyau β -lactame (pénicilline G et amoxicilline) a été suivie par le biais du Delta spectre, au cours de cinétique de 5 heures. A bout de cette période d'incubation, la souche est toujours inactive en présence de pénicilline G à une concentration de

$1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, alors que la concentration de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'amoxicilline est nécessaire pour inhiber le métabolisme après les 5 heures d'incubation.

La synergie observée entre le triméthoprime et les sulfamides a été mise en évidence lors du suivi du métabolisme en présence de ces deux molécules. Une teneur de $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfamérazine ajoutée à une teneur de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triméthoprime a inhibé la croissance de la souche test. Ces deux concentrations seules ne présentent aucun effet sur la souche.

Le suivi par spectrométrie MIR du l'inactivation de la tétracycline par le carbonate de calcium présent dans le milieu a pu être réalisé : une teneur croissante en carbonate de calcium a conduit à l'inactivation de la tétracycline par chélation. Le métabolisme de la souche *Gsc* a été rétabli par le seul ajout de sel.

La mise en évidence de l'inhibition, lors de l'utilisation d'un indicateur de pH, est influencée par le pH initial du lait. L'étude de laits identiques mais dont le pH a été modifié a montré qu'une augmentation du pH, bien qu'entraînant un retard dans le virage de l'indicateur de pH, ne perturbait en rien le Delta spectre mesuré, l'intensité du métabolisme étant constante.

L'analyse en composantes principales des résultats obtenus pour différents paramètres (pH, comptages microbiologiques, dosages chromatographiques, spectres MIR) a corrélé de manière positive le comptage, le dosage des acides lactique et pyruvique et un composé non identifié, caractérisé par un temps de rétention de 12,76 minutes. Elle a corrélé de manière négative le pH des échantillons et un composé identifié par un temps de rétention de 10,30 minutes.

La projection des spectres MIR dans le même système d'ACP montre que les échantillons dont le métabolisme n'est pas inhibé, se distinguent des autres échantillons.

Un plus grand nombre d'analyses est cependant nécessaire pour développer un modèle qui soit exploitable. De plus, la configuration de spectromètre utilisé impose la mise en œuvre de volume d'échantillon important, raison pour laquelle la cellule ATR avait été envisagée. Afin de poursuivre les recherches, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de fibres optiques de faible dimension, permettant l'analyse directement au sein de l'échantillon, en s'affranchissant ainsi des contraintes de volume mais aussi du caractère liquide indispensable lors du pompage de la matrice.

La spectromètre dans le moyen infra-rouge présente malgré tout un potentiel avéré lors de la mise en œuvre du métabolisme de la souche *Gsc*, utilisée dans la détection des antibiotiques dans le lait.

Perspectives

Le développement de méthodes repose avant tout sur la technologie disponible. L'apparition de systèmes analytiques reculant les limites de détection et devenant de plus en plus rapides, permet d'envisager des systèmes multi-analytiques, pour lesquels le temps de préparation et d'analyse ne sont plus un obstacle. La qualification du personnel sera cependant de plus en plus poussée.

Des systèmes de spectrométrie de masse (TOF, tandem quadrupole) réduisent les coûts d'analyse, bien qu'étant très coûteux à l'investissement.

Les méthodes de screening de type microbiologique conservent leur place dans un contrôle très cadencé, mais l'apport de détecteurs analytiques devrait permettre d'améliorer encore leurs possibilités. Ainsi, un développement adéquat permettra de mettre en évidence la présence d'analytes révélant le métabolisme des bactéries. La spectrométrie infra-rouge montre un potentiel à investiguer. Différents axes sont cependant à préciser.

Le premier concerne le choix de la gamme spectrale. En effet, le moyen infra-rouge présente l'avantage de bandes spectrales mieux définies que le proche infra-rouge. L'identification de bandes d'intérêt sera donc plus facile dans le moyen infra-rouge que dans le proche. Cependant, il est nécessaire de travailler sur une configuration d'analyse réduisant les volumes à suivre. Ainsi, l'usage de fibres optiques, directement plongées dans un puits de micro-plaques, pourrait compenser efficacement le volume de milieu à suivre.

La mise au point de la détection par microscopie proche infra-rouge peut être ensuite envisagée, tout en prévoyant une automatisation de la lecture de la microplaquette. L'approche de discrimination par microscopie PIR doit permettre la définition des longueurs d'onde d'intérêt, correspondant notamment aux acides organiques résultant du métabolisme de la souche. Les longueurs d'onde ainsi définies seront transférées vers le troisième axe de travail, l'analyse par caméra PIR.

Le troisième axe potentiel concerne la configuration d'analyse à mettre en œuvre pour détecter la présence de l'acide dans le milieu de fermentation au moyen de la caméra. En effet, les résultats obtenus lors des deux séries de mesures à la caméra montrent plusieurs éléments importants à maîtriser avant de vouloir tester la croissance microbienne. Parmi ces éléments à maîtriser, la portion de la plaque analysée apparaît comme primordiale : lorsque la configuration de la caméra est en position haute, la répartition des résultats en deux groupes reflète la position du puits sur la plaque et non plus sa composition. Par contre, en configuration basse,

l'affectation des puits est correcte par rapport à leur nature. A ce stade, deux orientations sont donc possible : soit les développements sont réalisés en configuration basse et en privilégiant l'étude de la sensibilité du détecteur IR, le problème d'homogénéité de la plaque étant étudié lorsque la sensibilité est connue, soit l'homogénéité de la plaque est réglée avant toute autre chose. Un protocole expérimental doit être défini en intégrant dans un premier temps la limite de sensibilité de la caméra dans sa configuration optimale, à savoir la configuration basse. Cette mesure de la sensibilité doit se faire parallèlement à la définition du temps optimal d'incubation, de façon à définir un couple « Concentration – Temps d'incubation » par antibiotique. L'objectif final étant de réduire au maximum le temps d'incubation pour une concentration la plus proche possible de la LMR.

Parallèlement à ces développements spectroscopiques, l'optimisation de l'indicateur de métabolisme M, tel que défini pour l'HPLC, peut se poursuivre en transférant la méthode de dosage mise au point en HPLC à la technologie de l'UPLC. Ce faisant, les temps d'obtention des résultats analytiques seront considérablement réduits, permettant ainsi d'étoffer de manière significative la base des données de référence. L'utilisation d'un détecteur de type « spectromètre de masse » conduira à l'identification des composés encore inconnus, impliqués dans le calcul de cet indicateur.

D'autres voies de recherche sont envisageables. Ainsi, l'acide lactique, principal composé produit lors du métabolisme, pourrait être recherché au moyen de kits de dosage. La mise en œuvre de ces kits doit cependant être vérifiée sur ce milieu particulier constitué de lait, de spores et de substrat nutritif. A côté de ces kits, les nouveaux systèmes de présentation des échantillons dans le spectromètre de masse (DART, DESI) pourraient donner une réponse directe sur la présence de l'acide (Madhusudanan K.P., 2007). Ce genre d'analyseur doit cependant être associé à un calculateur mathématique puissant, permettant de déceler dans l'information spectrale obtenue les éléments conduisant à la mise en évidence de composés d'intérêt.

CHAPITRE 17 I
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ABABOUCH L., CHAIBI A. & BUSTA F.F. (1992). Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. *J. Food Prot.* **55**, 980-984

AFSSA (1999). www.anmv.afssa.fr/antibioresistance/rap-suivi-atb-1999-fin-Pub.pdf (2008-03-24)

AGARWAL V.K. (1992). High performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and effs. *J. Chromatogr.* **624**, 411-423

ALBRIGHT J.L., TUCKEY S.L. & WOODS G.T. (1961). Antibiotics in milk – a review. *J. Dairy Sci.* **44**, 779-801

ANDREW S.M. (2001). Effect of composition of colostrum and transition milk from Holstein heifers on specificity rates of antibiotic residue tests. *J. Dairy Sci.* **84**, 100-106

ANDREW S.M., FROBISH R.A., PAPPRE M.J. & MATURIN L.J. (1997). Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. *J. Dairy Sci.* **80**, 3050-3057

ANG C.Y.W., LUO W., CALL V.L. & RIGHTER H.F. (1997). Comparison of liquid chromatography with microbial inhibition assay for determination of incurred amoxicillin and ampicillin residues in milk. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4351-4356

ANONYME (1987). Règlement (CEE) n° 1898/87 du Conseil concernant la protection de la dénomination du lait et des produits laitiers lors de leur commercialisation, J.O. N° L182, 03.07.1987, 36-38

ANONYME (1994)^a. Arrêté royal du 17 mars 1994 – M.B. 06.05.1994

ANONYME (1994)^b. Arrêté ministériel du 17 mars 1994 – M.B. 06.05.1994

ANONYME (1994)^c. Arrêté ministériel du 14 octobre 1994 – M.B. 0.12.1994, p. 29854

ANONYME (1991). Décision 91/180/CEE de la Commission arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait cru et du lait traité thermiquement, J.O. N° L93, 13.04.1991, p. 1

ANONYME (2006). 21 DECEMBRE 2006. — Arrêté royal relatif au contrôle de la qualité du lait cru et à l'agrément des organismes interprofessionnels. MB 20070115. 1555-1560

ANONYME (2007). 1^{er} FEVRIER 2007. — Arrêté ministériel portant approbation du document établi par les organismes interprofessionnels agréés en ce qui concerne les modalités du contrôle de la qualité du lait cru de vache. MB 20070216. 7679-7683

BARKER, CA. (1945). Penicillin in Treatment of Bovine Mastitis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **9**, 235–243

BARROW P.A. (1989). Further observations on the effect of feeding diets containing avoparcin on the excretion of salmonellas by experimentally infected chickens. *Epidemiology and Infection* **102**, 239-252

BARTON M.D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews* **13**, 279-299

BAYO J., MORENO M.A., PRIETA J., DIAZ S., SUAREZ G. & DOMINGUEZ L. (1994). Chloramphenicol extraction from milk by using the diphasic dialysis method followed by liquid chromatographic determination. *J. AOAC Inter.* **77**, 854-856

BELL C. & SCANNELLA D. (1994). An evaluation of the lacTek beta-lactam milk screening kit. *Journal of the Society of Dairy Technology* **47**, 15-16

BELL C., RHOADES J.R., NEAVES P. & SCANNELLA D. (1995). An evaluation of the IDESS SNAP test for the detection of beta-lactam antibiotics in ex-farm raw milks. *Neth. Milk Dairy J.* **49**, 15-25

BELLAMY W., TAKASE M., WAKABAYASHI H., KAWASE K. & TOMITA M. (1992). Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 472-479

BENKERROUM N. (2008). Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 4856-4867

BENSON D.V. (1947). Treatment of bovine mastitis with tyrothricin, bacitracin, streptomycin and penicillin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **111**, 289-294

BENSON D.V. (1948). Treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis with bacitracin and penicillin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **113**, 160

BERGOGNE-BEREZIN E. (2001). Antibiotiques antibactériens : classification, principes et règles d'utilisation. *Rev. Prat.* **51**, 903-909

BERTRAND D (2000). Les méthodes d'analyse rapide dans les industries agro-alimentaires. In : La spectroscopie inra-rouge et ses applications analytiques. Ed by Bertrand D. et DufourE., Technique & Documentation, Paris, 3-28

BISHOP J.R., BODINE A.B. & O'DELL G.D. (1984). Retention data for antibiotics commonly used for bovine injections. *J. Dairy Sci.* **67**, 437-440

BOISSON J.O. & KENG L.J.-Y. (1998^a). Multiresidue liquid chromatographic method for determining residues of mono- and dibasic penicillins in bovine muscle tissues. *J. AOAC Int.* **81**, 1113-1120

BOISSON J.O. & KENG L.J.-Y. (1998^b). Improvement in the multiresidue liquid chromatographic analysis of residues of mono- and dibasic penicillins in bovine muscle tissues. *J. AOAC Int.* **81**, 1267-1272

BOOTH J.M. & HARDING F. (1986). Testing for antibiotic residues in milk. *Vet. Rec.* **119**, 565-569

BOXALL A.B.A., KOLPIN D.W., HALLING-SØRENSEN B. & TOLLS J. (2003). Are veterinary medicines causing environmental risk ? *Environ. Sci. Technol.* **37**, 287-294

BROUILLET P. (1992). Les résidus inhibiteurs dans le lait de vache à la production. *Bulletin des G.T.V.* **4**, 11-33

BRYAN C.S. (1951). Problems created for the dairy industry by antibiotic mastitis treatments. *J. Milk Food Techno.* **14**, 161

BURGULA Y., DHALI D., KIM S., KRISHMANAN S.S., COUSIN M.A., GORE J.P., REUHS B.L. & MAUER L.J. (2007). Review of mid-infrared Fourier transform infrared spectroscopy application for bacterial detection. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiology* **15**, 146-175

CARLQVIST J. & WESTERLUND D. (1985). Automated determination of amoxycillin in biological fluids by column switching in ion-pair reversed-phase liquid chromatographic systems with post-column derivatization. *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.* **344**, 285-296

CARLSSON A. & BJÖRCK L. (1987). The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. *Milchwiss.* **42**, 282-285

CARLSSON A. & BJÖRCK L. (1989). Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest SP. *J. Dairy Sci.* **72**, 3166-3175

CHERLET M., SCHELKENS M., CROUBELS S. & DE BACKER P. (2003). *Anal. Chim. Acta* **492**, 199-213

CLAESSENS P. (1993). Compendium des spécialités pharmaceutiques à usage vétérinaire. 7^{ème} éd. AGIM, Bruxelles

CONTRERAS A., PAAPE M.J., DI CARLO A.L., MILLER R.H. & RAINARD P. (1997). Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats. *J. Dairy Sci.* **80**, 1113-1118

CORPET D.E. (1996). Microbiological hazards for humans of antimicrobial growth promoters use in animal production. *Rev. Med. Vet.* **147**, 851-862

CORPET D.E. (2000). Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Rev. Med. Vet.* **151**, 99-104

CULLOR J.S., VAN EENENNAAM A., GARDNER I., PERANI L., DELLINGER J., SMITH W.L., THOMPSON T., PAYNE M.A., JENSEN L. & GUTERBOCK W.M. (1994). Performance of various tests used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. *J. AOAC Int.* **77**, 862-870

CUNNINGHAM F.E., PROCTOR V.A. & GOETSCH S.J. (1991). Egg white lysozyme as food preservative : an overview. *World's Poultry Sci. J.* **47**, 142

DANISH VETERINARY LABORATORY (1995). The effect of avoparcin used as a feed additive on the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in pig and poultry production. Copenhagen, Denmark : Danish Veterinary Laboratory

DANMAP 2003 (2003). www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2003.pdf (2008-03-24)

DAVIES T. (1998). The history of near infrared spectroscopic analysis : past, present and future – « From sleeping technique to the morning star of spectroscopy ». *Analisis Magazine* **26**, 7-12

DE LIGUORO M., POLTRONIERI C., CAPOLONGO F. & MONTESISSA C. (2007). Use of sulfadimethoxine in intensive calf farming : evaluation of transfer to stable manure and soil. *Chemosphere* **68**, 671-676

DEBACKERE M. (1995). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials in relation to their residues in milk. Proceedings du Symposium “ Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk ”, Kiel, Germany, 28-31 août 1995 - Monographie 9501 IDF-FIL - 41-53 – Bruxelles

DECROYENARE V., LECOMTE P., DEMARQUILLY C., AUFRERE J., DARDELINE P., STILMANT D. & BULDGEN A. (2009). Evaluation of green forage intake and digestibility in ruminants using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) : developing a global calibration. *Animal Feed Sci. Technol.* **148**, 138-156

DEHARENG F. (2007). Nouvelle réglementation concernant le contrôle de la qualité et de la composition du lait cru. Journée d'études « Laboratoire National de Référence » Lait et Produits laitiers – Bruxelles, 11 mai 2007 - http://www.favv-afscfa.fgov.be/labos/vorming/doc07/2007-05-11_Nouvelle-reglementation-lait-cru_fr.pdf (12/02/2009)

DEHARENG, F., ROMNEE, J.-M. AND VESELKO, D. (2003). Suivi de la variation de la sensibilité des Delvotest®MCS par le DelvoScan. Gembloux - Belgium, CRA-W. Rapport, 11p

DESSAUS Y., ELMERICH C. & FAURE D. (2004). La violacéine : une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chomobacterium violaceum*. *La Revue de Médecine interne* **25**, 659-662

DE WASH K., OKERMAN L., CROUBELS S., DE BRABANDER H. VAN HOOF J. & DE BACKER P. (1998). Detection of residues of tetracycline antibiotic in pork and chicken meat : correlation between results of screening and confirmatory test. *Analyst* **123**, 2737-2741

DIARRA M.S., CLOUTIER A., PERREE M. PETITCLERC D. & LACASSE P. (2000). Bovine lactoferrin affects growth, morphology and β -lactamase activity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mammary gland. 39th National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. 188-190

DUBOIS M., FLUCHART D., SIOR E. & DELAHAUT P. (2001). Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B, Biomed. Sci. Appl.* **753**, 189-202

DUBREUIL P., DAIGNEAULT J., COUTURE Y., GUAY P. & LANDRY D. (2001). Penicillin concentrations in serum, milk, and urine following intramuscular and subcutaneous administration of increasing doses of procaine penicillin G in lactating dairy cows. *Can. J. Vet Res.* **65**, 173-180

EDDER P., COMINOLI A. & CORVI C. (1997). Dosage de résidus de sulfamides dans des denrées alimentaires d'origine animale (foies, rognons, viandes, poissons, œufs, lait) par HPLC avec pré-dérivatisation et détection fluorimétrique. *Trav. Chim. Aliment. Hyg.* **88**, 554-569

EGAN J. & MEANEY W.J. (1984). The inhibitory effect of mastitic milk and colostrum on the test method used for antibiotic detection. *Ir. J. Food Sci. Technol.* **8**, 115-120

EITENMILLER R.R., FRIEND B.A. & SHAHANI K.M. (1976). Relationship between composition and stability of bovine milk lysosyme. *J. Dairy Sci.* **59**, 834-839

ENRIQUEZ B. (2000). Pharmacie et nutrition – Résidus de molécules à activité antibiotique et protection de la santé du consommateur – Notion de limite maximale et de temps d'attente. *Ann. Pharm. Fr.* **58**, 455-463

EUZEBY J.P. (2009). Abrégé de bactériologie générale et médicale. <http://www.bacteriologie.net/generale/sitesactionatbq.html> (15/02/2009)

FABRE J.M., MORETAIN J.P., ASCHER F., BROUILLET P. & BERTHELOT X. (1995). Main causes of inhibitors in milk – A survey in one thousand french dairy farms. Proceedings du Symposium “Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk”, Kiel, Germany, 28-31 août 1995 - Monographie 9501 IDF-FIL - pp 220-221 – Bruxelles

FAO (2009) http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa_index_fr.asp (10/04/2009)

FLETOURIS D.J., PSOMAS J.E. & BOTSGLOU N.A. (1990). Trace analysis of oxytetracycline and tetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1913-1917

FORM G. (2003). Les résidus inhibiteurs dans le lait – Evolution des méthodes de détections – Facteurs de risque en région Rhône-Alpes. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Claude-Bernard-Lyon I, 102 pp

FUMIERE O., VEYS P., BOIX A., VON HOLST C., BAETEN V. & BERBEN G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**, 59-70

GANGIDI R.R. & PROCTOR A. (2009). Meat and Meat Products. In Da-Wen Sun eds. In Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Amsterdam, Elsevier Academic Press, 181-214

GAUDIN V., HEDOU C. & SANDERS P. (2007) Validation of a Biacore method for screening eight sulfonamides in milk and porcine muscle tissues according to european decision 2002/657/EC. *J. AOAC Int.* **90**, 1706-1715

GERHARDT G.C., SALISBURY C.D.C. & MC NEIL J.D. (1994). Analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Inter.* **77**, 765-767

GILBERSTON T.J., MEJEUR R.L., YEIN F.S. & JAGLAN P.S. (1995). Modified microbiological method for the screening of antibiotics in milk. *J. Dairy Sci.* **78**, 1032-1038

GROPP J.M. & SHUMACHER A. (1997). Antimicrobial growth promoters in animal husbandry. In The medical impact of the use of antimicrobials in food animals, section 2.1.1.b. Geneva : WHO

GUEZENNEC J. (2004). Les bactéries des sources hydrothermales profondes à l'origine de nouvelles molécules bioactives ? *VertigO (La revue en sciences de l'environnement)* **5**, 1-7

GUSTAFSON R.H. & BOWEN R.E. (1997). Antibiotic use in agriculture. *J. Appl. Bacteriol.* **83**, 531-541

GUTZMAN F., LAYTON H., SIMKINS K. & JAROLMEN H. (1976). Influence of antibiotic-supplemented feed on occurrence and persistence of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected swine. *Am. J. Vet. Res.* **37**, 649-655

HAALAND M.A., MANSPEAKER J.E. & MORELAND T.W. (1984). Antibiotic residues in milk after intrauterine infusion. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **79**, 382-386

HADY P.J., LLOYD J.W. & KANEENE J.B. (1993). Antibacterial use in lactating dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **203**, 210-220

HALLING-SØRENSEN B., NORS NIELSEN S., LANZKY P.F., INGERESLEV F., HOLTEN LUTZHOFT H.C. & JORGENSEN S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substances in the environment - a review. *Chemosphere* **36**, 357-393

HALLING-SØRENSEN, B. (2001). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**, 451-460

HALLING-SØRENSEN, B., SENGELOV G. & TJØRNELUND J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmental relevant bacteria including selected tetracycline resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**, 263-271

HAMSCHER G., PAWELZICK H.T., SCZESNY S., NAU H. & HARTUNG J. (2003). Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm : a new source of health hazard for farmers ? *Environ. Health Perspect* **111**, 1590-1594

HEESCHEN W.H. & BLÜTHGEN A. (1991). Veterinary drugs and pharmacologically active compounds – “*Residues and contaminants in milk and milk products*”. **Monographie 9101 IDF-FIL** – pp 16-39 – Bruxelles

HEESCHEN W.H. & SUHREN G. (1995). IDF integrated detection system for antimicrobials : introductory statement and practical experiences in Germany – Proceedings du Symposium “*Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*”, Kiel, Germany, 28-31 août 1995 - **Monographie 9501 IDF-FIL** - pp 310-313 – Bruxelles

HEITZMAN R.J. (Ed.), Veterinary Drug Residues – Residues in Food Producing Animals and their Products : Reference Materials and Methods, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994

HERNANDEZ-ARTESEROS J.A., BARBOSA J., COMPAÑÓ R. & PRATT M.D. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A* **945**, 1-24

HOEK K.S., MILNE J.M., GRIEVE P.A., DIONYSIUS D.A. & SMITH R. (1997). Antibacterial activity in bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 54-59.

HUNTER G.J. (1949). The effect of penicillin on lactic streptococci. *J. Dairy Research* **16**, 39-45

INGERSLEV F., TORÄNG L., LOKE M.L., HALLING-SØRENSEN B. & NYHOLM N. (2001). Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. *Chemosphere* **44**, 865-872

JACOBSEN A.M. & HALLING-SØRENSEN B. (2005). Multi components analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosine in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioana. Chem.* **44**, 865-872

JAUREGUI-ADELL J. (1975). Heat Stability and Reactivation of Mare Milk Lysozyme. *J. Dairy Sci.*, **58**, 835-838

JESPERSEN B.M. & MUNCK L. (2009) Cerals and Cereal products. In Da-Wen Sun eds. In Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Amsterdam, Elsevier Academic Press, 276-319

JOHNS C.K. (1953). Differences in sensitivity of lactic starters to antibiotics. *J. Dairy Sci.* **36**, 1241-1247

JONES A.D., BRULAND G.L., AGRAWAL S.G. & VASUDEVAN D. (2005). Factors influenning the sorption of oxytetracycline to soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 761-770

JUILLARD V., SPINNER H.E., DESMAZEAUD M.J. & BOQUIEN C.Y. (1987). Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait* **67**, 149-172

KABARA J.J., SWIECZKOWSKI D.M., CONLEY A.J. & TRUANT J.P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**, 23-28

KATZ S.E. & SIEWIERSKI M. (1995). *Bacillus stearothermophilus* disc assay : a review. *J. AOAC Inter.* **78**, 1408-1415

KATZNELSON H. & HOODS E.G. (1949). Influence of penicillin and other antibiotics on lactic streptococci in starter cultures used in cheddar cheesemaking. *J. Dairy Sci.* **32**, 961-968

KAUFMANN A., BUTCHER P. MADEN K. & WIDMER M. (2008). Quantitative UPLC-TOF multiresidue method for 100 different veterinary drugs. Proceedings EuroResidue VI " Conference on residues of veterinary drugs in food ", Egmond aan Zee, The Netherlands, 19-21 mai 2008 - pp 87-91

KAUKAS A., HINTON M. & LINTON A.H. (1988). The effect of growth-promoting antibiotics on the faecal enterococci of healthy young chickens. *J. Appl. Bacteriol.* **64**, 57-64

KAWAMURA S., KAWASAKI M., NAKATSUJI H. & NATSUGA M. (2007). Near infrared spectroscopic sensing system for online monitoring of milk quality during milking. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, **1**, 37-43

KEMPER N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* **8**, 1-13

KEYS J. E., PEARSON R. E. & WEINLAND B. T. (1979). Starter culture, temperature and antibiotic residue in fermentation of mastitic milk to feed dairy calves. *J. Dairy Sci.* **62**, 1408-1414

KORHONEN H. (1977). Antimicrobial factors in bovine colostrum. *J. Sci. Agric. Soc. Fin.* **49**, 434-447

KORHONEN H., MARNILA P. & GILL H.S. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *Br. J. Nutr.* **84**, Suppl. 1, S75-S80

KOSIKOWSKI F.V. & O'LEARY M. (1963). Natural inhibitory characteristics of some irish manufacturing milks. *J. Dairy Sci.* **46**, 89-94

KOSIKOWSKI F.V. (1963). Induced and natural inhibitory behavior of milk and significance to antibiotic disc assay testing. *J. Dairy Sci.* **46**, 95-101

KOSIKOSKI F.V. & JIMENEZ-FLORES R. (1985). Removal of penicillin G from contaminated milk by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.* **68**, 3224-3233

KUBALEC P., BRANDSTETEROVÁ & BEDNARIKOVA A. (1997). Determination of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin in milk, meat and cheese samples using HPLC and precolumn derivatization. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **205**, 85-88

LACASSE P., LAUZON K., DIARRA M.S. & PETITCLERC D. (2008). Utilization of lactoferrin to fight antibiotic resistant mammary gland pathogens. *J. Anim. Sci.* **86**, 66-71

LAL J., PALIWAL J.K., GROVER P.K. & GUPTA R.C. (1994). Determination of ampicillin in serum by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *J. Chrom. B Biomedical Appl.* **655**, 142-146

LALOUX J., DEGELAEN J., COLART P. & HELLEMAN P. (1982). Procédé enzymatique pour la détection rapide d'antibiotiques à noyau β -lactame dans le lait. *Lait* **62**, 720-728

LALOUX J., ROMNEE J.M., MARIN C. & VAN WIJNSBERGH D. (1996). Determination of eight sulfonamides using HPLC method with fluorescence derivatization. *Milchwiss.* **51**, 517-520

LATEUR M. (2002). Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **6**, 67-77

LEE M.Z.P. & RICHARDSON T. (1987). Preparation and characterization of immobilized β -lactamase for destruction of penicillin in milk. *J. Dairy Sci.* **70**, 2032-2039

LINDEMAYR H., KNOBLER R. & KRAFT D. (1981). Challenge of penicillin-allergic volunteers with penicillin-contaminated meat. *Allergy* **36**, 471-478

MADHUSUDANAN K.P. (2007). Direct analysis in real time (DART) – A new ionisation technic. Proceedings of 12th ISMAS Symposium. Workshop on Mass Spectrometry. Cidade de Goa, Dona Paula, Goaj, 25-30 mars 2007

MARIEY L., SIGNOLLE J.P. & TRAVERT A.J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vib. Spectrosc.* **26**, 151-159

MARTEL J.L. & CHASLUS-DANCLA E. (2000). Aspects pratiques de la résistance aux antibiotiques en médecine vétérinaire. *Med. Mal. Infect.* **30**, 173-177

MARTEL J.L. & CHASLUS-DANCLA E. (2001). Utilisation des antibiotiques chez les animaux d'élevage. *Rev. Prat.* **51**, 9-12

MARTINET J. & HOUDEBINE L.-M. (1993). Biologie de la lactation, collection Mieux comprendre, Les éditions INSERM – INRA éditions, pp 504-505

MC MANUS P.S., STOCKWELL V.O., SUNDIN G.W. & JONES A.J. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 443-465

MEDINA M.B., POOLE D.J. & ANDERSON M.R. (1998). A screening method for β -lactams in tissues hydrolysed with penicillinase I and lactamase II. *J. AOAC Int.* **81**, 963-972

MITCHELL J.M., GRIFFITHS M.W., MC EWEN S.A., MC NAB W.B. & YEE A.J. (1998). Antimicrobial drug residues in milk and meat : causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *J. Food Prot.* **61**, 742-756

MOATS W.A. & HARIK-KHAN R. (1995). Liquid chromatographic determination of β -lactam antibiotics in milk : a multiresidue approach. *J. AOAC Inter.* **78**, 49-54

MOATS W.A. (1999). Confirmatory test results on milk from commercial sources that tested positive by β -lactam antibiotics screening tests. *J. AOAC Int.* **82**, 1071-1076

MUSSER J.M.B. & ANDERSON K.L. (1999). Using drug residues screening tests to investigate antibiotic contamination of milk. *Vet. Med.* **94**, 474-479

MUSSER J.M.B., ANDERSON K.L. & MOATS W.A. (2001). Screening method for identification of β -lactams in bovine urine by use of liquid chromatography and a microbial inhibition test. *Am. J. Vet. Res.* **62**, 326-330

NAIR M.K. M., JOY J., VASUDEVAN P., HINCKLEY L., HOAGLAND T.A. & VENKITANARAYANAN K. S. (2005). Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* **88**, 3488-3495

NAUMANN D. (1984). Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given FTIR. *Infrared Physics* **24**, 233-238

NINANE V., DE REU K., OGER R., REYBROECK W. & GUYOT A. (2000). Evaluation du BactoScan FC pour la numération des bactéries du lait cru, *Lait* **80**, 527-538

NONNECKE B.J. AND SMITH K.L. (1984). Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by in vitro microassay of bacterial growth. *J. Dairy Sci.* **67**, 606-613.

OFAG (2009). Office général de l'agriculture - <http://www.blw.admin.ch/themen/00012/00519/00521/index.html?lang=fr> (24/02/2009)

PAYNE K.D., OLIVER S.P. & DAVBIDSON P. M. (1994). Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food Prot.* **57**, 62-65

PENA A.L.S., LINO C.M. & SILVEIRA I.N. (1999). Determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in milk by liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *J. AOAC Inter.* **82**, 55-60

PERKINS K.L., LOWELL C.R., BRONK B.V., SETLOW B., SETLOW P. & MYRICK M.L. (2004). Effects of autoclaving on bacterial endospores studied by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **58**, 749-753

PERKINS K.L., LOWELL C.R., BRONK B.V., SETLOW B. & SETLOW P. (2005). Fourier transform infrared reflectance microspectroscopy study of *Bacillus subtilis* engineered without dipicolinic acid : the

contribution of calcium dipicolinate to the mid-infrared absorbance of *Bacillus subtilis*. *Appl. Spectrosc.* **59**, 893-896

PERRAUDIN J.P. (1991). Protéines à activités biologiques : lactoferrine et lactoperoxidase. Connaissances récemment acquises et technologies d'obtention. *Lait* **71**, 191-211

PRESKOTT J.F. & BAGGOT J.D. (1993). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 2nd ed.. 564-565. Ames, IA : Iowa State University Press

RASKIN P., ROMNEE J.M., KERROUR M., DUFRASNE I. & ISTASSE L. (1997). Présence d'inhibiteurs de *Bacillus stearothermophilus* dans le lait de vaches non soumises à un traitement antibiotique. *in* : 4^{èmes} Rencontres, Recherches, Ruminants, Paris 4-5 décembre 1997. Institut de l'Elevage, Paris, France pp-291

RHODES G., HUYS G., SWINGS J., MC GANN P., HINEY M., SMITH P. & PICKUP R.W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between Aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3883-3890

RIEDIKER S., DISERENS J.M. & STADLER R.H. (2001). Analysis of β -lactam antibiotic in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4171-4176

ROMNEE J.M. (1995). Evaluation of methods for determinating antibiotics in raw milk : Delvotest SP, Valio T 101 and Penzym S. Proceedings du Symposium "Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk", Kiel, Germany, 28-31 août 1995 - Monographie 9501 IDF-FIL - pp 220-221 – Bruxelles

ROMNEE J.M. (1996). Les contaminants du lait. Cours laitiers pour cadres. Confédération Belge de l'Industrie Laitière (CBL)

ROMNEE J.M., RASKIN P., ISTASSE L., LALOUX J. & GUYOT A. (1999). Incidence de facteurs alimentaires sur l'obtention de faux positifs lors de la détection des antibiotiques dans le lait par le Delvotest SP®. *Lait* **79**, 341-346

ROMNEE J.M. (2007). Le contrôle des antibiotiques dans le lait de ferme : hier et aujourd'hui. Journée d'études « Laboratoire National de Référence » Lait et Produits laitiers – Bruxelles, 11 mai 2007 - http://www.favv-afscfa.fgov.be/labos/vorming/doc07/2007-05-11_controle_antibiotiques_lait_de_ferme_fr.pdf (2009-02-12)

ROMNEE J.M. (2008). Detection of β -lactams and of tetracyclines in milk : evaluation of the Charm MRL β -lactam/Tetracyclin test. Proceedings EuroResidue VI "Conference on residues of veterinary drugs in food", Egmond aan Zee, The Netherlands, 19-21 mai 2008 - pp 861-865

ROTH F.X. & KIRCHGESSNER M. (1994). The influence of avialmycin and tylosin on faecal excretion of nitrogen and amino acids in growing pigs. *Agrobiology Res.* **47**, 147-155

ROUESSAC ET ROUESSAC (2004). Analyses chimiques. Méthodes et techniques instrumentales modernes. In Rouessac F. & Rouessac A., ed. Dunod. Paris

RULE R., MORENO L., SERRANO J.M., ROMAN A.G., MOYANO R. & GARCIA J. (2001). Pharmacokinetics and residues in milk of oxytetracyclines administered parenterally to dairy goats. *Aust. Vet. J* **79**, 492-496

SACHETELLI S., BEAULAC C. & LAGACE J. (1998). Aminoglycoside detection using a universal ELISA binding procedure onto polystyrene microtiter plates in comparison with HPLC analysis and microbiological agar-diffusion assay. *Biochimica et Biophysica Acta* **1379**, 35-41

SCANNELLA D., NEAVES P., KEEDY K. & BELL C. (1997). An evaluation of the Delvo X-Press β L test for detecting β -lactams in ex-farm raw milks. *Int. Dairy J.* **7**, 93-96

SCHLEGELOVA J. & RYSANEK D. (2000). Effects of heat-processing of milk on validation characteristics of the charm AIM-96 and Delvotest SP screening tests. *Vet. Med. – Czech.* **45**, 201-207

SCHMITT H., STOBB K., HAMSCHER G., SMIT E. & SEINEN W. (2005). *Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils : microcosm and field studies*. Microbial Ecology, on-line publication - DOI: 10.1007/s00248-006-9035-y & * Springer Science+Business Media, Inc. 2006

SCHOFIELD F.W. (1946). Penicillin in the treatment of mastitis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **10**, 63-70

SCHWARZ S. & CHASLUS-DANCLA E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* **32**, 201-225.

SEYMOUR E.H., JONES G. M. & MC GILLIARD M. L. (1988^a). Comparisons of on-farm screening tests for detection of antibiotic residues. *J. Dairy Sci.* **71**, 539-544

SEYMOUR E.H., JONES G. M. & MC GILLIARD M. L. (1988^b). Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **71**, 2292-2296

SINNAEVE G., VAN REUSEL A., LATTEUR M., AGNEESSENS R. & DARDENNE P. (1996). FTIR analysis of liquid food stuffs : milk and fruit juices. Meditorean Dairy Conference, Nice, France, 3-4 octobre 1996

SINNAEVE G. (2001). Utilisation de la spectrométrie dans le proche infra-rouge pour le suivi de réactions de biotransformation. Thèse de doctorat, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, 5030 Gembloix (Belgique), 204 p

SMOLA N. & URLEB U. (2000). Qualitative and quantitative analysis of oxytetracycline by near infrared spectroscopy. *Analytica chimica Acta* **410**, 203-210

SOYEURT H., BRUWIER D., ROMNEE J.M., GENGLER N., BERTOZZI C., VESELKO D. & DARDENNE P. (2009). Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.* **92**, 2444-2544

SPRONG R.C., HULSTEIN M.F.E. & VAN DER MEER R. (2002). Bovine milk fat components inhibit food-borne pathogens. *Int. Dairy J.* **12**, 209-215

STOKESTAD E.L.R. & JUKES T.H. (1950). The multiple nature of the animal protein factor. *J. Bio. Chem.* **180**, 647-654

SUHREN G. & BEUKERS R. (1998). Delvotest SP for detection of cloxacillin and sulfamethxazole in milk : IDF interlaboratory study. *J. AOAC Inter.* **81**, 978-990

TAKEDA N. & AKIYAMA Y. (1992). Rapid determination of sulphonamides in milk using liquid chromatographic separation and fluorescamine derivatization. *J. Chromatogr.* **607**, 31-35

TAYLOR D.J. (1999). The pros and cons of antimicrobial use in animal husbandry. *Baillière's Clinical Infectious Diseases* **5**, 269-287

THOMKE S. & ELWINGER K. (1997). Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants in pigs and poultry. Report to the Commission on Antimicrobial Feed Additives. Uppsala, Sweden : Swedish University & Agricultural Sciences

TSENKOVA R., ATANASSOVA S., ITO K., OZAKI Y & TOYODA K. (2000). Near infrared spectroscopy for biomonitoring : cow milk composition measurement in a spectral region from 1.100 to 2.400 nanometers. *J. Anim. Sci.* **78**, 515-522

VAKIL J.R., CHANDAN R.C., PAARY CR. M. & SHAHANI K.M. (1969). Susceptibility of several microorganisms to milk lysozymes. *J. Dairy Sci.* **52**, 1192-1197

VAN DE VOORT F.R., SEDMAN J., EMO G. & ISMAIL A.A. (1992). A rapid FTIR quality control method for fat and moisture determination in butter. *Food Research Inter.* **25**, 193-198

VAN EENENNAAM A.L., CULLOR J.S., PERANI L., GARDNER I.A., SMITH W.L., DELLINGER J. & GUTERBOCK W.M. (1993). Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* **76**, 3041-3053

VAN REUSEL A., SINNAEVE G., LALOUX J. & LHOIR J. (1996). The monitoring of thermophilic lactic fermentation by fourier transform infrared interferometry. Mediterean Dairy Conference, Nice, France, 3-4 octobre 1996

VAN RHIJN H. (2004). LC-MSMS analysis of veterinary drug residues. Waters Food Safety Summit – 19-22 Avril 2004, Wageningen, The Netherlands

VERBEKE W. & VIAENE J. (1996). Environmental impact of using feed additives. Report. Ghent, Belgium : University of Ghent

VIAL F. (1993). Les inhibiteurs dans le lait – Etude du taux de pollution des laits : enquête chez les éleveurs de la région Rhône-Alpes. Thèse de doctorat, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, Lyon (France), 171 p

VIV' O-TRUYOLS G. (2005), New strategies for optimisation and data treatment in HPLC. PhD thesis, University of Valencia

WICKER K, REISMAN R.E. & ARBESMAN C.E. (1969). Allergic reaction to penicillin in milk. *JAMA*, **208**, 143-145

WILMET A. (2000). Analyse de jus de fruit par spectroscopie dans le proche et le moyen infra-rouge. Mémoire de graduat. Haute Ecole Charleroi Europe, Fleurus, Belgique

WORKMAN J.J. (1992). Nir spectroscopy calbration basics. In Handbook of near infrared analysis. Eds by D.A. Burns and E.W. Ciurczak, Marcel Dekker, New Yord, 247-280

YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D. & OUAR KORICH M.N. (2001). Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb* **91**, 13-14

CHAPITRE 18 A

Dr Vétérinaire :

Producteur : *NOM* :

RUE *N°* :

CODE POSTAL : *LOCALITE* :

TELEPHONE :

Identification de l'animal : Race :

Produit injecté : Mode d'injection : Dose :

Produit injecté : Mode d'injection : Dose :

Produit injecté : Mode d'injection : Dose :

Mode d'injection : intra-musculaire (Imu), intra-mammaire (Ima), intra-utérin (Iut), intra-veineux (Ive), autre : à préciser

Pathologie :

Date et heure d'injection :

Heure de la traite : matin : soir :

Si traitement au tarissement : Date de l'application du traitement :

Durée du traitement :

Date du vêlage :

NNEXE 1 : FICHE DE SUIVI DE TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES À LA FERME

CHAPITRE 19 A
 NNEXE 2 : DOCUMENTS ET PRÉSENTATIONS RÉALISÉS EN RAPPORT AVEC CE
 TRAVAIL

Publications scientifiques

ROMNEE J.M. (1995)

“ *Determination of residues after antibiotics therapy* ”

poster présenté au Symposium “ Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk ”, Kiel, Germany, 28-31 août 1995

Monographie 9501 IDF-FIL - pp 102-103 - Bruxelles 1995

ROMNEE J.M. (1995)

“ *Evaluation of methods for determinating antibiotics in raw milk : Delvotest SP, Valio T 101 and Penzym S* ”

poster présenté au Symposium “ Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk ”, Kiel, Germany, 28-31 août 1995

Monographie 9501 IDF-FIL - pp 220-221 - Bruxelles 1995

LALOUX J., ROMNEE J.M., MARIN C., VAN WIJNSBERGH D. (1996)

“ *Determination of eight sulfonamides using HPLC method with fluorescence derivatization* ”

Milchwissenschaft (1996) 51 (9), 517-520

RASKIN P., ROMNEE J.M., KERROUR M., DUFRASNE I., ISTASSE L. (1997)

“ *Présence d'inhibiteurs de *Bacillus stearothermophilus* dans le lait de vaches non soumises à un traitement antibiotique* ”

in : 4^{èmes} Rencontres, Recherches, Ruminants, Paris 4-5 décembre 1997. Institut de l'Elevage, Paris, France pp-291

ROMNEE J.M., RASKIN P., ISTASSE L., LALOUX J., GUYOT A. (1999)

“ *Incidence de facteurs alimentaires sur l'obtention de faux positifs lors de la détection des antibiotiques dans le lait par le Delvotest SP[®]* ”,

Le Lait (1999) 79 (3), 341-346

ROMNEE J.M. (2008)

“ *Detection of β -lactams and tetracyclines in milk : evaluation of the Charm MRL β -Lactam/Tetracyclin test* ”

poster présenté à la conference EuroResidue VI, Egmond aan Zee, The Netherlands, 19-21 mai 2008

EuroResidue VI Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food Proceedings - pp 861-865 – 2008

Publications techniques

ROMNEE J.M.,

“ *Les résidus d'antibiotiques dans le lait à la production* ”

Elevage et Santé, 15 février 1995

ROMNEE J.M.,

“ *Les résidus antibiotiques dans le lait et la pratique vétérinaire* ”

Vétérinaria 1996

ROMNEE J.M.

“ *Résidus et contaminants dans le lait et dans les produits laitiers* ”

in : Cours laitier pour cadres - Etude et technologie laitière 1996-1997

Confédération Belge de l'Industrie Laitière (C.B.L.)

ROMNEE J.M.

“ *Identification et dosage des antibiotiques à noyau β -lactame : utilisation de l’HPLC* ”
in : 2^{ème} Carrefour des Productions Animales : la filière LAIT, Gembloux, 22 janvier 1997

LALOUX J., ROMNEE J.M., MARIN C., VAN WIJNSBERGH D.

“ *Détermination par HPLC des sulfamides dans le lait après dérivatisation à la fluorescamine* ”
in : 2^{ème} Carrefour des Productions Animales : la filière LAIT, Gembloux, 22 janvier 1997

ROMNEE J.M.

“ *Contrôle de l’absence d’antibiotiques dans les aliments* ”
in : 4^{ème} Carrefour des Productions Animales : *Les démarches de qualité en production de viandes : Pourquoi ? Pour qui ?,* Gembloux, 27 janvier 1999 pp P23-P24

ROMNEE J.M. ET NINANE V.

“ *Qualité sanitaire et libre circulation du lait : contribution du DPQA au respect de la Directive 92/46 CEE du Conseil* ”
in : 5^{ème} Carrefour des Productions Animales : *Quels systèmes de productions animales pour le 21^{ème} siècle ?,* Gembloux, 26 janvier 2000 pp P30-P31

DANNAU M., ROMNEE J.M., J. LALOUX ET G. LOGNAY

“ *Analyse des sulfamides dans les aliments pour animaux : HPLC couplée à la fluorimétrie* ”
in : 5^{ème} Carrefour des Productions Animales : *Quels systèmes de productions animales pour le 21^{ème} siècle ?,* Gembloux, 26 janvier 2000 pp P32-P33

ROMNEE J.M.

“ *Résidus et contaminants chimiques dans le lait et dans les produits laitiers* ”
in : Cours laitier pour cadres - Etude et technologie laitière 2001
Confédération Belge de l’Industrie Laitière (C.B.L.)

Présentations**ROMNEE J.M. (2000)**

“ *Antibiotiques dans la filière lait : situation et perspectives* ”
Journée d’études « Santé humaine, santé animale : du Bon usage des antibiotiques en agriculture » – Ciney - Belgique
13 avril 2000

ROMNEE J.M. (2007)

“ *Le contrôle des antibiotiques dans le lait de ferme : hier et aujourd’hui* ”
Workshop - Laboratoire National de Référence « Lait et produits laitiers » – Bruxelles
11 mai 2007
(http://www.favv-afscfa.fgov.be/labos/vorming/doc07/2007-05-11_controle_antibiotiques_lait_de_ferme_fr.pdf)

ROMNEE J.M. (2008)

“ *Réflexions sur de nouvelles méthodes de détection des antibiotiques dans le lait* ”
Journée d’informations – **LNR Lait et produits laitiers** – Bruxelles
19 juin 2008

ROMNEE J.M. (2008)

“ *EuroResidues VI* ”
Journée d’informations – **LNR Lait et produits laitiers** – Bruxelles
19 juin 2008

ROMNEE J.M., DEHARENG F. (2008)

“ *Situation in Belgium : protocol of detection and guidance of the interprofessional organizations* ”
Workshop on European legislation and methods for antibiotics detection in milk – Belgrade (Serbie) –
25 septembre 2008
<http://ino.komora.net/LinkClick.aspx?fileticket=x9p3LyeCmlo%3D&tabid=2180&mid=7889>

ROMNEE J.M. (2008)

“ *Residues and contaminants in milk and milk products* ”
Workshop on European legislation and methods for antibiotics detection in milk – Belgrade (Serbie) –
25 septembre 2008
<http://ino.komora.net/LinkClick.aspx?fileticket=HWE7UKN8nxU%3D&tabid=3922&mid=7771>

Rapports**ROMNEE J.M.,**

“ *Utilisation et efficacité à la ferme des kits de détection pour antibiotiques dans le lait cru* ”
rapport final Contrat U.E. (B.I.R.B., ex-O.B.E.A.) n°619/93/96627

ROMNEE J.M.,

“ *Etat des lieux : situation en Wallonie pour les antibiotiques dans le lait cru de collecte - année 1996* ”
rapport réalisé pour le Fonds de la Santé des Animaux (Ministère des Classes Moyennes et de l’Agriculture)
Décembre 1996

ROMNEE J.M.,

“ *Etat des lieux : situation en Wallonie pour les antibiotiques dans le lait cru de ferme, le lait cru de collecte, dans les poudres de lait et dans les laits de consommation - année 1997* ”
rapport réalisé pour le Fonds de la Santé des Animaux (Ministère des Classes Moyennes et de l’Agriculture)
Décembre 1997

ROMNEE J.M., REYBROECK W.

“ *Etat des lieux : situation en Wallonie pour les antibiotiques dans le lait cru de ferme, le lait cru de collecte, dans les poudres de lait et dans les laits de consommation - année 1998* ”
rapport réalisé pour le Fonds de la Santé des Animaux (Ministère des Classes Moyennes et de l’Agriculture)
Janvier 1999

ROMNEE J.M., REYBROECK W.

“ *Etat des lieux : situation en Wallonie pour les antibiotiques dans le lait cru de ferme, le lait cru de collecte, dans les poudres de lait et dans les laits de consommation, dans les laits de chèvres et de brebis - année 2000* ”
rapport réalisé pour le Fonds de la Santé des Animaux (Ministère des Classes Moyennes et de l’Agriculture)
Mars 2001

ROMNEE J.M., REYBROECK W.

“ *Etat des lieux : situation en Wallonie pour les antibiotiques dans le lait cru de ferme, le lait cru de collecte, dans les poudres de lait et dans les laits de consommation, dans les laits de chèvres et de brebis - année 2001* ”
rapport réalisé pour le Fonds de la Santé des Animaux (Ministère des Classes Moyennes et de l’Agriculture)
Mars 2002

ROMNEE J.M., REYBROECK W.

“Etat des lieux : situation en Wallonie pour les antibiotiques dans le lait cru de ferme, le lait cru de collecte, dans les poudres de lait et dans les laits de consommation, dans les laits de chèvres et de brebis - année 2002”

rapport réalisé pour le Fonds de la Santé des Animaux (Ministère des Classes Moyennes et de l’Agriculture)

Mars 2003

DEHARENG F., GENARD O., GRIJSPEERDT K., REYBROECK W., ROMNEE J.M., VAN CROMBRUGGE J.M., VAN ROYEN G., VESELKO D.

“Rapport d'utilisation du Delvo®Scan : système de lecture automatique des plaques de détection des substances inhibitrices”

Octobre 2003

DEHARENG F., ROMNEE J.M., VESELKO D.

“Suivi de la variation de la sensibilité des Delvotest® MCS par le Delvo®Scan”

Octobre 2003

ROMNEE J.M., REYBROECK W., S. OOGHE

“Etat des lieux : situation en Wallonie pour les antibiotiques dans le lait cru de ferme, le lait cru de collecte, dans les poudres de lait et dans les laits de consommation, dans les laits de chèvres et de brebis - année 2003”

rapport réalisé pour le Fonds de la Santé des Animaux (AFSCA)

Mars 2004

ROMNEE J.M., DEHARENG F., OGER R.

“Rapport d'évaluation du Copan Milk Test dans le cadre de la détermination des résidus d'antibiotiques dans le lait”

rapport rédigé dans le cadre d'une étude réalisée pour le compte de la société Copan SA et transmis à l'AFSCA dans le cadre de la détermination officielle de la qualité du lait (critère « inhibiteurs »)

Mars 2005

ROMNEE J.M.

“Évaluation du test Charm MRL β -Lactame/Tétracycline (détection des β -lactames et des tétracyclines dans le lait)”

rapport rédigé dans le cadre d'une étude réalisée pour le compte de la société Charm Sciences Inc.
Août 2007