

**Plan d'appui scientifique à la recherche prénormative dans le
secteur alimentaire dans un contexte de développement durable**

**Stratégie intégrée d'analyse qualitative et
quantitative des résidus de substances
antimicrobiennes dans les denrées alimentaires**

Guy MAGHUIN-ROGISTER, Amaya JANOSI and Vincent HELBO,
Université de Liège (ULg)

Carlos VAN PETEGHEM, Ellen SANDERS and Nico VAN EECKHOUT,
Universiteit Gent (UG)

Marc CORNELIS and Martine JOURET,
Institute of Veterinary Inspection, Brussels (IEV/IVK)

Contrat NP/12/35

Services scientifiques du premier Ministre
Affaires scientifiques, techniques et culturelles
(SSTC)

TABLE DES MATIERES

<u>1. EXECUTIVE SUMMARY</u>	4
<u>1.1 . STANDARDISATION OF HORMONE AND VETERINARY DRUG RESIDUE ANALYSIS IN ANIMAL PRODUCTS</u>	4
<u>1.2 . INTEGRATED STRATEGY FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF RESIDUES OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES IN FOOD PRODUCTS</u>	4
<u>2. RESUME OPERATIONNEL</u>	10
<u>2.1 LA NORMALISATION DE L'ANALYSE DES RÉSIDUS D'HORMONES ET DE MÉDICAMENTS À USAGE VÉTÉRINAIRE DANS LES PRODUITS ANIMAUX</u>	10
<u>2.2 STRATÉGIE INTÉGRÉE D'ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES RÉSIDUS DE SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES</u>	10
<u>3. INTRODUCTION</u>	19
<u>3.1 CADRE GÉNÉRAL DE LA RECHERCHE</u>	19
<u>3.2 BUT DU PROJET</u>	20
<u>3.3 DESCRIPTION DU PROJET</u>	20
<u>3.4 PARTENAIRES</u>	22
<u>3.5 RELATIONS AVEC D'AUTRES LABORATOIRES OU INSTITUTIONS AUX NIVEAUX NATIONAL ET INTERNATIONAL</u>	22
<u>3.5.1 CRIOC : Centre de recherche et d'information des organisations de consommateurs</u>	22
<u>3.5.2 Autres utilisateurs potentiels des résultats</u>	22
<u>4. RÔLE DE L'INSTITUT D'EXPERTISE VÉTÉRINAIRE (IEV/IVK)</u>	24
<u>5. RÔLE DE L'UNIVERSITÉ DE GAND (RUG)</u>	24
<u>5.1.1 Onderzoek uitgevoerd aan de Universiteit Gent</u>	24
<u>6. RÔLE DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE (ULG)</u>	26
<u>6.1 FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES ANALYSÉS</u>	27
<u>6.2 MISE AU POINT DES MÉTHODES</u>	27
<u>6.2.1 β-lactames</u>	27
<u>6.2.2 Quinolones</u>	39
<u>6.2.3 Macrolides</u>	47
<u>6.2.4 Phénicolés</u>	51
<u>6.3 APPLICATION SUR DES ÉCHANTILLONS RÉELS</u>	56
<u>6.4 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS ULG</u>	57
<u>7. CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU PROJET ET RECOMMANDATIONS</u>	58
<u>8. ANNEXES</u>	60
<u>8.1 ANNEXES AU RAPPORT DE L'ULG</u>	60
<u>8.1.1 Liste des publications et communications</u>	60
<u>8.1.2 Résultats détaillés (tableau, figures)</u>	63

<u>8.1.3</u>	<u><i>Normes /législations existantes</i></u>	100
<u>8.1.4</u>	<u><i>Méthodologie in extenso, etc.</i></u>	103
<u>8.2</u>	<u>ANNEXES AU RAPPORT DE L'UNIVERSITÉ DE GAND</u>	113
<u>8.2.1</u>	<u><i>Liste des publications et communications</i></u>	113
<u>8.2.2</u>	<u><i>Rapport détaillé</i></u>	117

1. EXECUTIVE SUMMARY

In the framework of the “Scientific Support Plan for a Sustainable Development Policy in the field of Standards for Food Products”, we have developed two actions :

1.1 . Standardisation of hormone and veterinary drug residue analysis in animal products

(March 1997 – February 1998))

A new database was created which provides a carefully judged inventory of analytical methods available for the determination of residues of growth promoters (steroidal anabolic hormones, β -agonists and glucocorticoids) and veterinary drugs (antibiotics and growth inhibitors), which are or will be regulated by the European Union legal acts.

Other parts of the database involve informations on:

- legislation (Belgian and European),
- toxicological aspects of residues,
- statistics of controls performed by the authorities (Ministry of Agriculture and Institute of Veterinary Expertise – IEV – of the Ministry of Public Health).

This database is available on the Internet at: <http://139.165.180.63/OSTC/>

1.2 . Integrated strategy for the qualitative and quantitative analysis of residues of antimicrobial substances in food products

(from March 1998 to February 2001)

The project aimed at demonstrating the feasibility of such an integrated strategy. The strategy is based on the availability of appropriate immunoassays or other biochemical tests and of suitable chemical methodology which is considered commonly available to a well equipped control laboratory.

A pilot methodology for the identification, the confirmation and the quantitative determination of residues of commonly encountered antibacterial substances in animal tissue and products is set up. After thorough validation in agreement with the internationally accepted standards, the methodology have been applied in practice on real samples collected in slaughterhouses by IEV meat inspectors. These samples had been considered as positive for the presence of antibacterial agents after testing with the “New Belgian Kidney Test”. We received also from IEV kidney and meat samples from animals recognized as negative for the presence of antibacterial substances in their kidney according to the official control. These samples were used as “blanks” to set up our methods of analysis and during their validation in our quality controls.

Presently in Belgium, the test which is applied to determine if a food sample is positive or negative for the presence of antibacterial substances, is the “Belgian Kidney test”. This “pre-screening” microbiological test, which is applied on kidneys of slaughtered animals, is based on the antibacterial activity of antibiotics. It only allows to detect the presence of inhibiting substances in kidney exsudate. But it does not allow the identification of the inhibiting substances nor the quantification of their concentrations in edible parts of the animal carcass, particularly in skeletal muscles (meat). To make progress in the application of MRLs, it is thus necessary to apply simple and rapid methods which could allow the

identification of antimicrobial substances. These “new” methods will thus complete the results obtained from the kidney test in order to establish if the antibacterial substance is permitted or banned in animal products and to determine if its concentration is compatible with the MRL regulation.

An efficient system for the control of antibacterial residues should consist of four stages:

1. Pre-screening at the level of the slaughterhouses by means of a microbiological test for the presence of bacterial growth inhibiting substances. This phase is already fully operational in Belgium (Belgian kidney test).
2. Selective screening of the positives, obtained sub 1, by means of immunoassays in order to come to an identification of the group of growth inhibitors (sulphonamides, beta-lactams, tetracyclins, aminoglycosides, macrolides, (fluoro)quinolones, phenicols)
3. Chemical identification (using GC, GC/MS, HPLC/UV, LC/MS methods) within the group of the individual growth inhibitors.
4. Quantitative assay of the identified residue in view of the established Maximum Residue Limit (Council Regulation N° 2377/90).

The latter three phases are not yet operational due to the lack of an adequate analytical strategy.

The project aims at demonstrating the feasibility of such an integrated strategy. After a thorough literature search and owing to our developing expertise in the framework of *part 1* of the project, it became clear that such a system does not yet exist. The selection of the antibacterials which have to be analysed was based on the previous experience of both laboratories involved in this project in the determination of given families of antibacterial agents and the availability of appropriate immunoassays, or other biochemical tests, and of suitable physicochemical methodology, which is commonly available to a well equipped laboratory.

The antibacterials which were most often found as residues in animal products belong to one of the following seven families of substances: beta-lactams, (fluoro)quinolones, macrolides, chloramphenicol, tetracyclines, aminoglycosides and sulphonamides.

Previous experience of the services of the Ministry of Public Health in the control of residues in animal products has shown that sulphonamides, tetracyclines and beta-lactam antibiotics are the most often detected antibacterials in kidney and meat. For this reason, only samples which were found positives in the kidney test but negative for these 3 families, have been analysed for the presence of chloramphenicol, aminoglycosides and macrolides.

The objectives of the two projects were the following:

RESULTS

University of Ghent work package

The antibacterial families which were studied in Ghent involved: sulphonamides, tetracyclines and aminoglycosides.

Sulphonamides

Screening

As no multiresidue ELISA kit was available on the market for sulphonamides, High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) was selected as screening method. After development in HPTLC, the spots corresponding to the residues were still visible at

concentrations lower than the MRLs (100 µg/kg). The extraction yield was very high and no interferences were noted. This technique allows the determination of 30 samples per day and per analyst. A total of 161 samples (kidney + muscle) were analysed with this method, from which 21 (13%) were found positive for the presence of sulphonamides.

Confirmation by LC-MS/MS

A simple extraction procedure was adopted. After optimization of the chromatography as well as the mass spectrometry conditions, the method was validated taking into account the following parameters: linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for kidney as well as for meat samples. It appeared that this method is in agreement with the quality criteria defined in the European Union for analysing residues in food.

From the 42 samples (kidney and muscle) found positive in the screening phase, 28 (67%) were confirmed by GC-MS/MS without ambiguity. This corresponds to about 1/3 of the samples considered as positive after the screening but which were found in reality false positive when MRL values are taken in consideration.

Tetracyclines

Screening

The applicability of the commercial Ridascreen tetracycline kit (R-Biopharm) was tested. A total of 104 meat and 99 kidney samples, which had been found positive in the Belgian Kidney test, were analysed. For the meat samples, 28 (27%) appeared to contain more than 100ppb tetracyclines (MRL value). For the kidney samples, 13 were considered as positive at this stage. This represents a total of 41 positive samples.

Confirmation by LC-MS/MS

A simple extraction procedure was adopted. The analyses were performed on the same apparatus as used for sulphonamides. After optimization, the method was validated using the same criteria as for sulphonamides.

From the 41 samples (kidney and muscle) found positive in the screening phase, 20 were confirmed by GC-MS/MS without ambiguity. This corresponds to about half of the samples considered as positive after the screening but which were found in reality false positive when MRL values are taken in consideration.

Aminoglycosides

Screening

Neomycin was selected as representative of this large group of antibiotics. Actually, it is a mixture of 3 different forms: neomycine A, B and C. Several assay kits are available. The EIA kit from Euro-Diagnostica was finally selected after a short comparison study.

Large variations were observed in the results and it was not possible to overcome this problem within the time allowed by this research. The difficulties are probably due to unreproducibility of the extraction yields.

From the remaining samples that had not been found positives for sulphonamides nor tetracyclines, namely 65 kidneys and 66 meat samples, 7 (11%) kidneys and 5 (8%) meat samples were tested as positive in screening. Due to the lack of precision of the results, it was not possible to compare to the neomycin MRL value.

Confirmation by LC-MS/MS

Due to the difficulties encountered with the yield of extraction, it was considered that the optimization of the LC-MS/MS method of analysis was not possible at this stage.

University of Liège work package

The antibacterial families which were studied in Liège involved: beta-lactam antibiotics, macrolides and chloramphenicol. During the course of this contract, (fluoro)quinolones were also considered taking into account their particular importance in the problem of the increase of antibacterial resistance to antibiotics.

Beta-lactam antibiotics

Screening

We have adapted, validated and use, for analysing this type of residues in kidney and meat, a new test on strip, Beta-STAR (UCB Bioproducts), marketed for the antibiotic monitoring in milk. For animal tissue analysis, the strip test was preceded with a solid phase extraction (hydroxyapatite columns) of contaminating proteins in the aqueous extract. In these conditions, penicilline G, ampicilline and amoxicilline are detected at concentrations close to their MRLs. For oxacilline and cloxacilline, they are detected concentrations lower than LMR/2.

Confirmation / quantification

High performance liquid chromatography (HPLC) was selected as the analytical method for confirming the presence of beta-lactams in kidney or meat samples and for their quantitation. It was observed that it is mandatory to adopt special working conditions to avoid degradation of these substances during the analytical process. LOD was evaluated to 15 and 75 µg/kg according to the type of compound. LOQ is 25 µg/kg for penicilline G, amoxicilline and ampicilline and 150 µg/kg for oxacilline and cloxacilline. This method of analysis is thus well suited for penicilline G, amoxicilline and ampicilline (MRL = 50 µg/kg) and for oxacilline and cloxacilline (MRL = 300 µg/kg).

From the remaining samples that had not been found positives for other antibacterials, namely 17 kidney samples examined, only one was positive in screening and confirmed for ampicilline at 1553 µg/kg.

Macrolides

Screening

The method used for the detection of macrolide residues was a radio-receptor assay developed and validated in our laboratory. This technique was applied for analysing kidney and meat samples collected by IEV meat inspectors.

Confirmation / quantification

A LC-MS/MS method was developed and partly validated.

From the 17 kidney samples examined, only one was positive in screening and the presence of spiramycine was confirmed at 93.5 µg/kg.

Chloramphenicol

Screening

The ELISA Ridascreen was used for the determination of chloramphenicol (a banned substance in veterinary medicine). Other antibacterial compounds of this family, such as

thiamphenicol, were not taken in consideration due to the lack of multiresidue test kits available on the market.

Confirmation / quantification

A LC-MS/MS method was developed for the quantitative analysis of chloramphenicol.

From the 17 kidney samples examined, 4 were positive positive and their concentrations were estimated to 0.4, 0.6 (2) and 1.2 µg/kg.

(Fluoro)quinolones

Screening

Screening test is not commercially available. A new biochemical test is still in development at the University of Liège.

For this reason, the samples collected by IEV were not examined for the presence of this type or residues.

Confirmation / quantification

The conditions of extraction and purification of these residues from kidney and meat samples have been studied for the main substances of this family of antibacterials and a LC-MS/MS method of analysis was set up and validated. It was found applicable as a multiresidue method. Quantitation will soon be optimised by using a new deuterated standard, this will allow a complete validation of the method.

Our project had to lead to:

1° a strengthening and an improvement of the link between the scientific potential of research centres (Universities of Ghent and Liège) and the regulatory authorities concerned by the standardisation in the food product sector (within the future Federal Agency for the Safety of the Food Chain) and also with the OIVO/CRIOC (a Belgian Centre of Research and Information of Consumer Organizations). The OIVO/CRIOC will be informed about the results of the project and coached in the translation towards the consumers.

2° an acceleration and a better coordination of the standardization process in a context of sustainable development in the sector of animal productions.

CONCLUSIONS AND RECOMMANDATIONS

The important changes in the strategy of control of residues in foodstuffs and in food products required in the European Directives (EC/96/23) and Council Regulation EEC N°2377/90 that have been implemented rather recently require also a modification of the strategy of the use in the laboratories of analytical methods for the determination of veterinary drug residues and particularly of antibiotics. For these last compounds, the question is asked about the demonstration of the presence of substances inhibiting bacterial growth that could no longer be sufficient to reject the animal carcass: after identification of the inhibiting substance, its concentration in animal products edible for human consumers would have to be determined and compared to the Maximum Residue Limits (MRLs) in the corresponding foodstuffs. Reliable and reproducible quantitative methods of analysis are thus needed. This will be possible only after complete validation and standardisation of analytical methods.

Our project has largely reached its objectives:

- an inventory of the control tools consisting of commercially available methods for the post-screening of antibiotic residues was established. Some of them have been

- applied to the determination of antibiotic residues in animal kidneys. Their complete validation and standardisation are in progress;
- published physico-chemical methods for the confirmatory analysis and quantitation of antibiotic residues have been applied to kidney samples collected in Belgian slaughterhouses. Those which were found satisfactory were partly validated and are on the verge to be standardised in view of their inter-laboratory evaluation;
 - new analytical approaches were followed when needed after a negative evaluation of the performances of existing methods of analysis;
 - progress have been done is the development of laboratory networks at the national and European levels in the field of the control of antibiotic residues in foodstuffs of animal origin.

Our project was clearly in line with the general objectives of the *Scientific Support Plan for a Sustainable Development Policy* in the food product sector for the harmonization of methods of analysis. This should allow a better protection of the consumer health concerning potentially harmful residues of certain veterinary drugs such as antibiotics.

The validation of the analytical methods developed and tested in our project will have still to be done in close collaboration with other laboratories involved in the official control of veterinary drug residues in foodstuffs of animal origin. This will contribute to the integration of results and will allow identification of domains in the food production chain for which an effort of standardization should be needed in the frame work of sustainable development. The project will contribute to the creation of an inventory of European and worldwide initiatives and to the development of reliable data bank largely available. It will examine actions taken at the Belgian and international level in the field of food product standards (more precisely, methods of residue analysis in food products) in a context of sustainable development and it will allow the definition of the Belgian contribution at the international level (especially the European level).

Validation of analytical methods developed and tested in our project will still have to be completed in collaboration with other laboratories involved in the official control fo residues. This will allow the identification of domains in the sector of the chain of food production in which a special standardisation effort is still necessary in the framework of sustainable development. The project will have to contribute in the setting up of an inventory of the initiatives at European and worldwide levels et in the development of databank easily available. It will examine the actions conducted in Belgium and at the international level in the domain of standardisation of food products (more specifically concerning the analytical methods of residues in foodstuffs of animal origin).

2. RESUME OPERATIONNEL

L'apport de notre consortium au Plan d'Appui comporte deux volets :

- *Volet 1* : La normalisation de l'analyse des résidus d'hormones et de médicaments à usage vétérinaire dans les produits animaux
- *Volet 2* : Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires.

2.1 La normalisation de l'analyse des résidus d'hormones et de médicaments à usage vétérinaire dans les produits animaux

(Mars 1997 à février 1998)

Nous avons créé une base de donnée nouvelle qui présente un inventaire critique des méthodes disponibles pour la détermination des résidus de promoteurs de croissance (hormones anabolisantes stéroïdes, β -agonistes et glucocorticoïdes) et de médicaments à usage vétérinaire (antibiotiques et inhibiteurs de croissance des microorganismes). D'autres parties de la base de données contiennent des informations :

- d'ordre législatif (belge et européen),
- sur les aspects toxicologiques de ces résidus
- sur les statistiques des contrôles effectués par les organismes officiels (Ministère de l'Agriculture et Institut d'Expertise vétérinaire du Ministère de la Santé publique).

Cette base de donnée est accessible à l'adresse INTERNET : <http://139.165.180.63/OSTC/>

2.2 Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires.

(Mars 1998 à juillet 2001)

Le projet avait pour but de démontrer la faisabilité d'une stratégie intégrée en vue du contrôle des résidus de substances à activité antimicrobienne dans les denrées alimentaires d'origine animale. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de méthodes de dépistage disponibles sur le marché, telles que des dosages immunochimiques ou d'autres tests biochimiques et physicochimiques rapides et relativement bon marché, ainsi que sur une méthodologie physicochimique, de confirmation et d'analyse quantitative, considérée actuellement comme faisant partie intégrante d'un laboratoire bien équipé de contrôle des denrées alimentaires.

Une méthodologie pilote pour l'identification, la confirmation et la détermination quantitative des résidus des substances antibactériennes les plus couramment utilisées en productions animales a été mise au point. Après validation, selon des normes généralement admises au niveau international, la méthodologie a été appliquée en pratique sur des échantillons réels collectés en abattoirs par les inspecteurs de l'Institut d'Expertise vétérinaire (IEV), échantillons qui avaient fait l'objet d'un premier contrôle positif pour la présence d'antibactériens au moyen du test officiel belge (nouveau test rénal, Arrêté ministériel du 19 juin 1995). Nous disposions également d'échantillons de reins et de viande provenant d'animaux reconnus comme négatifs pour la présence d'antibactériens dans leur rein lors du contrôle officiel. Ces derniers échantillons nous ont servi de « blancs » pour la mise au point des méthodes d'analyse et dans nos contrôles de qualité.

Actuellement, le test appliqué pour déterminer si un échantillon est positif ou négatif, est le « test rénal belge ». Ce test microbiologique de *pre-screening* (premier dépistage),

appliqué sur les reins des animaux abattus, se base sur l'activité antimicrobienne des antibiotiques. Il permet uniquement de détecter la présence de substances inhibitrices dans l'exsudat rénal. Mais il ne permet pas d'identifier la substance concernée et encore moins de la quantifier dans les parties consommables de la carcasse et en particulier dans la viande. C'est pourquoi, pour progresser dans l'application des LMRs, des méthodes de dépistage simples et rapides d'identification des antibiotiques doivent être appliquées. Celles-ci viendront compléter l'information obtenue lors du test rénal.

Pour rendre la stratégie de contrôle des résidus plus efficace, il faudrait idéalement établir un plan en quatre phases :

Phase 1: Le *pre-screening* (ou test de premier dépistage)

Cette étape est déjà opérationnelle dans le contrôle sanitaire en Belgique et ces tests sont effectués dans un vingtaine de laboratoires agréés. Il s'agit du test, pratiqué sur les reins des animaux d'abattoir, connu sous le nom de « test rénal » ou « nouveau test rénal belge »

Le test de dépistage utilisé actuellement, permet uniquement de détecter la présence d'antibactériens dans les échantillons.

Phase 2: Le *screening* (ou dépistage sélectif)

Les échantillons donnant une réponse positive lors du *pre-screening* sont soumis au dépistage sélectif. Lors de ce *screening*, on tente d'identifier plus précisément la famille à laquelle appartient la substance active repérée. Cette détection se fait au moyen d'immuno-essais, ou d'autres tests biochimiques, commercialisés sous différents formats ou encore grâce à d'autres techniques de dépistage comme la chromatographie sur couche mince.

Phase 3: La confirmation et l'identification

Un résultat positif lors d'un test de dépistage doit être considéré comme potentiellement douteux en raison d'interférences possibles (risque de faux positifs). Il doit donc être confirmé au moyen d'une méthode d'analyse dont le principe de détection est différent de celui de la méthode de dépistage. On entend par identification la distinction de la substance responsable du résultat positif lors du dépistage par rapport à des substances de structures analogues. Du fait que les valeurs de LMR peuvent varier d'une substance à l'autre au sein d'une même famille d'antibiotiques (par exemple les β -lactames) une identification non ambiguë du résidu est indispensable.

Les techniques les plus utilisées, tant pour la confirmation que pour l'identification, sont des chromatographies liquides (LC) couplées à différents détecteurs spectrométriques (LC-UV, LC-MS, LC-MS/MS, ...).

Phase 4: La quantification de la teneur en résidus

En principe, la méthode d'analyse de confirmation et/ou d'identification, basée sur la chromatographie liquide, peut être appliquée de manière quantitative (calibration au moyen d'un standard interne ou au moyen d'une courbe standard à différentes dilutions).

Les trois dernières étapes n'étant pas encore d'application systématique, le but de ce projet était de démontrer la faisabilité de cette stratégie intégrée. Le choix des antibiotiques analysés est basé sur l'expérience acquise dans chaque laboratoire pour certaines familles d'antibiotiques ainsi que sur la disponibilité sur le marché de dosages immuno-chimiques ou d'autres tests biochimiques. Quant aux analyses de confirmation, elles sont réalisées par des méthodes d'analyses physico-chimiques généralement disponibles dans un laboratoire de contrôle bien équipé.

Les substances antibactériennes les plus souvent rencontrées dans les tissus et produits animaux appartiennent à l'une des sept familles d'agents antibactériens : les β -lactames,

(fluoro)quinolones, macrolides, phénicolés, tétracyclines, aminoglycosides et les sulfonamides.

L'expérience passée des services du Ministère de la Santé publique lors du contrôle des résidus dans les produits animaux a montré que les sulfonamides, les tétracyclines et les β -lactamines sont plus souvent mises en évidence par rapport aux autres antibiotiques. C'est la raison pour laquelle, seuls les échantillons positifs lors du pre-screening qui s'étaient révélés négatifs pour l'une de ces trois familles, ont été soumis aux analyses portant sur le chloramphénicol, les aminoglycosides et les macrolides.

Resultats

Onderzoek uitgevoerd aan de Universiteit Gent

Het gedeelte van het onderzoek dat aan de Universiteit Gent toevertrouwd werd betrof de sulfonamiden, de tetracyclines en de groep van de aminoglycosiden.

Sulfonamiden

Screening

Aangezien er geen commerciële multiresidu sulfonamide ELISA kits op de markt zijn, werd High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) gekozen als screeningstechniek. Na ontwikkeling met HPTLC konden de vlekken van de residuen visueel vlot geëvalueerd worden op het MRL niveau (100 μ g/kg). Het extractierendement was zeer hoog en er werden geen interferenties waargenomen. Er kunnen 30 stalen per dag door één technicus geanalyseerd worden. In totaal werden 161 monsters (nier + spiervlees) met deze methode geanalyseerd, waarvan 21 (13 %) positief bevonden werden op sulfonamiden.

Confirmatie met LC-MS/MS

Er werd een eenvoudige extractieprocedure op punt gesteld. De methode werd na optimalisatie van zowel de chromatografische als de massaspectrometrische parameters, gevalideerd met betrekking tot lineariteit, juistheid, precisie, detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens (LOQ) zowel voor nierweefsel als voor spierweefsel. Daaruit bleek dat zij voldoet aan alle eisen die ter zake kunnen worden gesteld.

Van de 42 monsters (nieren en spierweefsel) die als positief uit de screening gekomen waren konden er 28 (67 %) ondubbelzinnig geconfirmeerd worden met de LC-MS/MS methode. Dit betekent dat er ongeveer 1/3 van de stalen, die als positief uit de screening gekomen waren in werkelijkheid vals positieven waren.

Tetracyclines

Screening

De bruikbaarheid van de commerciële Ridascreen tetracycline kit van R-Biopharm werd geëvalueerd.

In totaal werden 104 vleesstalen en 99 nierstalen, die positief werden bevonden met de Belgische Niertest, gescreend. Van de vleesstalen bleken 28 (27 %) meer dan 100 ppb (MRL) aan tetracyclines te bevatten. Van de nierstalen testten 13 stalen positief op tetracyclines. In totaal werden 41 monsters positief bevonden.

Confirmatie met LC-MS/MS

Er werd een eenvoudige extractieprocedure op punt gesteld. De analyses werden uitgevoerd op dezelfde apparatuur als voor de sulfonamiden.

De methode werd na optimalisatie van zowel de chromatografische als de massaspectrometrische parameters, gevalideerd.

Van de 41 monsters (nieren en spierweefsel) die als positief uit de screening methode gekomen waren, konden er 20 ondubbelzinnig geconfirmeerd worden met de LC-MS/MS. Dit betekent dat ongeveer de helft van de in de screening positief bevonden stalen in werkelijkheid vals positieven waren.

Aminoglycosiden

Screening

Als vertegenwoordiger van deze vrij grote groep werd neomycine uitgekozen, dat zelf bestaat uit een mengsel van neomycine A,B en C. Diverse commerciële kits zijn beschikbaar. Na een korte vergelijkende studie werd geopteerd voor de Neomycine EIA kit van Euro-Diagnostica. Er werd een grote variatie in de meetresultaten vastgesteld, die tijdens de looptijd van het project niet onder controle kon gekregen worden. Die variatie zou kunnen te wijten zijn aan het sterk wisselend extractierendement. Door de eenvoud van de monstervoorbereiding kunnen tot 40 stalen per dag door één technicus geanalyseerd worden.

Van de ter beschikking gestelde stalen, die nog niet positief bevonden waren op sulfonamiden of tetracyclines, in casu 65 nieren en 66 vleesmonsters, testten 7 nieren (11 %) en 5 vleesmonsters (8 %) positief op neomycine. Gezien het hoger vastgestelde gebrek aan precisie was het niet duidelijk of de meetwaarden al dan niet boven de MRL-waarde lagen.

Confirmatie met LC-MS/MS

Gezien de problemen met de grote variatie in het extractierendement is geen aanvang kunnen gemaakt worden met de LC-MS confirmatie.

Travaux effectués à l'ULg

De part l'expérience passée de chaque laboratoire pour certains antibiotiques, le Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires de l'ULg s'est focalisé sur la détection et l'analyse des antibiotiques de la famille des β -lactames, des phénicolés (chloramphénicol), des quinolones et des macrolides.

Antibiotiques à noyau β -lactames

Screening

Nous avons adapté, validé et utilisé le nouveau test Beta-STAR (UCB Bioproducts). Ce test, initialement conçu pour le lait, a été adapté aux tissus animaux, rein et muscle. Dans ce cas le test sur tige est précédé d'une purification en phase solide de l'extrait aqueux contenant les antibiotiques. Dans ces conditions, la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline sont détectées à des concentrations proches de leur LMR. L'oxacilline et la cloxacilline sont détectées quant à elles à des concentrations minimales inférieures à leur LMR/2.

Confirmation / quantification

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été choisie comme méthode analytique pour confirmer la présence d'antibiotiques à noyau β -lactame dans les échantillons. L'analyse HPLC appliquée aux principaux antibiotiques de la famille a permis leur identification et leur détermination quantitative. Il est néanmoins impératif avec ces composés de prendre des précautions pour éviter leur dégradation en cours d'analyse.

La limite de détection a été évaluée à 15 et 75 µg/kg selon l'antibiotique analysé. La limite de quantification est de 25 µg/kg pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline, et de 150 µg/kg pour l'oxacilline et la cloxacilline. Cette méthode d'analyse répond donc aux exigences du règlement CEE 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990 qui a fixé les limites maximales de résidus d'antibiotiques de type β-lactames dans le rein à 50 µg/kg pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline, et à 300 µg/kg pour l'oxacilline et la cloxacilline.

Parmi les échantillons qui ne s'étaient pas révélés positifs pour les tétracyclines ni les sulfonamides, à savoir 17 échantillons de reins, un seul était positif au screening pour la présence de β-lactames. Il fut confirmé pour la présence d'ampicilline à une concentration de 1553 µg/kg.

Chloramphénicol

Screening

La méthode utilisée pour déterminer la présence du chloramphénicol dans les tissus est un dosage immunochimique (ELISA Ridascreen). Elle a été validée et appliquée aux échantillons de reins collectés par l'IEV.

Confirmation / quantification

Une méthode d'analyse par LC/MS/MS a été mise au point pour l'analyse quantitative du chloramphénicol.

Parmi les échantillons qui ne s'étaient pas révélés positifs pour les tétracyclines ni les sulfonamides, à savoir 17 échantillons de reins, 4 étaient positifs au screening et leurs concentrations ont été estimées à 0,4, 0,6 (2) et 1,2 µg/kg.

Quinolones

Screening

Actuellement, il n'existe pas sur le marché de test de screening multi-résidus développé pour la famille des quinolones. Une recherche, subsidiée par le Ministère fédéral de l'Agriculture et l'IEV, est en cours à ce sujet.

Nous sommes dès lors directement passés à la technique de confirmation par LC/MS/MS.

Confirmation / quantification

Les conditions d'extraction et de purification des principales substances de cette famille ont été déterminées. L'approche de l'analyse des (fluoro)quinolones, réalisée dans le cadre de ce projet, indique que la méthode utilisée par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide (LC/MS/MS) convient à l'analyse multi-résidus attendue. Cependant, si les résultats sont plus qu'encourageants, l'acquisition récente d'un standard deutéré nous permettra de réaliser une validation plus approfondie et complète de manière à pouvoir soumettre cette technique comme méthode officielle pour l'analyse des (fluoro)quinolones.

Macrolides

Screening

La méthode utilisée pour détecter les macrolides est un radio-récepteur essais mis au point et validé dans notre laboratoire. Cette technique a été utilisée pour l'analyses des échantillons de reins et de viande fournis par l'IEV.

Confirmation / quantification

Une méthode d'analyse par LC/MS/MS a été mise au point pour l'analyse quantitative des macrolides.

Parmi les échantillons qui ne s'étaient pas révélés positifs pour les tétracyclines ni les sulfonamides, à savoir 17 échantillons de reins, un seul était positif au screening pour la présence de macrolides Il fut confirmé pour la présence de spiramycine à une concentration de 93,5 µg/kg.

Résumé des résultats

Résultats de l'analyse des 17 échantillons réels positifs au test rénal et soumis aux tests de screening et de confirmation pour les antibiotiques de la famille des tétracyclines(TC) des sulfonamides (sulfo), des β-lactames, des phénicolés (CAP) et des macrolides.

échantillons:	TC	Sulfo	B-lactames	CAP	Macrolides
1					
2					
3					
4					
5					
7					spira 93,5 ng/g
8					
14					
15					
16	+ -			1,2 ng/g	
20	+ -				
21					
23				0,6 ng/g	
25					
27					
28	+ -			0,4 ng/g	
29			ampi		
35	+ -		1553 ng/g		
38					
44					
45					
47	+ -	+ -			
51					
55					
59					
61	+ -			0,6 ng/g	
63	+ -				
65					
67	+ -				
68					
69					
73					
74					
80					
81					
84					
85					

Relations avec d'autres laboratoires ou institutions aux niveaux national et international

CRIOC : Centre de recherche et d'information des organisations de consommateurs

Le OIVO/CRIOC est informé des résultats du projet et nous collaborerons avec eux pour les aider à transcrire ces résultats à destination des consommateurs. Cette action devrait affaiblir et même éliminer la « chimiophobie » fréquemment observée chez les consommateurs à propos des résidus de médicaments vétérinaires, des antibiotiques en particulier. En sachant que, même si le test rénal est positif, la concentration en résidus dans la denrée, en l'occurrence la viande, demeure en deçà de la limite maximum de résidus (LMR) autorisée. Notre projet pourrait aboutir à la conclusion, rassurante pour les consommateurs, que le test rénal officiel offre une protection efficace contre la présence de résidus, dangereux pour la santé humaine, dans les tissus animaux consommables comme aliments.

Autres utilisateurs potentiels des résultats

Les trois partenaires principaux du projet ont eu de nombreux contacts, entre eux mais aussi au niveau international. En effet, nous avons interagi avec d'autres institutions, laboratoires et organisations de consommateurs ou gouvernementales à l'occasion de réunions scientifiques (EURORESIDUE Conference, International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, OSTC Symposium on the Sustainable Development, OSTC Study Day on Pre-normative Research in the Food Sector, Analytica 2000, ...) ainsi qu'à l'occasion de consultations de l'Union européenne et de contacts informels avec des anciens partenaires dans des réseaux financés par l'UE tels que :

- Concerted Action N° 8 "In Vitro Toxicological Studies and Real-Time Analysis of Residues in Food"
- Programs of Production and Validation of Reference Materials.

Plus précisément, le professeur Van Peteghem (Université de Gand) est l'organisateur du "International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis". Il est aussi impliqué directement dans l'organisation de EURORESIDUE Conference. Il a été récemment désigné comme membre du Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA). Prof. Cornelis (IEV/IVK et Universiteit Gent) est le délégué belge officiel à l'EMEA (European Agency of (Veterinary) Medicinal Products) et au Codex Alimentarius.

Actuellement d'autres laboratoires et centres de recherches sont associés à certains aspects de nos projets plus particulièrement en ce qui concerne le développement de nouvelles méthodes lorsque les méthodes existantes, disponibles commercialement ou publiées, ont été jugées peu performantes pour notre propos. Parmi ces instituts et laboratoires, citons : l'Institut des Matériaux et méthodes de référence (IRMM), le Laboratoire d'Hormonologie animale du CER à Marloie, la Section « Bromatologie » de l'Institut scientifique de la Santé publique – Louis Pasteur (ISP-LP) à Bruxelles, le Laboratoire communautaire de Référence (AFSA, Fougères, France), l'Institut Pasteur de Lille (France).

Conclusions et recommandations

Les importantes modifications de stratégie du contrôle des résidus dans les denrées alimentaires et dans les produits alimentaires imposés par la directive européenne 96/23/CE et le Règlement du Conseil CEE N°2377/90 qui sont entrés pleinement en application récemment requièrent aussi une modification de la stratégie d'utilisation par les laboratoires

de contrôle des méthodes d'analyse pour la détermination des résidus de médicaments vétérinaires et particulièrement des antibiotiques.

Pour ces derniers composés, on doit se poser la question de savoir si la démonstration de la présence de substances inhibant la croissance bactérienne est encore suffisante pour justifier la saisie de la carcasse de l'animal. Les dispositions européennes nouvellement entrées en vigueur nécessiteraient l'identification de la substance antibactérienne, suivie de la détermination de sa concentration dans le produit animal comestible pour le consommateur humain et de la comparaison de sa valeur avec celle de la LMR dans la denrée correspondante. Des méthodes d'analyse quantitative fiables et reproductibles sont donc nécessaires. Ceci ne sera possible qu'après la validation complète et la normalisation des méthodes d'analyse.

Jusqu'à présent, notre projet a atteint en grande partie ses objectifs, à savoir :

- établir un inventaire des outils de contrôle constitués de méthodes disponibles commercialement pour le post-screening des résidus d'antibiotiques ;
- appliquer des méthodes physicochimiques publiées dans la littérature scientifique pour les analyses de confirmation et la quantification des antibiotiques dans les échantillons de reins récoltés dans les abattoirs belges. Celles qui ont été évaluées comme satisfaisantes, ce qui est le cas pour les tétracyclines, les aminoglycosides, les sulfonamides, les macrolides et les antibiotiques à noyau β -lactames, ont été validées en grande partie et sont quasi prêtes pour une évaluation inter-laboratoire ;
- des approches analytiques nouvelles ont été suivies lorsque les méthodes existantes n'ont pas été considérées comme suffisamment performantes comme dans le cas des (fluoro)quinolones ;
- des progrès ont aussi été réalisés dans le développement des réseaux de laboratoires aux niveaux belge et européen dans le domaine du contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Notre projet était clairement en concordance avec les objectifs généraux du Plan d'appui scientifique pour une politique de développement durable dans le secteur des produits alimentaires pour l'harmonisation des méthodes d'analyse. Cela devrait permettre une meilleure protection de la santé du consommateur en ce qui concerne les résidus potentiellement dangereux de certains médicaments vétérinaires tels que les antibiotiques.

La validation des méthodes analytiques développées et testées dans notre projet devra encore être complétée en collaboration étroite avec d'autres laboratoires impliqués dans le contrôle officiel des résidus. Ceci contribuera à l'intégration des résultats et permettra l'identification des domaines dans le secteur de la chaîne de production alimentaire pour lesquels un effort de normalisation est encore nécessaire dans le cadre du développement durable. Le projet devra contribuer à la mise sur pied d'un inventaire des initiatives aux niveaux européen et mondial et au développement de banques de données facilement accessibles. Il examinera les actions menées en Belgique et au niveau international dans le domaine des normes des produits alimentaires (plus précisément, les méthodes d'analyse des résidus dans les produits d'origine animale) dans un contexte de développement durable et il permettra la définition de la contribution belge au niveau international, plus spécialement au niveau européen.

3. INTRODUCTION

3.1 Cadre général de la recherche

En agriculture moderne, les antibiotiques sont utilisés soit comme promoteurs de croissance, soit comme remèdes thérapeutiques pour traiter les animaux atteints de maladies spécifiques. Un usage inapproprié et le non respect des temps d'attente entre l'administration de la substance à l'animal et la collecte de ses produits (le lait, les œufs, la viande, le miel, ...) peuvent entraîner la présence de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale qui entrent dans la chaîne alimentaire humaine.

Cette présence peut avoir des effets néfastes sur l'homme en provoquant par exemple des réactions allergiques chez les individus déjà sensibilisés. Par ailleurs, certaines molécules (comme le chloramphénicol) reconnues comme toxiques et utilisées comme antibiotique sont progressivement interdites d'utilisation. Enfin, les mauvaises pratiques en matière d'utilisation des antibiotiques peuvent entraîner un accroissement des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.

Un autre aspect du problème réside dans le fait que les résidus d'antibiotiques empêchent les fermentations qui interviennent dans la fabrication de certaines denrées alimentaires comme le yaourt ou le fromage ou encore la production de certains saucissons secs comme le salami.

De ce fait, le contrôle de ces résidus préoccupe aussi bien les producteurs des denrées alimentaires que les autorités responsables de la santé publique et de la protection des consommateurs.

Au niveau de la législation européenne, la Directive principale concernant le contrôle des résidus d'antibiotiques et d'autres médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires est la Directive 96/23/CE du 9 avril 1996. Celle-ci impose aux Etats membres de surveiller certaines substances et leurs résidus ainsi que de soumettre un plan décrivant les mesures nationales qui doivent être mises en œuvre pour contrôler ces substances et ces résidus chez les animaux vivants et dans leurs produits. D'autre part, le Règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil fixe une procédure communautaire pour déterminer les limites maximales de résidus (LMR) dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Au niveau belge, les méthodes d'échantillonnage et de recherche ont été récemment réactualisées (Arrêté Ministériel du 19/03/95) et un statut R ou H (Arrêté Royal du 8/09/97, Arrêté Ministériel du 10/09/97 et l'Arrêté Royal du 11/10/97) est attribué aux exploitations dont les animaux ont été contrôlés positivement, c'est-à-dire qui présentent des traces soit

d'antibiotiques interdits (statut H) soit des résidus d'antibiotiques autorisés à des concentrations supérieures aux LMR (statut R).

Actuellement, le test appliqué pour déterminer si un échantillon est positif ou négatif, est le test rénal belge. Ce test microbiologique de pre-screening appliqué sur les reins des animaux abattus, se base sur l'activité antimicrobienne des antibiotiques. Il permet uniquement de détecter la présence de substances inhibitrices dans l'exsudat rénal. Mais il ne permet pas d'identifier la substance concernée et encore moins de la quantifier dans les parties consommables de la carcasse et en particulier dans la viande.

C'est pourquoi, pour progresser dans l'application des limites maximales de résidus, des méthodes de screening simples et rapides d'identification d'antibiotiques doivent être appliquées. Celles-ci viendront compléter l'information obtenue par le test rénal.

3.2 But du projet

Le but de ce projet est de montrer grâce à une étude pilote qu'une stratégie intégrée est applicable pour l'analyse qualitative et quantitative de résidus de substances à activité antimicrobienne dans les denrées alimentaires d'origine animale. Ainsi, on vise à établir pour les principales familles d'antibiotiques, parmi lesquelles on a sélectionné les substances les plus utilisées, qu'une approche en 4 phases peut constituer la base d'une stratégie de contrôle efficace et utile du point de vue sanitaire et économique.

La faisabilité d'une telle approche n'ayant pas encore été démontrée, l'intérêt de cette étude pour la société est évident tant du point de vue de la santé publique que du point de vue économique.

3.3 Description du projet

Pour rendre la stratégie de contrôle des résidus plus efficace, il faudrait idéalement établir un plan en quatre phases :

Phase 1: **Le pre-screening** (ou test de dépistage)

Cette étape est déjà opérationnelle dans le contrôle sanitaire en Belgique et ces tests sont effectués dans un vingtaine de laboratoires agréés. Il s'agit du test, pratiqué sur les reins des animaux d'abattoir, connu sous le nom de « test rénal » (Moniteur Belge du 19 juin 1995). Pour la viande, une variante du test européen à 4 plaques est utilisée (Four Plate Test ou FPT). Ces deux tests sont basés sur la mise en évidence du pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne de l'échantillon testé dans une boîte de Pétri sur un milieuensemencé au moyen d'une souche bactérienne indicatrice (*Bacillus subtilis* dans le « test rénal belge »).

Ces tests sont non spécifiques et ils ne permettent pas de déterminer la nature de la substance responsable de l'activité antimicrobienne. Or l'identification et la quantification de l'antibiotique est maintenant nécessaire dans le cadre de la législation européenne.

En effet, la réglementation européenne considère qu'en deçà d'une certaine valeur seuil, les résidus présents dans les denrées alimentaires ne constituent pas un danger pour le consommateur. La notion de limite maximale de résidus (LMR) est définie dans le Règlement CEE n° 2377/90. Les annexes I et IV de ce Règlement donnent les listes des substances qui bénéficient d'une valeur de LMR définitive ou provisoire respectivement.

En bref, le test de dépistage utilisé actuellement, permet uniquement de *détecter* la présence d'antibiotiques dans les échantillons.

Phase 2: **Le screening** (ou dépistage sélectif)

Les échantillons donnant une réponse positive lors du pré-screening sont soumis au dépistage sélectif. Lors de ce screening, on tente d'*identifier* plus précisément *la famille* à laquelle appartient la substance active repérée. Cette détection se fait au moyen d'immuno-essais de différentes natures et commercialisés sous différents formats ou encore grâce à d'autres techniques de dépistage comme la chromatographie sur couche mince.

Phase 3: **La confirmation et l'identification**

Un résultat positif lors d'un test de dépistage doit être considéré comme potentiellement douteux en raison d'interférences possibles (risque de faux positifs). Il doit donc être *confirmé* au moyen d'une méthode d'analyse dont le principe de détection est différent de celui de la méthode de dépistage.

On entend par *identification* la distinction de la substance responsable du résultat positif lors du dépistage par rapport à des substances de structures analogues. Du fait que les valeurs de LMR peuvent varier d'une substance à l'autre au sein d'une même famille d'antibiotiques (par exemple les β -lactames) une identification non ambiguë du résidu est indispensable.

Les techniques les plus utilisées, tant pour la confirmation que pour l'identification, sont des chromatographies liquides (LC) couplées à différents détecteurs (LC-UV, LC-MS/MS, ...).

Phase 4: **La quantification de la teneur en résidus**

En principe, la méthode d'analyse de confirmation et/ou d'identification, basée sur la chromatographie liquide, peut être appliquée de manière *quantitative* (calibration au moyen d'un standard interne ou au moyen d'une courbe standard à différente dilution).

Les trois dernières étapes n'étant pas encore d'application systématiquement, le but de ce projet est de démontrer la faisabilité de cette stratégie intégrée. Le choix des antibiotiques analysés s'est basé sur l'expérience acquise dans chaque laboratoire pour certaines familles d'antibiotiques ainsi que sur la disponibilité des dosages immuno-chimiques ou autres tests biochimiques disponibles sur le marché. Quant aux analyses de confirmation, elles sont réalisées par des méthodes d'analyses physico-chimiques généralement disponibles dans un laboratoire de contrôle bien équipé. (Des informations concernant les différents composés ainsi que les méthodes d'analyses existantes sont disponibles sur le site internet : <http://139.165.180.63/OSTC/>).

Trois institutions collaborent à ce projet :

L'Institut d'Expertise Vétérinaire (Dr M.Cornelis et Dr. M.Jouret), L'Université de Gand (Prof. C.Van Peteghem) et l'Université de Liège (Prof. G.Maghuin-Rogister).

3.4 Partenaires

- L'Institut d'Expertise Vétérinaire (Dr M.Cornelis et Dr. M.Jouret) est responsable de la collecte des échantillons de reins et de viande qui se sont révélés positifs ou négatifs lors du contrôle du dépistage préliminaire (en phase 1).
- Le Laboratoire de Bromatologie de l'Université de Gand, dirigé par le Prof. C.Van Peteghem est chargé d'étudier les antibiotiques des groupes des tétracyclines, des sulfonamides et des aminoglycosides.
- Le Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires de l'Université de Liège, dirigé par le Prof. G.Maghuin-Rogister tente d'établir la faisabilité de cette stratégie pour les antibiotiques appartenant aux familles des β -lactames (pénicillines et céphalosporines), des phénicolés (groupe du chloramphénicol), des macrolides et des quinolones.

En général, les résidus des sulfonamides, des tétracyclines et des β -lactames sont plus souvent mis en évidence par rapport aux autres antibiotiques. C'est la raison pour laquelle, seuls les échantillons positifs lors du pre-screening qui se seront révélés négatifs pour l'une de ces trois familles, seront soumis aux analyses recherchant le chloramphénicol, les aminoglycosides, les macrolides et les quinolones.

3.5 Relations avec d'autres laboratoires ou institutions aux niveaux national et international

3.5.1 *CRIOC : Centre de recherche et d'information des organisations de consommateurs*

Le OIVO/CRIOC est informé des résultats du projet et nous collaborerons avec eux pour les aider à transcrire ces résultats à destination des consommateurs. Cette action devrait affaiblir et même éliminer la « chimiophobie » fréquemment observée chez les consommateurs à propos des résidus de médicaments vétérinaires, des antibiotiques en particulier. En sachant que, même si le test rénal est positif, la concentration en résidus dans la denrées, en l'occurrence la viande, demeure en deçà de la limite maximum de résidus (LMR) autorisée. Notre projet pourrait aboutir à la conclusion, rassurante pour les consommateurs, que le test rénal officiel offre une protection efficace contre la présence de résidus, dangereux pour la santé humaine, dans les tissus animaux consommables comme aliments.

3.5.2 *Autres utilisateurs potentiels des résultats*

Les trois partenaires principaux du projet ont eu de nombreux contacts, entre eux mais aussi au niveau international. En effet, nous avons interagi avec d'autres institutions, laboratoires et organisations de consommateurs ou gouvernementales à l'occasion de réunions scientifiques (EURORESIDUE Conference, International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, OSTC Symposium on the Sustainable Development, OSTC Study Day on Pre-normative Research in the Food Sector, Analytica 2000, ...) ainsi qu'à l'occasion de consultations de l'Union européenne et de contacts informels avec des anciens partenaires dans des réseaux financés par l'UE tels que :

- Concerted Action N° 8 "In Vitro Toxicological Studies and Real-Time Analysis of Residues in Food"

- Programs of Production and Validation of Reference Materials.

Plus précisément, le professeur Van Peteghem (Université de Gand) est l'organisateur du "International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis". Il est aussi impliqué directement dans l'organisation de EURORESIDUE Conference. Il a été récemment désigné comme membre du Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA). Prof. Cornelis (IEV/IVK et Universiteit Gent) est le délégué belge officiel à l'EMEA (European Agency of (Veterinary) Medicinal Products) et au Codex Alimentarius.

Actuellement d'autres laboratoires et centres de recherches sont associés à certain aspects de nos projets plus particulièrement en ce qui concerne le développement de nouvelles méthodes lorsque les méthodes existantes, disponibles commercialement ou publiées, ont été jugées peu performantes pour notre propos. Parmi ces instituts et laboratoires, citons : l'Institut des Matériaux et méthodes de référence (IRMM), le Laboratoire d'Hormonologie animale du CER à Marloie, la Section « Bromatologie » de l'Institut scientifique de la Santé publique – Louis Pasteur (ISP-LP) à Bruxelles, le Laboratoire communautaire de Référence (AFSA, Fougères, France), l'Institut Pasteur de Lille (France).

4. ROLE DE L'INSTITUT D'EXPERTISE VETERINAIRE (IEV/IVK)

L'Institut d'Expertise Vétérinaire, (Dr M.Cornelis et Dr. M.Jouret), était responsable de la collecte des échantillons de reins et de viande qui s'étaient révélés positifs ou négatifs lors du contrôle du dépistage préliminaire (en phase 1). La cellule résidus de l'IEV nous a donc procuré des échantillons de reins et de muscles adducteurs, au cours de deux campagnes, une en début de programme (1^{ère} année) et une en fin de programme (3^{ème} année). L'IEV collecte, dans le cadre d'une recherche orientée, quelques 30 000 échantillons de reins (bovins et porcins) par an en vue de la recherche des antibiotiques à l'abattoir. Basée sur des données de 1996, environ 6% de ces échantillons (soit 1800 animaux) s'étaient révélés positifs dans le « test rénal belge » officiel. Avec l'accord du Fonctionnaire-dirigeant de l'IEV, le second échantillon, à savoir le 2^{ème} rein et des échantillons de viande des animaux correspondants ont été mis à la disposition de ce projet. Dans les deux premier mois du projet, les échantillons prélevés furent transférés, via TAXIPOST, vers les laboratoires de l'UG et de l'ULg, afin de les analyser dans le cadre du dépistage et, pour les échantillons considérés comme suspects lors du dépistage, de la confirmation / quantification. Une deuxième campagne de prélèvement et d'expédition d'échantillons a été menée dans la dernière année de convention.

5. ROLE DE L'UNIVERSITE DE GAND (RUG)

- **L'Université de Gand**, a analysé les antibiotiques de la famille des sulfonamides, des tétracyclines et des aminoglycosides.

5.1.1 Onderzoek uitgevoerd aan de Universiteit Gent

Het gedeelte van het onderzoek dat aan de Universiteit Gent toevertrouwd werd betrof de sulfonamiden, de tetracyclines en de groep van de aminoglycosiden.

Sulfonamiden

Screening

Aangezien er geen commerciële multiresidu sulfonamide ELISA kits op de markt zijn, werd High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) gekozen als screeningstechniek. De methode ontwikkeld door Haagsma *et al.* (*Veterinary Quarterly*, 6, 8-12, 1984) werd geëxploreerd op haar doeltreffendheid voor het objectief. De monstervoorbereiding bestond uit een extractie van de weefsels met dichloormethaan, gevolgd door een eenvoudige opzuivering bij middel van vaste fase extractie op Varian Bond Elut Si 500 mg LRC kolommetjes. Na ontwikkeling met HPTLC konden de vlekken van de residuen visueel vlot geëvalueerd worden op het MRL niveau (100 µg/kg). Het extractierendement was zeer hoog en er werden geen interferenties waargenomen. Er kunnen 30 stalen per dag door één technicus geanalyseerd worden. In totaal werden 161 monsters (nier + spiervlees) met deze methode geanalyseerd, waarvan 21 (13 %) positief bevonden werden op sulfonamiden.

Confirmatie met LC-MS/MS

Er werd een eenvoudige extractieprocedure op punt gesteld, die bestaat uit een maceratie met methanol, gevolgd door een filtratie. De analyses werden uitgevoerd op een Waters Alliance 2690 vloeistofchromatograaf, gekoppeld aan een Micromass Quattro LCZ massaspectrometer. De methode werd na optimalisatie van zowel de chromatografische als de massaspectrometrische parameters, gevalideerd met betrekking tot lineariteit, juistheid, precisie, detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens (LOQ) zowel voor nierweefsel als voor spierweefsel. Daaruit bleek dat zij voldoet aan alle eisen die ter zake kunnen worden gesteld.

Van de 42 monsters (nieren en spierweefsel) die als positief uit de screening (methode Haagsma plus de later verlaten methode van Van Poucke en Posyniak) gekomen waren konden er 28 (67 %) ondubbelzinnig geconfirmeerd worden met de LC-MS/MS methode. Dit betekent dat er ongeveer 1/3 van de stalen, die als positief uit de screening gekomen waren in werkelijkheid vals positieven waren.

Tetracyclines

Screening

De bruikbaarheid van de commerciële Ridascreen tetracycline kit van R-Biopharm werd geëvalueerd. Het gaat om een competitieve ELISA in microtiterplaten voor de kwantitatieve bepaling van tetracyclines in melk en weefsels. Er werd een eigen methode voor extractie geoptimaliseerd, die bestaat uit een extractie in waterige McIlvain buffer, gevolgd door een eenvoudige opzuivering bij middel van vaste fase extractie op Varian Bond Elut C18 kolommetjes. Ter validatie werd de accuraatheid van de ELISA test bepaald bij middel van blanco runder- en varkensnier en spierweefsel waaraan gekende concentraties van tetracycline werden toegevoegd.

In totaal werden 104 vleesstalen en 99 nierstalen, die positief werden bevonden met de Belgische Niertest, gescreend. Van de vleesstalen bleken 28 (27 %) meer dan 100 ppb (MRL) aan tetracyclines te bevatten. Van de nierstalen testten 13 stalen positief op tetracyclines. In totaal werden 41 monsters positief bevonden.

Confirmatie met LC-MS/MS

Er werd een eenvoudige extractieprocedure op punt gesteld die bestaat uit een maceratie met McIlvain buffer, gevolgd door een filtratie. De analyses werden uitgevoerd op dezelfde apparatuur als voor de sulfonamiden.

De methode werd na optimalisatie van zowel de chromatografische als de massaspectrometrische parameters, gevalideerd met betrekking tot lineariteit, juistheid, precisie, detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens (LOQ), zowel voor nierweefsel als

voor spierweefsel. Daaruit bleek dat zij voldoet aan alle eisen die ter zake kunnen gesteld worden.

Van de 41 monsters (nieren en spierweefsel) die als positief uit de screening methode gekomen waren, konden er 20 ondubbelzinnig geconfirmeerd worden met de LC-MS/MS. Dit betekent dat ongeveer de helft van de in de screening positief bevonden stalen in werkelijkheid vals positieven waren.

Aminoglycosiden

Screening

Als vertegenwoordiger van deze vrij grote groep werd neomycine uitgekozen, dat zelf bestaat uit een mengsel van neomycine A,B en C. Diverse commerciële kits zijn beschikbaar. Na een korte vergelijkende studie werd geopteerd voor de Neomycine EIA kit van Euro-Diagnostica, die bestemd is voor het screenen en kwantificeren van neomycine in melk, vet, weefsel en eieren.

De monstervoorbereiding bestond uit een onteiwitting van het gehomogeniseerde weefsel met trichloorazijnzuur, gevolgd door een verdunning in buffer.

Er werd een grote variatie in de meetresultaten vastgesteld, die tijdens de looptijd van het project niet onder controle kon gekregen worden. Die variatie zou kunnen te wijten zijn aan het sterk wisselend extractierendement. Door de eenvoud van de monstervoorbereiding kunnen tot 40 stalen per dag door één technicus geanalyseerd worden.

Van de ter beschikking gestelde stalen, die nog niet positief bevonden waren op sulfonamiden of tetracyclines, in casu 65 nieren en 66 vleesmonsters, testten 7 nieren (11 %) en 5 vleesmonsters (8 %) positief op neomycine. Gezien het hoger vastgestelde gebrek aan precisie was het niet duidelijk of de meetwaarden al dan niet boven de MRL-waarde lagen.

Confirmatie met LC-MS/MS

- Gezien de problemen met de grote variatie in het extractierendement is geen aanvang kunnen gemaakt worden met de LC-MS confirmatie.

6.1 Familles d'antibiotiques analysés

De part l'expérience de chaque laboratoire pour certains antibiotiques, notre laboratoire de Liège s'est focalisé sur la détection et l'analyse des antibiotiques de la famille des β -lactames (pénicilline G, ampicilline, amoxicilline, oxacilline et cloxacilline), des phénicolés (chloramphénicol, thiamphénicol et florfénicole), des quinolones (acide oxolinique, difloxacin, marbofloxacin et fluméquine) et des macrolides (érythromycine, tylosine, tilmicosine et spiramycine).

6.2 Mise au point des méthodes

6.2.1 β -lactames

La famille des β -lactames regroupe les antibiotiques de type pénicillines. Ils se caractérisent par un noyau β -lactame auquel s'accroche une chaîne latérale acyle (pénicilline G, pénicilline V), isoxazolyle (oxacilline, cloxacilline) ou aminoacyle (ampicilline, amoxicilline). A côté de la pénicilline G (ou benzylpénicilline) qui est l'antibiotique naturel de base, on trouve les β -lactames semi-synthétiques de première génération.

Les principales pénicillines utilisés sont la pénicilline G, l'ampicilline, l'amoxicilline, l'oxacilline et la cloxacilline. Leur structure est représentée à la figure 1 de la page 63 de l'annexe 6.1.2 .

Ils sont fréquemment utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les maladies respiratoires ou comme additifs alimentaires étant donné leur large spectre d'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positives et Gram négatives. Suite aux risques pour le consommateur que peuvent entraîner la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires, le Règlement CEE n° 2377 / 90 du Conseil du 4 mars 1999 a déterminé les limites maximales de résidus (LMR) à ne pas dépasser. Pour les β -lactames, elles ont été fixées à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline et à 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'oxacilline et la cloxacilline dans le muscle, le foie, la graisse et le rein de tous les animaux entrant dans la consommation humaine. Le tableau 38 de la page 100 reprend les limites maximales de résidus établies pour les pénicillines.

6.2.1.1 Choix du test de screening

Il existe plusieurs sortes de tests rapides immunologiques qui détectent les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. Sur le marché, les immuno-essais décrits pour l'analyse des β -lactames sont répartis principalement en 2 groupes. Il y a les tests RIA (Radio Immuno Assay) et les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (voir figure 2).

Le test RIA est basé sur la compétition qui existe entre l'antibiotique marqué par un isotope et ce même antibiotique non marqué, pour un site de liaison sur un anticorps. Une variante du RIA est le RRA (Radio-Recepteur Assay) qui recourt à des récepteurs pour la famille d'antibiotiques envisagée au lieu d'anticorps dans le RIA. Les seuls « receptor assays » qui sont couramment utilisés pour l'analyse des résidus d'antibiotiques, sont ceux développés par

CHARM SCIENCES. Le kit appelé Charm II Receptor Assays permet de détecter les β -lactames, les tétracyclines, les macrolides, les aminoglycosides et le chloramphénicol dans les échantillons de lait, de viandes, dans les oeufs et dans les fluides biologiques.

En général, les tests RRA sont spécifiques à certaines familles d'antibiotiques et sont reproductibles mais ce type de test nécessite l'utilisation d'un compteur de rayons bêta ou gamma.

Le test ELISA, quand à lui, se base sur le même principe que le RIA mise à part le fait que le marquage est enzymatique au lieu d'être radioactif. Les tests ELISA disponibles dans le commerce sont entre autres: le LacTek β -lactam, le Cite Probe et le Delvotest. Les résultats finaux obtenus sont basés sur un changement de couleur.

Un autre test qui recourt à des enzymes, mais sans utiliser d'anticorps, est le Penzym. Il est spécifique à la détection des antibiotiques contenant un noyau β -lactame. Son principe se base sur l'inhibition d'une enzyme par le cycle β -lactame.

Parmi les tests enzymatiques, développés essentiellement pour détecter les antibiotiques présents dans le lait, notre choix s'est porté dans un premier temps sur le test Penzym et ce, pour plusieurs raisons. Il ne demande pas d'équipement particulier et donc est facilement réalisable, il est spécifique aux β -lactames que nous recherchons et pas aux autres antibiotiques et de plus, de part notre collaboration avec la firme UCB-Bioproducts, il nous est facilement accessible.

Le Penzym est un test qualitatif qui se base sur une réaction enzymatique et colorimétrique. Son principe est le suivant:

L'enzyme (DD-carboxypeptidase) ajouté dans le lait, réagit lors de l'incubation avec les antibiotiques pour former un complexe stable. L'excès d'enzyme libre toujours présent dans le lait hydrolyse un substrat de type R-D-Ala-D-Ala. La D-Ala ainsi formée est oxydée en acide pyruvique par une D-amino acide oxydase avec formation simultanée d'eau oxygénée. Cette dernière est utilisée pour oxyder, sous l'action d'une peroxydase, un indicateur organique redox non coloré (l'o-dianisidine) qui évoluera en un composé de couleur rose-orange.

En résumé:

lait + AB + enzyme (DD-carboxypeptidase) --> {AB-E} complexe stable

E en excès + substrat (R-D-Ala-D-Ala) --> D-Ala hydrolysée

D-Ala + D-amino acide oxydase --> acide pyruvique + H₂O₂

H₂O₂ + o-dianisidine + peroxydase ---> indicateur organique redox

Si la couleur finale est:

rose orange --> l'échantillon est négatif: concentration en AB < 0,005 UI PenG/ml lait
orange --> l'échantillon est douteux: concentration en AB = 0,008 UI PenG/ml lait
jaune --> l'échantillon est positif: concentration en AB > 0,017 UI PenG/ml lait

Le test étant prévu pour analyser la présence des β -lactames contaminant le lait, la première étape a été de l'adapter à une matrice telle que la viande. Le jus de viande ne peut être utilisé tel quel pour le test Penzym. En effet, ce dernier se basant sur une réaction colorimétrique, il est nécessaire de décolorer totalement la solution d'extrait viande. Un moyen efficace de retenir les protéines colorées est de passer l'extrait de viande sur une colonne d'hydroxyapatite. L'éluat à l'aide d'une solution aqueuse, permet de récupérer les antibiotiques. Le volume d'éluat récolté a pour effet de diluer la concentration en β -lactames recueillis. La LMR définie pour la viande étant nettement supérieure à la LMR définies pour ces mêmes antibiotiques contenus dans le lait, cette dilution devrait permettre de retomber dans la gamme de concentration utile au Penzym. Cette adaptation doit bien entendu tenir compte du fait que le test doit être capable de détecter, dans l'échantillon de viande ou de rein, les résidus d'antibiotiques au moins à une concentration correspondant à la LMR .

Cependant, nous avons remarqué que si cette dilution convenait pour l'analyse de la viande contaminée à la LMR en pénicilline G ou en amoxicilline ou en ampicilline, elle ne convenait pas du tout pour l'analyse de l'oxacilline et de la cloxacilline. C'est la raison pour laquelle, après avoir éliminé le problème de la couleur du jus de viande à analyser, nous avons adapté la concentration en antibiotique détectable par le test. Pour cela, nous avons testés plusieurs colonnes SPE (colonne C18, colonne Oasis, colonne Bond Elute Certify) ainsi que différents solvants organiques (méthanol, acétonitrile, ...). Finalement, l'extraction des antibiotiques a été basée sur un passage successif du jus de viande, sur une colonne d'hydroxyapatite pour « décolorer » l'extrait, suivi d'une colonne Oasis pour changer de solvant afin de permettre une concentration plus aisée des β -lactames par évaporation sous flux d'azote. La particularité de la colonne Oasis est qu'elle est composée d'un copolymère hydrophile et lipophile. Ceci lui permet de retenir les composés acides, basiques et neutres dissous dans de l'eau. Le solvant d'éluat de cette colonne (le méthanol) convient à l'éluat de tous les antibiotiques retenus, ainsi qu'à leur concentration sous flux d'azote. Les antibiotiques ont été récupérés à 96% dans un millilitre d'eau avant d'être soumis au test Penzym.

Le protocole finalement utilisé pour analyser la présence des β -lactames dans le rein de porc à l'aide du test Penzym 100T est décrit dans le Protocole 1 qui se trouve à la page 103 de l'annexe 6.1.4.

Le protocole appliqué de cette manière permet de détecter à la fois le composé le moins sensible au Penzym (la cloxacilline détectée à partir de 80 ng/ml) et le composé le plus sensible au Penzym (la pénicilline G détectée à partir de 3 ng/ml) de manière à couvrir toute la gamme d'antibiotiques analysés.

Le tableau 1 de la page 81 de l'annexe 6.1.2 reprend toutes les concentrations en antibiotiques engagées dans chaque étape du protocole appliqué. C'est à dire, la quantité de viande à homogénéiser au départ, la quantité d'antibiotique qui se retrouve dans le broyat de viande, dans l'éluat de la colonne d'hydroxyapatite (c-à-d dans 3ml) et finalement, dans le dernier millilitre d'eau avant d'être soumis au test Penzym.

Pour se conformer à la Législation Européenne, le test de screening doit détecter de façon positive, tous les échantillons contenant des antibiotiques à des concentrations proches ou supérieures à la limite maximale de résidus ; et de manière négative, tous les échantillons contenant des antibiotiques à des concentrations proche de la LMR/2, de sorte à éviter au maximum les faux positifs et à éliminer entièrement les faux négatifs. Or on remarque que si

le Penzym 100T est assez sensible que pour détecter la présence de pénicilline G, d'ampicilline et d'amoxicilline à une concentration proche de leur LMR/2, il n'en va pas de même pour la détection sans ambiguïté de l'oxacilline et de la cloxacilline à des concentrations proches de leur LMR.

Malgré les différentes adaptations réalisées lors de l'étape d'extraction du rein de porc (décoloration, concentration, évaporation) qui ont permis au test de détecter de manière évidente la présence de 3 pénicillines à une concentration proche de leur limite maximale de résidus, ce test ne pourra être choisi comme test de screening dans notre stratégie intégrée, suite à son manque de sensibilité vis à vis de la cloxacilline et de l'oxacilline.

Nos investigations se sont arrêtées là suite à la mise sur le marché d'un nouveau test de screening beaucoup plus sensible que le Penzym. Ce test, appelé β -STAR et provenant également d'UCB-Bioproducts, est la version améliorée du Penzym pour la détection des β -lactames dans le lait.

6.2.1.1.1 Méthode utilisée : β -STAR

Le β -STAR est un test du type Récepteur Assay. Le test est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Au cours de la première incubation, les antibiotiques du type β -lactames présents dans l'échantillon se lient au récepteur. Pendant la deuxième incubation, l'échantillon migre sur un support immuno-chromatographique qui présente deux bandes de capture. La première bande retient tous les récepteurs non liés aux antibiotiques et la seconde bande permet de contrôler le bon déroulement du test (c'est la bande dite de référence). Au plus il y aura d'antibiotiques présents dans l'échantillon, au moins il y aura de récepteurs libres susceptibles de migrer sur le support et donc la première bande de capture sera moins visible. Le résultat est exprimé en comparant l'intensité des deux bandes. (figure 3 page 66).

Le β -STAR est un test prévu initialement pour détecter la présence des β -lactames présents dans le lait. L'application directe du test sur le surnageant d'un échantillon de rein broyé et centrifugé, n'est pas réalisable. Toute la tigette devient rougeâtre et les résultats ne sont pas interprétables. L'application du test β -STAR aux échantillons de rein de porc a donc également nécessité une extraction préalable des antibiotiques.

Tout comme pour le Penzym 100T, le tissu a été broyé et centrifugé. Le surnageant a ensuite été purifié à l'aide d'une colonne d'hydroxyapatite qui a la particularité de retenir les protéines tout en laissant passer les antibiotiques. Et enfin, l'éluat aqueux récolté est soumis au test β -STAR sans étape de concentration sur une colonne SPE, ni évaporation sous flux d'azote.

Une première observation a montré que contrairement au lait, la solution aqueuse migre plus rapidement sur la colonne immuno-chromatographique. Le test dure dès lors 4 minutes au lieu de 5 initialement prévu. Il faut aussi constater que dans certains cas, un problème de précipitation a lieu, ce qui fausse le résultat. En effet, si aucun précipité n'est observé lors du mélange entre les antibiotiques et le récepteur, une bande supplémentaire non conforme au β -STAR apparaît parfois sur le support immuno-chromatographique.

Après plusieurs essais, il est apparu que la troisième bande qui apparaissait sur la tigette était due à la présence de tampon phosphate recommandée pour la mise en suspension et la régénération du gel d'hydroxyapatite. Pour contrer ce problème, un compromis a été trouvé entre la quantité d'échantillon extrait au départ et chargé sur la colonne, la taille de la colonne d'hydroxyapatite, et l'utilisation d'eau à la place du tampon phosphate. L'utilisation de 750 μ l de suspension à la place de 5ml, nous permet de ne pas régénérer les colonnes sans en augmenter leur coût et d'éviter tout problème de contamination éventuelle.

Le mode opératoire finalement appliqué est le suivant, il est repris en détail dans le Protocole 2 de la page 104 de l'annexe 6.1.4.

Si la bande de référence n'apparaît pas, le test est considéré comme non-valide. Si la première bande a une intensité supérieure à celle de la bande de référence, le test est considéré comme étant négatif. Si par contre, l'intensité de la première bande est égale ou plus faible que la bande de référence, l'échantillon sera positif. Et dans le dernier cas, si la première bande n'apparaît pas du tout, l'échantillon sera ultra contaminé.

Les échantillons analysés ont été enrichis en β -lactames aux concentrations correspondant à la LMR/2, LMR et 2*LMR définies pour le rein. C'est-à-dire, 25, 50 et 100 μ g/kg pour la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline et 150, 300 et 600 μ g/kg pour la cloxacilline et l'oxacilline.

La limite de détection du test a été déterminée à 3-4ng/ml pour la pénicillineG contenue dans un extrait de rein. Ce qui implique qu'en suivant notre protocole d'extraction, le résultat sera positif à la LMR (équivalent à environ 5ng/ml) et négatif à la LMR/2 (équivalent à environ 2.5ng/ml). Cette observation est valable également pour l'ampicilline et l'amoxicilline où la LOD se situe entre la LMR et la LMR/2. Pour l'oxacilline et la cloxacilline, la LOD (entre 5 et 8 ng/ml) est nettement inférieure à leur LMR/2 (évaluée à 30 ng/ml dans l'extrait de rein) ce qui implique que le résultat du test sera toujours positif.

Ceci est en accord avec le Règlement européen qui exige d'un test de screening qu'il détecte les antibiotiques à des concentrations supérieures ou égales à la LMR fixée. En excluant tout les faux négatifs mais en admettant une quantité négligeable de faux positifs.

Le β -STAR étant un test qualitatif, voire semi-quantitatif, il répond à ce critère pour les 5 β -lactames analysés.

Les résultats obtenus suite à l'application du test β -STAR après extraction d'un rein de porc dopé, sont repris dans le tableau 2 de la page 81 de l'annexe 6.1.2.

Suite à ces résultats, la validation du test a été réalisée.

6.2.1.1.2 Validation

Pour valider la méthode, nous avons étudié le rendement d'extraction de la méthode, la limite de détection, la répétabilité et la robustesse.

Le rendement d'extraction

Celui ci a été évalué à l'aide d'une solution de pénicilline G tritiée (Amersham Life Science, England). 100µl d'une solution de pénicilline G tritiée a été ajouté à un échantillon de rein dopé à la LMR en pénicilline G froide. Suite à l'extraction décrite à la page 104 de ce rapport, la quantité de pénicilline G tritiée récoltée dans l'éluat final a été mesurée. Cette expérience effectuée trois fois nous a permis de calculer le rendement d'extraction de la méthode qui vaut $89.8 \pm 2.6 \%$ (n=3).

La limite de détection

La limite de détection a été définie comme étant la plus petite concentration à partir de laquelle le test devient positif. Après avoir analysé pour chaque antibiotique une gamme de concentrations allant de 0 à 10 ng/ml de solution finale après extraction d'un échantillon de rein, la limite de détection du test a été évaluée entre 3 et 4 ng/ml pour la pénicilline G et l'ampicilline ; entre 4 et 5 ng/ml pour l'amoxicilline ; et entre 5 et 8 ng/ml pour l'oxacilline et la cloxacilline.

Le tableau 3 de la page 82 de l'annexe 6.1.2 reprend la limite de détection (LOD) du test β -STAR 100 pour les 5 antibiotiques analysés à partir d'un extrait de rein et les compare aux valeurs définies par UCB-Bioproducts pour le lait.

Les valeurs des limites de détection du test trouvées lors de l'extraction du rein sont comparables aux valeurs indiquées par la firme pour l'analyse du lait. Comme déjà cité précédemment, ces LOD sont inférieures à la LMR de la pénicilline G, de l'ampicilline et de l'amoxicilline ; et nettement plus faible que la LMR/2 définie pour l'oxacilline et la cloxacilline. De ce fait, le test β -STAR détecte la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline à leur LMR alors que pour l'oxacilline et la cloxacilline, le résultat du test est toujours positif (de la LMR/2 à la 2* la LMR). Il en résulte que pour utiliser le β -STAR comme test de screening valable pour les 5 antibiotiques simultanément, le protocole d'extraction a été ajusté de manière à détecter les antibiotiques qui présentent la plus grande sensibilité au test, c'est à dire la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline.

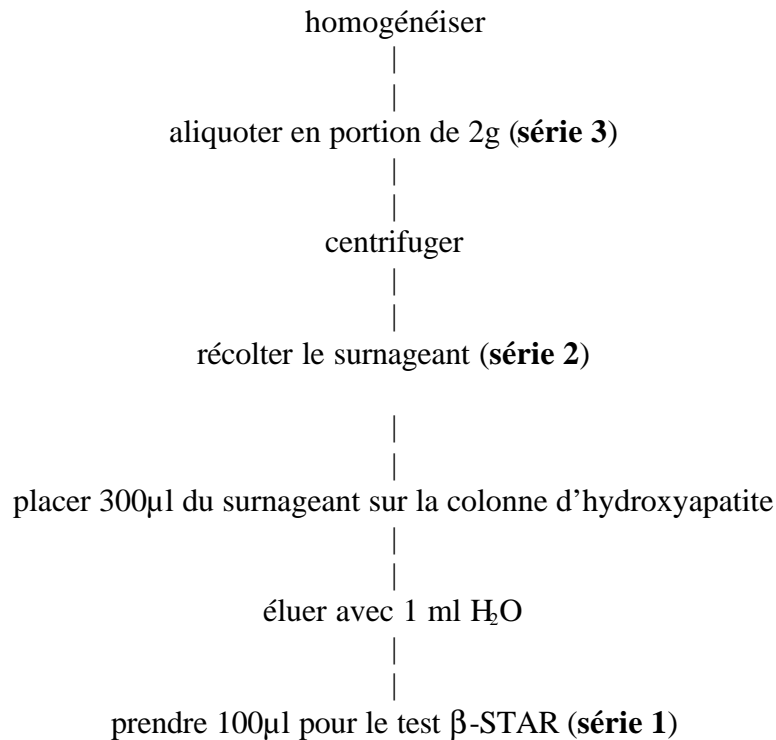
La fidélité

L'étude de la fidélité a permis de mesurer la répétabilité de la méthode. Pour cela, 4 séries d'expériences ont été réalisées :

- Série 1. Faire plusieurs tests β -STAR à partir de la même solution finale.
- Série 2. Réaliser plusieurs purifications et tests β -STAR à partir d'un même surnageant.
- Série 3. Analyser plusieurs aliquots de surnageants provenant d'un même rein.
- Série 4. Analyser plusieurs reins contaminés à la même concentration.

Pour rappel, voici le schéma d'extraction des antibiotiques :

5g rein (**série 4**)
+
15ml H₂O
|
|



La plus petite concentration détectée par le β-STAR pour la cloxacilline et l'oxacilline est de l'ordre de 5 à 8 ng/ml. Ce qui est deux à trois inférieure à la LMR/2 pour ces deux antibiotiques. Le résultat du test est donc systématiquement ultra positif pour ces deux antibiotiques. C'est la raison pour laquelle, des expériences complémentaires ont été réalisées sur les trois autres antibiotiques pour lesquels la concentration proche de la LMR représente le point critique de détection. Pour ceux-ci, on observe rarement des résultats négatifs, parfois des positifs et comme attendu, le plus souvent des ultra positifs.

Lors de la première série d'expériences, la solution finale obtenue à la fin du protocole d'extraction a été soumise trois fois au test β-STAR.

Il en ressort qu'à partir d'une même solution finale, le test de screening est reproductible à 100% pour la pénicilline G, l'oxacilline et la cloxacilline ; à 100% pour l'amoxicilline (qui reprend des valeurs ultra positives à 97% et positives à 3%) et à 90% pour l'ampicilline (80% d'ultra positifs et 10% de positifs). Les 10 % restant dans l'analyse de l'ampicilline étant considérés comme faux négatifs. (tableau 4 de la page 82 de l'annexe 6.1.2).

Lors de la deuxième série d'expériences, le surnageant obtenu après centrifugation de l'extrait de rein, a été divisé en 3 portions de 300µl. Chaque fraction de 300µl a été purifiée sur une colonne d'hydroxyapatite. Et enfin l'éluat final obtenu a été soumis deux fois au test. Le tableau 5 de la page 82 de l'annexe 6.1.2 reprend les résultats obtenus.

On observe quasi la même tendance dans le tableau 5 de la page 82 que celle obtenue lors de l'analyse de la première série d'expériences. C'est-à-dire que lorsqu'un seul surnageant est purifié sur plusieurs colonnes d'hydroxyapatite et soumis au test, la récupération de la pénicilline G, de l'oxacilline et de la cloxacilline est de 100%. Celle de l'amoxicilline est de 96% (33% de ultra positifs et 63% de positifs) et de l'ampicilline de 96% (33% d'ultra

positifs et 63% de positifs). Pour améliorer le résultat du test, la vitesse d'éluion a été diminuée. Cette précaution nous a permis de récupérer 97% d'amoxicilline (94% d'ultra positifs et 3% de positifs) et 92% d'ampicilline (78% d'ultra positifs et 14% de positifs). Cependant, il reste encore 3 et 8 % de faux négatifs respectivement pour l'amoxicilline et l'ampicilline.

La troisième série d'expériences a permis de mettre en évidence l'homogénéité d'un extrait de rein dopé avant extraction. Après avoir supplémenté 5g de rein avec 100 μ l d'une solution d'antibiotique à la concentration désirée, 15ml d'eau ont été rajouté. Après homogénéisation, le broyat a été aliquoté en fraction de 2g avant d'être centrifugé. Chaque surnageant des différentes fractions a été purifié sur une colonne d'hydroxyapatite et soumis au test de screening. Le tableau 6 de la page 83 de l'annexe 6.1.2 reprend les résultats obtenus.

Les résultats montrent qu'on retrouve une quantité semblable d'antibiotiques dans chaque fractions d'extrait de rein homogénéisé au départ.

La dernière série d'expériences permet de montrer la variation des résultats obtenus lors de l'analyse journalière (intra-jours) de plusieurs reins dopés et ce pendant 4 jours (analyse inter-jours). tableau 7 de la page 83 de l'annexe 6.1.2.

On remarque qu'à la LMR/2 tous les échantillons sont négatifs pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline. A la LMR, la pénicilline G indique toujours le même résultat positif. Sans aucune variations entre les échantillons . Pour l'ampicilline et l'amoxicilline, les résultats sont ultra positifs respectivement à 82 et 95%, ils sont positifs pour 15 et 3% des échantillons. Mais environs 3% de négatifs sont à noter pour ces deux antibiotiques à une concentration proche de la LMR. Pour l'oxacilline et la cloxacilline, les concentrations à détecter sont tellement élevées par rapport à la limite de détection du test, que tous les résultats sont positifs.

En général, on peut donc dire que le test est reproductible à chaque niveau de l'analyse, pour chaque antibiotique et pour chaque concentrations analysées sans trop de faux négatifs (entre 3-4% pour l'amoxicilline et 3-10% pour l'ampicilline).

Malgré tout, ce test reste un test qualitatif avec une lecture visuelle soumise à l'appréciation de chacun. Il ne fait que donner une idée de la présence ou non de β -lactames dans l'échantillon, sans préciser exactement ni la concentration, ni l'identité de l'antibiotique analysé. Pour ce faire, une technique analytique de confirmation est nécessaire: la chromatographie en phase liquide.

6.2.1.2 Confirmation

6.2.1.2.1 Méthode utilisée : HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été choisie comme méthode analytique pour confirmer la présence des β -lactames dans les échantillons de reins. Cette technique permet de définir en une seule étape, l'identité et la concentration de l'antibiotique détecté lors du test de screening.

Suite à l'extraction des antibiotiques au travers d'une colonne d'hydroxyapatite, l'échantillon est concentré sur une colonne SPE (Oasis HLB, Waters). Les composés à noyau β -lactames présents dans l'échantillon sont ensuite dérivatisés par un agent mercurique (selon la méthode décrite par Boison & al (Réf. 1)) avant d'être injecté dans l'HPLC.

Matériels utilisés :

Les extraits de rein sont analysés sur une chaîne HPLC Waters 996 munie d'un détecteur UV à barrettes de diodes. Le logiciel Millennium 2015 (Millennium32) fournit par la firme, nous permet de gérer et analyser les données chromatographiques. Les antibiotiques sont concentrés sur une pré-colonne (C₁₈ Nova Pack) avant d'être séparés sur une colonne Nova Pack C₁₈ 60Å 4µm; 3,9*150mm (Waters). La phase mobile est constituée d'un mélange acétonitrile - tampon phosphate à pH 6,5 – 0,1M (38/62 ; v/v). Le débit de la phase mobile est de 1ml /min et l'élution se poursuit pendant 10 minutes. Le dosage par HPLC se fait en mode isocratique. La détection des pénicillines est lue dans l'UV à 325nm.

Une description plus détaillée du mode opératoire se trouve dans le Protocole 3 de la page 104 de l'annexe 6.1.4 de ce rapport.

La quantification des antibiotiques est basée sur l'élaboration de droites de calibration qui sont représentées aux figure 4, figure 5 et figure 6 de l'annexe 6.1.2 (pages 66, 67, 68).

La figure 7 et la figure 8 montrent clairement que la résolution entre chaque composé est suffisante pour les identifier séparément sans aucune interférence.

Pour un rein dopé à la limite maximale de résidu (c-à-d 50µg/kg pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline et 300µg/kg pour l'oxacilline et la cloxacilline), le rendement de récupération moyen de la méthode varie de 55.1 % à 90.1 % selon l'antibiotique extrait.

La limite de détection a été évaluée à 15 µg/kg pour la pénicilline G, l'amoxicilline, l'ampicilline et à 75 µg/kg pour l'oxacilline et la cloxacilline conformément aux critères de décisions 93/256/CEE et 93/257/CEE. La limite de quantification est de 25 µg/kg pour le premier groupe d'antibiotiques et de 150 µg/kg pour la cloxacilline et l'oxacilline.

La pénicilline V, qui ne possède pas de LMR a été choisie comme standard interne. Cependant, ce composé n'a pu être pris comme standard interne, car l'étude de l'exactitude a révélé des résultats en-dehors de la fourchette 80-110% imposée par cette même norme.

6.2.1.2.2 Validation

Nous avons étudié la spécificité, la linéarité, la limite de détection, la limite de quantification, l'exactitude et la répétabilité intra- et inter-jour. L'ensemble des résultats respectent les critères de la norme européenne 96/256/CEE.

La spécificité :

La spécificité est la capacité de la méthode à discerner l'analyte à mesurer d'autres substances. Elle peut s'exprimer par la résolution mesurée entre les pics chromatographiques.

Le chromatogramme d'une solution standard indique que les 6 molécules de la famille des β -lactames sont détectés avec des temps de rétention TR tous différents les uns des autres. Lors de l'analyse d'un échantillon de rein non dopé (blanc), aucune interférence n'est observé aux temps de rétention bien spécifique. Par contre, une interférence apparaît lors de l'analyse d'un échantillon de rein dopé avec les 6 antibiotiques. Cette interférence vient perturber la détection de l'amoxicilline (voir figure 7, figure 8 et la figure 9 de l'annexe 6.1.2).

La séparation réelle entre deux pics A et B s'exprime par la résolution R :

$$R = 2(T_{RB} - T_{RA}) / W_{bA} + W_{bB}$$

Où W_b est la largeur à la base du pic.

En sachant que si $R = 1$ les pics sont séparés à 98%
 $R = 1.5$ la résolution est complète

On peut dire que la résolution est complète entre les 6 β -lactames, excepté pour la pénicilline V et la pénicilline G où les pics sont séparés à 98%. L'identification des composés est donc tout à fait possible. Le tableau 8 de la page 83 reprend les temps de rétention requis pour chaque antibiotique.

La linéarité :

Pour chaque molécule la linéarité a été vérifiée sur des échantillons de rein dopés à 6 concentrations différentes : 0 – LMR/4 – LMR/2 – LMR – 2*LMR – 4*LMR. Correspondant respectivement à 0 – 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la pénicilline G, l'ampicilline, l'amoxicilline et la pénicilline V et à 0 – 75 – 150 – 300 – 600 – 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la cloxacilline et l'oxacilline (annexe 6.1.2, figure 4 page 66, figure 5 page 67 et figure 6 page 68). Les échantillons ont été analysés suivant la procédure décrite dans le Protocole 3 de la page 104 de l'annexe 6.1.4.

Les paramètres des 3 courbes de calibration sont repris dans le tableau 9 de la page 84 de l'annexe 6.1.2.

L'équation de la moyenne des droites de calibration réalisées pendant trois jours sur les échantillons dopés est repris dans tableau 10 de la page 84 de l'annexe 6.1.2.

Ces droites d'étalonnage serviront à la quantification des échantillons.

Limite de détection et de quantification :

La limite de détection (LOD) a été évaluée lors de l'étude de la linéarité de la réponse. Elle peut être définie de deux manières différentes. La première définition exprime la LOD comme étant la plus petite quantité injectée dont le rapport signal sur bruit est supérieur à 3 (directive CEE 93/256). La deuxième définition est plus théorique et se base sur la droite de calibration obtenue pour calculer la LOD et la LOQ.

Si on considère la première définition, on détecte jusqu'à la MRL/4 pour chaque composé (c-à-d 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la pénicilline V, la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline ; et 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la cloxacilline et l'oxacilline) contenu dans une solution standard. Alors que dans

un échantillon de rein dopé, la limite de détection équivaut à la MRL/4 pour la cloxacilline et l'oxacilline (75 µg/kg) et se situe entre le MRL/4 et la MRL/2 pour les 4 autres antibiotiques (c-à-d à 15 µg/kg).

La limite de quantification (LOQ) représente selon la première définition, la plus petite concentration injectée pour laquelle la méthode a été validée avec précision et exactitude.

Le tableau 11 de la page 84 de l'annexe 6.1.2 indique les différentes valeurs de LOD et LOQ évaluées pour les 6 β-lactames extraits d'un échantillon de rein dopé.

La deuxième définition est décrite par Christopher M. Riley, (Réf. 2) qui reprend l'approche IUPAC. Il dit que les techniques spectroscopiques qui se basent sur une droite de calibration pour quantifier, utilisent la déviation standard de l'origine (S_{eb} quand $x = 0$), et la pente de la droite de calibration (m) pour définir la limite de détection et de quantification.

$$LOD = 3 * S_{eb} / m$$

$$LOQ = 3.3 * LOD$$

On constate que d'après le calcul, les valeurs de LOD et LOQ sont nettement inférieures à celles mesurées et ne sont pas applicables dans notre cas selon le protocole décrit précédemment (voir tableau 12 de la page 85 de l'annexe 6.1.2.).

Rendement de récupération moyen :

Le rendement de récupération a été calculé sur base de la droite de calibration réalisée chaque jour à partir d'échantillons de rein dopés aux différentes concentrations (figure 5 de la page 67 de l'annexe 6.1.2.). Le tableau 13 de la page 85 de l'annexe 6.1.2. indique la moyenne des rendements de récupération obtenus sur 4 jours ainsi que le pourcentage de récupération moyen de la méthode.

Le pourcentage de récupération moyen de la méthode a été calculé pour chaque molécule en prenant en compte l'ensemble des valeurs correspondant aux trois concentrations. Soient 25, 50 et 100 µg/kg pour la pénicilline G, la pénicilline V, l'amoxicilline et l'ampicilline et 150, 300 et 600 µg/kg pour l'oxacilline et la cloxacilline.

L'exactitude :

L'exactitude de la méthode est le degré de concordance entre la valeur moyenne mesurée et la valeur réelle. Elle est exprimée en pourcentage de la valeur réelle (directive CEE 93/256). Elle a été mesurée sur des échantillons de rein supplémentés à 25, 50, 100, 150, 300 et 600 µg/kg avec 4 répétitions par concentration. Les résultats sont repris dans le tableau 14 de la page 85 de l'annexe 6.1.2. Selon la norme 93/256/CEE et 23/257/CEE, l'exactitude doit être comprise entre 80 et 110% pour des échantillons réels dopés à plus de 10 µg/kg.

On constate que la pénicilline V, contrairement aux autres antibiotiques, ne répond pas à ce critère. On ne pourra donc pas l'utiliser comme standard interne.

La fidélité :

L'étude de la fidélité a permis de mesurer la répétabilité, c'est à dire les variations inter-jour et intra-jour de la méthode. Cette répétabilité est décrite par le coefficient de variation (CV) qui représente le rapport entre l'écart-type et la moyenne. Un échantillon de rein supplémenté à 50 µg/kg et à 300 µg/kg a été analysé 4 fois et ce pendant 4 jours. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15 de la page 86 de l'annexe 6.1.2 .

Pour chaque molécule trois tableaux sont présentés. Le premier reprend les valeurs brutes obtenues. Le second indique les valeurs brutes corrigées par la valeur du pourcentage de récupération moyen de la méthode pour cette molécule-là. Et le troisième tableau reprend les calculs de répétabilité intra-jour (CV_r) et inter-jour (CVR) appliqués aux valeurs brutes corrigées par le rendement moyen (ou pourcentage de récupération).

Le tableau 16 de la page 90 indique les coefficients de variation en répétabilité inter-jour (CVR). Ceux-ci sont à chaque fois inférieurs à la limite fixée par la décision 93/256/CEE concernant la répétabilité des méthodes d'analyse de référence (soit entre la moitié et les deux tiers de la valeur retrouvée selon la formule de Horwitz $C(\%) = 2^{(1-0.51\log C)}$: entre 12.6 % et 16.7 % pour une concentration de 50 µg/kg, et entre 9.6 % et 12.8 % pour 300 µg/kg).

6.2.1.3 Conclusion générale sur l'analyse des β-lactames

Dans le cadre du développement d'une stratégie intégrée de l'analyse des résidus d'antibiotiques contenus dans la viande, nous avons déterminé le test de screening à appliquer aux extraits de rein pour la détection des antibiotiques de la famille des β-lactames.

En effet, nous avons adapté aux extraits carnés le test β-STAR 100, commercialisé pour la détection des β-lactames dans le lait. L'adaptation consiste à diminuer la quantité d'extrait placé sur la colonne d'extraction, à diminuer la taille de cette colonne afin de supprimer la régénération possible de la colonne (cause possible de contamination) et à remplacer le tampon phosphate utilisé dans la colonne par de l'eau. La dernière recommandation vise la vitesse d'élution qui ne doit pas être trop rapide.

Une fois le protocole d'extraction appliqué, il apparaît que la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline sont détectées à une concentration proche de la LMR. Alors que pour l'oxacilline et la cloxacilline, des concentrations inférieures à la LMR/2 sont détectées positivement par le test.

La limite de détection évaluée pour les 5 antibiotiques dans l'extrait de rein est proche de la limite de détection définie pour les échantillons de lait par le fournisseur du kit. Pour l'oxacilline et la cloxacilline, la concentration dans l'extrait de rein équivalente à la LMR/2 est largement supérieure à la limite de détection du test. C'est la raison pour laquelle, tous ces résultats seront toujours très positifs. Ce qui est à l'origine de faux positifs.

En suivant le protocole décrit, le rendement d'extraction est de 90%. Les différentes expériences réalisées ont montrées que l'extraction et le test étaient reproductibles (> 90%). Les résultats obtenus font apparaître entre 3 et 10% de faux négatifs attribués à l'analyse de

l'ampicilline et entre 3 et 4 % de faux négatifs pour l'amoxicilline. Aucun faux négatif n'est apparu pour les trois autres antibiotiques.

Suite à tout cela, le β -STAR 100 a été choisi comme test de screening pour la détection des β -lactames dans les échantillons réels. Mais celui-ci n'étant qu'un test qualitatif, voire semi-quantitatif, une méthode de confirmation a été sélectionnée pour confirmer leur présence dans les échantillons et les quantifier.

Nous avons appliqué la méthode de BOISON (Laboratoire Communautaire de Référence de Fougères, France, (Réf. 1). pour le dosage des antibiotiques de type β -lactames dans le rein par chromatographie liquide à haute performance.

Cette méthode est basée sur la dérivatisation des pénicillines avec de l'anhydride benzoï que à 50°C, suivie d'une réaction avec de 1,2,4 triazole et le chlorure mercurique à 65°C. Le dosage se fait en mode isocratique sur une colonne de silice greffé. La lecture photométrique se fait à 325nm.

La limite de détection, définie comme étant la plus petite concentration injectée pour laquelle le rapport signal sur bruit est supérieur à trois, a été évaluée à 15 et 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ selon l'antibiotique analysé.

La limite de quantification, correspondant à la plus petite concentration pour laquelle la méthode a été validée avec une exactitude et une précision spécifiées (CE 23/256), est de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline, et de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'oxacilline et la cloxacilline.

Cette méthode d'analyse répond donc aux exigences du règlement CEE 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990 qui a fixé les limites maximales de résidus d'antibiotiques de type β -lactames dans le rein à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline, et à 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'oxacilline et la cloxacilline.

Il faut toutefois noter qu'étant donné l'instabilité du produit dérivatisé, il est impératif de dérivatiser juste avant l'injection dans l'HPLC. Si les échantillons dérivatisés sont laissés une nuit à 4°C, les composés sont dégradés. Si par contre ils sont laissés pendant 4h à température ambiante, ils disparaissent complètement.

Une autre remarque à laquelle il faut faire attention, est le renouvellement fréquent des solutions constituant la phase mobile de l'HPLC. Cette précaution permet d'éviter l'apparition de certaines interférences dans le spectre.

Une autre méthode, décrite dans la littérature permettrait de diminuer sensiblement la limite de détection des antibiotiques en évitant l'étape sensible de dérivatisation. Il s'agit de la chromatographie liquide suivie d'un détecteur de masse (LC/MS). Etant donné qu'actuellement beaucoup de laboratoires s'équipent de cet instrument, il serait intéressant de poursuivre cette piste par la suite.

6.2.2 *Quinolones*

La famille des quinolones regroupe des composés organiques artificiels dérivés de la quinolone doués d'une activité antibiotique bactéricide à spectre initialement étroit dirigé contre les bactéries à Gram négatif, particulièrement les entérobactéries. Les nouvelles quinolones (fluoroquinolones de seconde génération) ont actuellement un spectre élargi et agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Ils sont indiqués dans les traitements contre les infections urinaires, digestives et pulmonaires.

Leur structure chimique plane leur permet de s'insérer entre les deux chaînes d'ADN et de bloquer ainsi la réplication de l'ADN.

Chaque quinolone possède un noyau aromatique hétérocyclique (un noyau quinoléine), une fonction cétone en position para de l'azote hétérocyclique et une fonction carboxylique – COOH en C₃. Elles se différencient les unes des autres par les groupes R1, R2 et R3. La figure 10 de la page 70 et la figure 11 de la page 71 représentent la formule générale des quinolones ainsi que la structure des principales quinolones utilisées.

Les principales quinolones sont la fluméquine, l'acide oxolinique, l'acide nalidixique, l'enrofloxacin et son métabolite la ciprofloxacine, la norfloxacine, l'énofloxacin, l'ofloxacine, la cinoxacin, la danofloxacine et la marbofloxacine .

En général, l'élimination des quinolones dans l'organisme ne dépasse pas 7 jours. Mais si ce délai d'attente avant l'abattage n'est pas respecté et si les antibiotiques ont été utilisés de manière abusive, des résidus peuvent persister dans les tissus consommés par l'homme. Pour protéger le consommateur des effets toxiques que pourraient provoquer la présence de ces résidus, l'Union Européenne a décrété des limites maximales de résidus (LMR) pour certains quinolones suivant le Règlement CEE n°2377 / 90 du Conseil du 22 juin 2000. Voir le tableau 39 de la page 101 de l'annexe 6.1.3.

Il faut rappeler aussi que ce groupe d'antibiotiques est particulièrement dans le collimateur des spécialistes du problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques puisque l'usage en médecine humaine et vétérinaire des (fluoro)quinolones serait particulièrement impliqué dans l'augmentation de la résistance de certaines bactéries pathogènes à des groupes divers d'antibiotiques.

6.2.2.1 Screening

Actuellement, il n'existe pas sur le marché de test de screening multi-résidus développé pour la famille des quinolones. Nous sommes dès lors directement passés à la technique de confirmation par LC/MS/MS.

6.2.2.2 Confirmation

Certains des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire sont difficilement disponibles en tant que standards. Sur les 8 antibiotiques repris dans la législation et pour lesquels une limite maximale de résidus a été définie par l'Union Européenne, seuls 6 composés ont été trouvés (la fluméquine, l'acide oxolinique, la marbofloxacine, l'enrofloxacin, la danofloxacine et la ciprofloxacine). Malheureusement, d'autres demandes plus explicites auprès des compagnies pharmaceutiques ne nous ont pas permis d'obtenir ni la difloxacine ni la sarafloxacine. Les résultats qui seront présentés par la suite ne mentionneront pas la danofloxacine

systématiquement. En effet, celle-ci nous a été fournie fort tard et n'a pu être intégrée dès le départ dans nos analyses.

Dès lors, afin de déterminer le comportement analytique des quinolones, nous avons décidé d'inclure dans nos analyses, d'autres quinolones qui ne possèdent pas encore de LMR. Il s'agit de l'acide nalidixique, la norfloxacin, l'ofloxacin, la cinoxacin, et l'enoxacin.

La première étape a consisté à améliorer le rendement d'extraction des antibiotiques contenus dans les reins. Nous nous sommes basés sur la méthode décrite dans la littérature par Martin D. Rose et al (Réf. 3) pour l'extraction des quinolones acides. Cependant, certains antibiotiques à analyser étant acides et d'autres basiques, quelques petites modifications ont été apportées.

Le choix de la colonne SPE et du solvant d'extraction utilisés s'est basé sur le rendement d'extraction obtenu à l'aide de la norfloxacin marquée au C^{14} et à l'aide de la quantification par spectrométrie de masse par rapport aux solutions standards de quinolones.

Plusieurs colonnes d'extraction en phase solide et divers protocoles d'extraction ont été testés. Parmi les colonnes utilisées, on retrouve les échangeuses de cations (SCX) de IST-Isolute, les colonnes C_{18} , Bond Elute Certify de JT-Baker, les systèmes Sep Pack (échangeuses d'anions) et Oasis HLB (hydrophile et hydrophobe) de Waters Corporation et les disques d'extraction SDB-RPS et MPC-SD (mélange de C_8 et échangeuse de cations) de la firme 3M Empore.

Les colonnes C_{18} ne nous ont pas permis d'extraire en une seule étape et de manière efficace tous les antibiotiques recherchés. Ceux-ci ayant des propriétés chimiques forts différentes (pK_a).

L'utilisation de colonnes échangeuses de cations (IST-SCX) ou d'anions (Waters Sep-Pack) ont permis d'atteindre des rendements d'extraction variant de 40 à 75 % selon l'antibiotique analysé. Cependant, l'éluat obtenu après extraction était tellement sale qu'une redissolution complète (avant injection dans l'HPLC), n'a pu être réalisée après l'évaporation à sec de l'extrait. Il a fallu rajouter lors de l'extraction, une étape de rinçage avec de l'eau et / ou un solvant organique. Ce qui n'a fait que diminuer encore le rendement d'extraction.

Les rendements d'extraction obtenus avec les colonnes Bond Elute Certify (mélange de C_{18} et d'échangeuse de cations) sont comparables à ceux calculés pour les colonnes SDB-RPS. Tous les (fluoro)quinolones suivis, sont détectés. Cependant, quelques interférences ainsi que des fluctuations de la ligne de base sont observées sur le chromatogramme lors de l'utilisation des Bond Elute Certify. C'est la raison pour laquelle notre choix s'est porté sur la colonne SDB-RPS. D'après les conseils de la firme 3M Empore, l'extraction d'antibiotiques à partir de matrice solide telle que le rein, est plus aisée sur les colonnes SDB-RPS (qui contiennent un support polymérique). Dans ce cas, la colonne est chargée avec une solution très fluide contenant l'extrait de rein dans de l'acétonitrile. Par opposition, les colonnes MPC-SD de la même firme, contiennent plus de résines poreuses destinées à des échantillons plus visqueux tels que le lait ou le plasma.

Le rendement d'extraction des colonnes SDB-RPS est de $93 \pm 2\%$ ($n = 6$) pour la norfloxacin marquée au C^{14} . Les autres antibiotiques ajoutés à des échantillons de rein à des concentrations allant de la LMR/2 à 2 fois la LMR donnent des rendements d'extraction variant de 83 à 98 % (RSD = 2 – 7 %) (voir tableau 17 de la page 91 de l'annexe 6.1.2.).

Finalement, la méthode d'extraction retenue (décrite dans le Protocole 4 de la page 106 de l'annexe 6.1.2.) part de la centrifugation d'un gramme de rein homogénéisé. Le surnageant obtenu est acidifié avant d'être soumis à l'extraction sur phase solide (SPE 3M SDB-RPS). La solution méthanolique d'éluat est évaporée à sec et reprise dans 300 µl d'un mélange eau – acide formique à pH 2.5. Après filtration, 50µl de la solution sont injectés dans l'HPLC pour être séparé et analysé par MS/MS.

6.2.2.2.1 Méthode utilisée : LC/MS/MS

L'analyse des quinolones par LC/MS/MS a été réalisée en collaboration avec le Dr G. Van Vyncht de l'Institut de Mesure des Matériaux de Référence de la Commission Européenne (IRMM).

Le système de chromatographie liquide (Waters Alliance 2690) est couplé à un spectromètre de masse de type Quattro-LC triple quadripoles (Micromass). Les composés, séparés par HPLC sont ionisés à l'aide d'une source électrospray en mode positif avant d'être fragmentés et analysés par le spectromètre de masse en tandem en mode MRM.

Delepine & al (Réf. 4) suggèrent d'utiliser la source APCI pour ioniser les quinolones. Mais d'après nos observations basées sur la comparaison du rapport signal / bruit obtenu lors de l'injection d'une solution standard d'antibiotiques à 100 ng/ml, l'ESI est 5 fois plus sensible que l'APCI. Nous avons donc choisi l'électrospray comme mode d'ionisation des antibiotiques.

L'analyse par spectrométrie de masse requiert idéalement l'utilisation d'un standard deutéré proche de la substance à analyser afin de quantifier par le principe de la dilution isotopique. Celui-ci n'existant pas pour les quinolones, nous avons demandé la synthèse d'une quinolone deutérée, la norfloxaciné deutérée. Cette synthèse a été réalisée dans le Centre de Recherches du Cyclotron (CRC) du Pr. Luxen. En attendant la production de ce composé, et à défaut d'autres produits, nous avons testé le tinidazole et la quinine comme standard interne.

Les rendements d'extraction du tinidazole variant entre 48 et 64 %, son utilisation ne nous a pas semblée adéquate pour quantifier nos extraits. Les meilleurs résultats en terme de linéarité et de reproductibilité, ont été obtenus avec la quinine. En effet, celle-ci n'interfère avec aucune des transitions suivies pour chaque molécule analysée et en suivant le protocole d'extraction décrit plus haut pour un rein de porc, une solution de 10ng/ml de quinine est détectée avec un rapport signal sur bruit supérieur à 5.

Les extraits de rein ont été dopés à des concentrations égales à la LMR pour les composés qui en ont une et arbitrairement à 150 µg/kg pour les autres (la norfloxaciné, la cinoxaciné, l'ofloxaciné, l'énoxaciné et l'acide nalidixique).

Après extraction des antibiotiques, 50µl de la solution sont injectés sur la colonne chromatographique utilisée dans l'HPLC. Il s'agit d'une colonne RP C₁₈ Nucléosil 100-5 (70*4mm ; 5µm taille des particules) Macherey-Nagel qui permet d'allier un temps d'analyse court avec une capacité de colonne relativement élevée afin d'accepter des échantillons tels que les extraits de rein. L'élution des antibiotiques est réalisée en moins de 5 minutes à l'aide d'un gradient linéaire passant de 2 à 70 % d'acétonitrile avec un débit de 1ml/min. Ce gradient est décrit dans le tableau 18 de la page 91 de l'annexe 6.1.2. Les 11

(fluoro)quinolones analysés ont un temps de rétention variant entre 2.5 et 5 minutes (voir tableau 19 de la page 91).

Les autres types de colonnes chromatographiques testées ne permettent pas une analyse aussi aisée de l'extrait de rein centrifugé. En effet, les colonnes de 150*2mm et 150*1mm saturent très rapidement lors de l'injection des surnageants. Ce qui provoque un élargissement des pics chromatographiques et une déviation des temps de rétention. De plus, la longueur de ces colonnes allonge le temps d'analyse de 5 à 20 minutes.

Entre la sortie de la colonne HPLC et l'entrée dans la source ESI du spectromètre se trouve un « split » (Valco (Micromass) avec un volume mort de 0). Ce « split » en forme de T est ajusté à 1/10 de telle manière à réduire le débit de la phase mobile en dessous de 100µl/min avant son introduction dans la source électrospray. Ceci permet notamment d'éviter de devoir nettoyer la source toutes les 30 injections. La température de la colonne et de l'échantillon est maintenue à 25°C.

Les paramètres de réglage du spectromètre de masse sont dépendants du type d'ionisation mais aussi des molécules analysées. En effet, pour une technique d'ionisation donnée, dans notre cas le mode électrospray en mode positif, chaque molécule possède ses propres paramètres de réglage pour une sensibilité optimale. Puisque l'objectif est de réaliser une analyse de type « multirésidus », nous avons fait un compromis entre les différents réglages.

Les paramètres suivant ont été fixés tout le long de l'analyse :

Ionisation = ESI +

Voltage du capillaire = 3.2 kV

T° source = 130°C

T° désolvation = 400°C

Débit du gaz de désolvation (N₂) = 650 l/h

Débit du gaz de nébulisation (N₂) = 75 l/h

Pression de l'argon dans la cellule de collision = 2.5 10⁻³ mbar

Les seuls paramètres que nous avons fait varier pendant l'analyse est le voltage du cône ainsi que l'énergie de collision. Le tableau 19 de la page 91 de l'annexe 6.1.2 indique les conditions d'ionisation dans la source à électrospray en mode positif ainsi que les conditions de séparation et de détection MS/MS optimisés pour chaque composés.

Le voltage du cône a été réglé pour chaque substance en vue d'obtenir l'ion moléculaire protoné le plus abondant. L'optimisation des paramètres a été réalisée en infusant de manière constante une solution de 100ng/µl de chaque antibiotique via une pompe pour seringue (10µl/min).

Pour répondre à la directive européenne 96/23/EEC concernant l'analyse des résidus dans les denrées alimentaires, un minimum de deux transitions ont été suivies pour chaque antibiotique. L'utilisation du spectromètre de masse en tandem suivi d'une acquisition réalisée en mode MRM « Multiple Reaction Monitoring » avec une résolution à l'unité de masse (pour 10 % de vallée) et un temps de repos de 100 ms / transition, ont permis d'augmenter la spécificité et la sensibilité de l'analyse.

6.2.2.2.2 Pré-validation

Lors d'une première étude, nous avons analysé la spécificité, la linéarité, la limite de détection et de quantification, le rendement d'extraction, l'exactitude et la répétabilité intra-jour. L'ensemble des résultats respectent, à ce stade-ci, les critères de la norme européenne 93/256/EEC.

La spécificité :

La spécificité est la capacité de la méthode à discerner l'analyte à mesurer d'autres substances. La simple mesure du temps de rétention ne suffit pas toujours à distinguer la présence de plusieurs antibiotiques, bien que la mesure du temps de rétention relatif de l'analyte corresponde à celui du standard dans le cas qui nous préoccupe.

La méthode de spectrométrie de masse en tandem, permet de détecter au moins deux ions filles identifiés pour chaque ion parent moléculaire. Ce qui rend cette technique très spécifique. Le tableau 19 de la page 91 reprend les temps de rétention et la masse des ions filles suivie pour chaque quinolone analysé. Les chromatogrammes de la solution standard ainsi que d'un rein dopé à la LMR/4 montrent les transitions suivies pour chaque quinolone (figure 12, figure 13). On remarque qu'aucune interférence ne vient perturber l'analyse des antibiotiques (figure 14).

La linéarité :

La linéarité a été vérifiée sur des échantillons de reins dopés aux 6 concentrations suivantes : 0 – LMR/4 – LMR/2 – LMR – 2*LMR et 4*LMR.

Le tableau 20 de la page 92 indique les concentrations utilisées pour les courbes d'étalonnage. Etant donné qu'on analyse 1g de rein, la quantité ajoutée (par exemple 150ng pour l'acide oxolinique à la LMR) correspond à la concentration dans le rein (c-à-d 150ng/g ou encore 150µg/kg à la LMR). La LMR fixée par le règlement CEE 2377/90 pour l'enrofloxacin et la ciprofloxacine correspond à la somme de ces deux composés. Cette limite maximale de résidus est fixée à 300µg/kg. Pour établir la droite de calibration, nous avons analysé 150µg/kg de chacun de ces deux composés à la LMR.

Les échantillons dopés ont été extraits et analysés suivant la procédure décrite dans le Protocole 4 de la page 106 de l'annexe 6.1.4. Les courbes de calibration réalisées à partir de rein dopés sont repris dans la figure 15 de l'annexe 6.1.2. Toutes les courbes de calibration réalisées pour les 10 (fluoro)quinolones sont linéaires dans une gamme de concentration allant de LMR/4 à 4*LMR.

Les paramètres des trois courbes de calibration sont repris dans le tableau 21 de la page 92 de l'annexe 6.1.2. Les équations de la moyenne des 3 droites de calibration réalisées à partir d'échantillons dopés se trouvent dans tableau 22 de la page 93 de l'annexe 6.1.2.

Limite de détection et de quantification :

La détection et la quantification des quinolones ont été réalisées par le suivi de l'ion parent et des ions filles. La figure 12 de la page 72, la figure 13 de la page 72 et la figure 14 de la page

72 montrent les chromatogrammes obtenus pour une solution standard à la LMR/4, pour un rein dopé à la LMR/4 et pour un échantillon de rein non dopé (blanc). Aucune interférence ne vient perturber l'analyse des antibiotiques extrait d'un rein de porc.

D'après les plus petites quantités injectées et les chromatogrammes qui en découlent, il apparaît clairement que ces limites sont largement inférieures aux concentrations équivalentes à la LMR / 4 définies pour chaque composé.

Si on calcule la limite de détection selon l'équation du rapport de la déviation standard de l'origine (S_{eb} quand $x = 0$) sur la pente de la droite de calibration (m) et la limite de quantification égale à 3.3 fois la LOD, on obtient des concentrations supérieures à celles observées lors de l'expérience. Le tableau 23 de la page 94 indique les concentrations de LOD et LOQ calculées et observées et les compare aux LMR fixées.

$$LOD = 3 * S_{eb} / m$$

$$LOQ = 3.3 * LOD$$

Expérimentalement, si on suit le Protocole 4 décrit pour l'extraction et l'analyse des (fluoro)quinolones contenus dans le rein de porc, il est possible de quantifier les 10 antibiotiques en moins de 5 minutes à des concentrations bien inférieures à la LMR/4.

Le rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction a été calculé sur base des équations des droites de calibration. Pour chaque quinolone, la réponse (exprimée par le rapport entre la surface du pic de l'antibiotique analysé et la surface du pic du standard interne) a été traduite en concentration via les équations des droites.

Les rendements moyens obtenus lors de l'extraction des quinolones contenus dans des reins de porc varient de 83 à 98% ($n=6$). (voir le tableau 17 de la page 91 de l'annexe 6.1.2).

L'exactitude :

L'exactitude de la méthode est le degré de concordance entre la valeur moyenne mesurée et la valeur réelle. Elle est exprimée en pourcentage de la valeur réelle (directive CEE 93/256).

Afin d'établir des tests préliminaires de quantification, le protocole d'extraction a été appliqué sur des échantillons de reins de porc dopés à 100, 200 et 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec 10 répétitions. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 24 de la page 94, le tableau 25 de la page 95 et le tableau 26 de la page 95 de l'annexe 6.1.2. Selon les normes 93/256/CEE et 93/257/CEE, l'exactitude doit être comprise entre 80 et 110% pour des échantillons réels dopés à plus de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

On constate que l'exactitude de la méthode pour les 11 (fluoro) quinolones est très satisfaisante aux trois niveaux de concentrations (entre 89 et 108 %) avec une déviation standard relative comprise entre 4 et 8% à 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, entre 2 et 7% à 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et entre 4 et 7% à 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Toutes les déviations standard mesurées sont inférieures à 8%. La méthode

appliquée répond donc aux critères de la directive européenne pour l'analyse des (fluoro)quinolones.

La fidélité :

Les variations intra-jours permettent de mesurer la répétabilité de la méthode. Celle-ci est décrite par le coefficient de variation (CV) qui représente le rapport entre l'écart-type et la moyenne. Un extrait de rein dopé à la LMR/2, la LMR et 2*LMR pour chaque antibiotique a été analysé 6 fois endéans la même journée. Les résultats obtenus lors de l'analyse de la fluméquine et de l'acide oxolinique sont montrés à titre d'exemple dans le tableau 27 de la page 95 et le tableau 28 de la page 96 de l'annexe 6.1.2. Pour ces molécules, on constate que la variation intra-jour est inférieure à 15%. Mais une validation plus complète notamment pour les variations inter-jours est nécessaire.

6.2.2.3 Conclusion générale sur l'analyse des quinolones

Dans le cadre du développement d'une stratégie intégrée de l'analyse des résidus d'antibiotiques contenus dans la viande, nous avons déterminé le test de confirmation à appliquer aux extraits de rein pour la détection des antibiotiques de la famille des (fluoro)quinolones.

La recherche des composés standards utiles pour développer une méthode d'analyse, nous a mené à disposer de 6 (fluoro)quinolones sur les 8 repris dans la législation de l'Union Européenne. Il s'agit de la fluméquine, l'acide oxolinique, la marbofloxacin, l'enrofloxacin, la danofloxacin et la ciprofloxacin. Afin de déterminer le comportement analytique des quinolones en général, d'autres composés de cette famille ne possédant pas encore de LMR, ont été inclus dans nos analyses. Il s'agit de l'acide nalidixique, l'ofloxacin, la cinoxacin et l'enoxacin. De plus, ne disposant pas de standard deutéré adéquat, la quinine a été choisie pour quantifier les résidus.

La première étape a consisté à mettre au point la technique d'extraction des antibiotiques. Pour cela, parmi les différentes colonnes d'extraction en phase solide testées, il s'est avéré que les colonnes SDB-RPS de la firme 3M sont les plus rapides et les plus efficaces pour l'extraction simultanée de tous les (fluoro)quinolones contenus dans les reins de porcs. Le rendement d'extraction calculé à partir de la norfloxacin C^{14} , est de $93 \pm 2 \%$ ($n = 6$). Pour les autres antibiotiques ajoutés à des concentrations allant de la LMR/2 à 2 fois la LMR dans des échantillons de rein, le rendement d'extraction varie de 83 à 98 % (RSD = 2 - 7 %).

Après avoir homogénéisé et centrifugé un gramme de rein dans 10 ml d'acétonitrile, le surnageant est filtré puis acidifié à l'acide acétique. Le passage sur la colonne SPE permet d'extraire les antibiotiques dans un mélange méthanol/ammoniac (75/25, v/v). Après évaporation à sec, ils sont repris dans une solution $H_2O/HCOOH$ à pH 2.5 avant d'être injectés dans l'HPLC qui est couplée au spectromètre de masse en tandem.

Dans l'analyse qui nous préoccupe, la sensibilité et la sélectivité ont été augmentées par l'utilisation de la source électrospray en mode positif, suivie de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) avec une acquisition en mode MRM. Pour répondre à la directive

européenne 96/23/EEC concernant l'analyse des résidus dans les denrées alimentaires, un minimum de deux transitions ont été suivies pour chaque antibiotique.

La limite de détection observée est largement inférieure à la concentration équivalente à la LMR / 4 pour chacun des antibiotiques analysés.

Expérimentalement, si on suit le protocole décrit pour l'extraction et l'analyse des (fluoro)quinolones contenus dans le rein de porc, il est possible de quantifier les 11 antibiotiques en moins de 5 minutes à des concentrations inférieures à la LMR / 4.

Les tests préliminaires de quantification sur des reins dopés au départ à 100, 200 et 300 µg/kg, montrent une exactitude variant entre 89 et 109 %. Ce qui répond aux normes 93/256/CEE et 23/257/CEE qui précisent que l'exactitude doit être comprise entre 80 et 110% pour des échantillons réels dopés à plus de 10 µg/kg.

La première approche de l'analyse des (fluoro)quinolones indique que la méthode utilisée par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide convient à l'analyse multi-résidus attendue. Cependant, si les résultats sont plus qu'encourageants, une validation plus approfondie et complète reste à faire afin de pouvoir soumettre cette technique comme méthode officielle pour l'analyse des (fluoro)quinolones.

6.2.3 *Macrolides*

Les macrolides sont fréquemment utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les maladies respiratoires ou comme additifs alimentaires et promoteurs de croissance. Suite aux risques pour le consommateur liés à la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires, le Règlement CEE n° 2377 / 90 du Conseil du 4 mars 1999 a déterminé les limites maximales de résidus (LMR) à ne pas dépasser. Pour les macrolides, elles ont été fixées dans le rein de porc, à 200 µg/kg pour l'érythromycine A, à 300 µg/kg pour la somme de la spiramycine et de la néospiramycine, à 1000 µg/kg pour la spiramycine1 et la tilmicosine et à 100 µg/kg pour la tylosineA. Le tableau 40 de la page 101 reprend les valeurs des limites maximales de résidus établies pour les macrolides.

Les macrolides sont constitués par un macrocycle porteur d'une fonction lactone, sur laquelle viennent se greffer deux ou plusieurs sucres dont l'un est aminé. En raison de la présence d'une ou parfois de deux amines, les macrolides sont des molécules basiques (pK_a de l'érythromycine = 8.8).

Elles sont classées en fonction de la taille de leur macrocycle qui contient 12 à 16 atomes :

14 atomes : érythromycine, oléandomycine, dirithromycine, roxithromycine

15 atomes : azithromycine

16 atomes : spiramycine, miocamycine, timicosine, josamycine, tylosine

Les seules possédant une limite maximale de résidus sont : l'érythromycine, la spiramycine et néospiramycine, la tilmicosine et la tylosineA (voir le tableau 40 de la page 101 de l'annexe 6.1.3).

6.2.3.1 Screening

6.2.3.1.1 Méthode utilisée : RRA

La méthode utilisée pour détecter les macrolides est un dosage par compétition de type radio-récepteur essai mis au point par notre équipe. Ces récepteurs-essais sont basés sur une compétition entre un antibiotique marqué et l'antibiotique présent dans l'échantillon à doser, pour un récepteur bactérien. C'est à dire des bactéries porteuses de sites de liaisons spécifiques vis-à-vis de ces antibiotiques. Les macrolides agissent en se fixant sur des sites intracellulaires localisés, notamment, au niveau des ribosomes (voir schéma général à la figure 2 de la page 64 de l'annexe 6.1.2).

Les ribosomes ont été préparés selon la technique de F. Doucet-Populaire (Réf. 5) au départ de cultures bactériennes de *Bacillus subtilis* ultracentrifugées. Le protocole complet de préparation des ribosomes (Protocole 5) se trouve à la page 107 de l'annexe 6.1.4.

L'inhibition de la liaison spécifique du traceur radioactif (érythromycine C¹⁴) aux ribosomes a été calculée lors de l'incubation de 100µl d'une suspension de ribosomes correspondant à 300µg de protéines avec des concentrations croissantes d'érythromycine ou de josamycine, ou de spiramycine, ou de tylosine (voir les graphes a- à d- de la figure 16 de la page 73 de l'annexe 6.1.2).

L'intersection de la droite de calibration pour la valeur 0 du logit détermine sur l'axe des abscisses des valeurs représentant les doses en antibiotiques (ng/100µl/tube) inhibant la liaison de 50% du traceur.

Cet ID 50, permet de déterminer la limite de détection des antibiotiques. Elle se situe à 14 ng /100µl de ribosomes (56ng/g de rein) pour l'érythromycine et la spiramycine, 40 ng/100µl de ribosomes pour la tylosine, et 31 ng/100µl de ribosomes pour la josamycine.

Le Protocole 6 de la page 107 de l'annexe 6.1.4 reprend en détail l'application des ribosomes dans le dosage des macrolides. Chaque série de dosages comprend l'analyse d'une solution témoin, d'une solution non spécifique, d'une courbe de calibration et des échantillons.

L'application aux extraits de rein de porc nécessite une extraction préalable qui consiste à broyer et centrifuger 5g de rein dans du tampon Mc Ilvain. Le surnageant est purifié sur une colonne Oasis HLB (Waters) et les macrolides sont élués avec 2ml de méthanol. Après évaporation à sec, le résidu est repris dans 200µl de tampon phosphate 0.01M (voir Protocole 7 de la page 109 de l'annexe 6.1.4).

Le rendement d'extraction des colonnes Oasis est de 98 % ± 3 % (n = 3) pour l'érythromycine marquée au C¹⁴. Les autres antibiotiques ajoutés à des échantillons de rein à une concentration équivalente à la LMR donnent des rendements de récupération de 96 % lorsqu'ils sont mesurés à l'aide du radio-récepteur assay.

6.2.3.2 Confirmation

6.2.3.2.1 Méthode utilisée : LC/MS/MS

Pour confirmer les résultats obtenus lors du screening, une méthode de chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem a été développée. Plusieurs auteurs décrivent les paramètres utilisés pour détecter les macrolides par LC/MS/MS. Ils se différencient principalement par le choix de la source d'ionisation. Ainsi, Délépine et al. (Réf. 6) détectent dans des échantillons de muscles dopés, la présence de 5 macrolides à 50 µg/kg chacun en utilisant un spectromètre de masse à faisceau de particules. D'autres tels que Dubois et al (Réf. 7) utilisent un mode d'ionisation plus doux tel que l'électrospray en mode d'ionisation positif.

La méthode décrite ci-après pour l'analyse des macrolides contenus dans les extraits de rein de porc s'est inspirée de ce dernier article.

Le système de chromatographie liquide utilisé (Finnigan Spectra-System P4000) est couplé à un spectromètre de masse de type LCQDeca (ThermoQuest Finnigan). Les composés séparés par HPLC, sont ionisés à l'aide d'une source électrospray en mode positif avant d'être fragmentés et analysés par le spectromètre de masse en tandem en mode full scan.

Les paramètres de réglages du spectromètre de masse sont dépendant du type d'ionisation mais aussi des molécules analysées. En effet, pour une technique d'ionisation donnée, dans notre cas le mode électrospray en mode positif, chaque molécule possède ses propres paramètres de réglage pour une sensibilité optimale. Puisque l'objectif est de réaliser une analyse de type « multirésidus », nous avons fait un compromis entre les différents réglages.

Les paramètres suivant ont été fixés tout le long de l'analyse :

Ionisation = ESI⁺

Voltage du capillaire = 39V

T° source = 350°C

Débit du gaz de désolvatation (N₂) = 80 unités

Débit du gaz de nébulisation (N₂) = 20 unités

Volume d'injection = 20 µl

Le seul paramètre que nous avons fait varier pendant l'analyse est l'énergie de collision. Le tableau 29 de la page 96 de l'annexe 6.1.2 indique les conditions d'ionisation dans la source à électrospray en mode positif ainsi que les conditions de séparation et de détection MS/MS optimisés pour chaque composés. L'optimisation des paramètres a été réalisée en infusant de manière constante une solution de 100 ng/µl pour chaque antibiotique via une pompe pour seringue (10µl/min). Pour répondre aux critères de la directive européenne 96/23/EEC, l'ion parent ainsi que trois ions filles ont été suivis pour chaque macrolide.

Les ions parents suivis, correspondent à l'ion moléculaire protoné à l'aide de la solution d'acétate d'ammonium utilisée dans la phase mobile de l'HPLC. Le passage de 100 % d'acétate d'ammoniaque 0.1M à 100 % d'acétonitrile, permet l'élution des 5 antibiotiques en moins de 10 minutes. Le tableau 30 de la page 97 de l'annexe 6.1.2 précise le gradient appliqué pour la séparation des macrolides. Remarque : un programme de rinçage (de la 10^{ème} à 20^{ème} minutes) a été appliqué lors de l'analyse de chaque échantillon pour éviter toute contamination ultérieure .

Les extraits de rein ont été dopés à des concentrations variant de la LMR/4 à 2*la LMR pour l'érythromycine, la tylosine, la josamicine et la spiramycine. La lincomycine a été utilisée

comme standard interne et donc ajoutée à une concentration égale à 500µg/kg. Le tableau 31 de la page 97 indique les concentrations ajoutées pour chaque antibiotique.

Les résultats obtenus sont trop peu nombreux pour prétendre à une validation. Cependant, on peut dire que :

1. La méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, permet de détecter au moins trois ions filles en plus de l'ion parent spécifiques à chaque macrolide étudié (voir tableau 29). Ce qui rend cette technique très spécifique.
2. Les chromatogrammes de la solution standard ainsi que d'un rein dopé à la LMR/4 montrent les ions moléculaires suivis ainsi que les ions filles qui en découlent (figure 17, figure 18 et figure 19). On remarque qu'aucune interférence ne vient perturber l'analyse.
3. La lincomycine, (macrolide sans LMR) a été choisie comme standard interne. Cependant, il s'est rapidement avéré que cette molécule ne convenait pas comme standard interne dû probablement à sa structure différente des autres macrolides.
4. Les courbes de calibration ont donc été basées sur la réponse de la surface du pic en fonction de la concentration de l'antibiotique.
5. La linéarité a été vérifiée sur des échantillons de reins dopés aux 5 concentrations suivantes : 0 – LMR/4 – LMR/2 – LMR et 2*LMR. Le tableau 31 indique les concentrations utilisées pour établir les courbes d'étalonnage. Tous les échantillons de rein dopés ont été extraits selon le Protocole 8 décrit à la page 109 de l'annexe 6.1.4. Toutes les courbes de calibration réalisées pour les 5 antibiotiques sont linéaires dans une gamme de concentration allant de la LMR/4 à 2*LMR (figure 20 et figure 21). Les paramètres des courbes de calibration sont repris dans le tableau 32 de l'annexe 6.1.2. L'équation de la moyenne des droites de calibration réalisées à partir d'échantillons de rein dopés, se trouve dans le tableau 33 de l'annexe 6.1.2.
6. Le chromatogramme obtenu lors de l'analyse d'un rein de porc dopé à la LMR/4 pour chaque macrolide indique clairement, que la limite de détection peut être revue à la baisse. Le tableau 34 indique les valeurs de limites de détection et de quantification observées lors de l'expérience et calculées sur base du rapport de la déviation standard de l'origine (S_{cb}) et de la pente (m) de la droite de calibration. Excepté pour la tylosine, la limite de détection obtenue par le calcul mathématique est nettement supérieure à la limite de détection observée expérimentalement.
7. Etant donné que les concentrations à la LMR/4 sont parfaitement visibles, cette technique répond aux critères de la directive européenne qui précise que la méthode doit être capable de quantifier sans ambiguïté des concentrations égales à la LMR/2.
8. Les rendements d'extraction ont été estimés sur base des équations des droites de calibration. Pour chaque macrolide, la réponse a été traduite en concentration via les équations des droites. Les rendements moyens varient de 85 à 97 %.

6.2.3.3 Conclusion macrolides

Dans le cadre du développement d'une stratégie intégrée de l'analyse des résidus d'antibiotiques contenus dans la viande, nous avons sélectionné le test de screening à appliquer aux extraits de rein pour la détection des antibiotiques de la famille des macrolides. Il s'agit d'un radio-récepteur essai basé sur une compétition entre l'antibiotique marqué (l'érythromycine C¹⁴) et l'antibiotique à doser dans l'échantillon, pour un récepteur bactérien du type ribosomes.

La méthode d'extraction utilisée pour le dosage des macrolides par radio-récepteur essai, convient à l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. La différence réside principalement dans la composition de la solution de reprise du résidu sec obtenu et de la quantité chargée sur la colonne Oasis.

La LC/MS/MS est dotée d'une source électrospray qui permet une ionisation douce des molécules en mode positif. Ceci nous a permis de confirmer la présence des macrolides en détectant non seulement l'ion moléculaire mais également 3 ions filles par composé.

Les résultats obtenus sont plus qu'encourageants. Il reste à refaire l'expérience de nombreuses fois afin de prétendre à une validation qui permettra d'utiliser cette méthode d'analyse comme méthode de référence.

6.2.4 Phénicolés

Les antibiotiques de la famille des phénicolés sont potentiellement utiles en raison de leur large spectre et de leur bonne pénétration dans le système nerveux central. Jusqu'en 1994, ils furent fréquemment utilisés pour leur propriétés antibactérienne et pharmacocinétique. Cependant, chez l'homme, le chloramphénicol provoque une anémie aplasique pour laquelle la relation dose-effet, n'est pas encore bien établie. C'est la raison pour laquelle, son utilisation a été interdite dans le traitement des animaux utilisés comme denrées alimentaires. Contrairement au florfenicol, au florfenicol amine et au thiamphénicol, qui possèdent une limite maximale de résidu (tableau 41), l'usage du chloramphénicol a été strictement interdit par l'Union européenne depuis le 4 mars 1999.

Les phénicolés sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs également d'un phényle substitué. Le groupement dichloroacétamide est important pour l'activité antibiotique. Quatre molécules sont utilisées en clinique : le chloramphénicol, le thiamphénicol, le florfenicol et le florfenicol amine (voir figure 22 à la page 77 de l'annexe 6.1.2).

Comme les macrolides, les phénicolés se fixent à la sous unité 50S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-cyl-ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation.

6.2.4.1 Screening

6.2.4.1.1 Méthode utilisée : ELISA

D'après la littérature, il n'existe pas de test de screening qui permette de détecter à la fois le chloramphénicol et ses dérivés. Jean-Pierre Abjean (Réf. 8) rapporte une méthode d'analyse en chromatographie sur couche mince qui détecte à la fois le chloramphénicol, les sulfonamides et les nitrofuranes. Allen P. Pfenning et al (Réf. 9) décrivent une méthode multirésidues par chromatographie en phase gazeuse qui permet, après dérivatisation de chacun des composés, de détecter à la fois le chloramphénicol, le florfenicol, le florfenicol amine et le thiamphénicol contenus dans des crevettes. D'autres techniques telles que la chromatographie liquide ont été utilisées pour quantifier les résidus de chloramphénicol (Réf. 10 et Réf. 11). Cependant, pour une analyse de routine, une simple méthode d'immuno-essai permet de diminuer le coût et le temps de l'analyse.

Notre choix s'est porté sur le kit RIDASCREEN de Biopharm. Ce test ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay ») est basé sur le principe de compétition pour le dosage quantitatif du chloramphénicol (CAP) dans la viande, les œufs et le lait.

Les avantages de ce kit, décrits par le fournisseur sont nombreux : très grande sensibilité (de l'ordre du ppt), une spécificité liée à la qualité de l'anticorps utilisé, une excellente reproductibilité, l'absence de réactif radioactif, ...

Le kit RIDASCREEN contient une plaque de 96 puits, tous les réactifs nécessaires à la détection du chloramphénicol, ainsi que les solutions standards utiles à la formation des courbes de calibration. Son principe (schématisé à la figure 2 de la page 64) est le suivant :

96 puits sont recouverts sur leur surface interne d'anticorps de mouton dirigés contre des IgG de lapins. Dans une première phase d'incubation, on ajoute dans chaque puit, des anticorps spécifiques anti-chloramphénicol produits sur lapins, un conjugué enzymatique du CAP (CAP-horse radish peroxidase : CAP-HRP) et des molécules de CAP libres présentes soit sous forme de standards de concentrations définies pour établir la courbe de calibration soit dans l'échantillon à doser.

Lors de l'incubation, les anticorps spécifiques se lient aux anticorps immobilisés et au même moment, le chloramphénicol (CAP) libre et la CAP conjugué à l'enzyme HRP entrent en compétition pour occuper les sites de liaisons des anticorps spécifiques (d'où l'appellation d'immuno-essais enzymatique compétitif).

Après une heure d'incubation à température ambiante, l'étape de lavage permet d'éliminer toutes les molécules de CAP-HRP non liées aux anticorps spécifiques.

La quantité de chloramphénicol libre présent dans l'échantillon est inversement proportionnelle à la quantité de molécules de CAP-HRP liées aux anticorps. L'addition d'un substrat enzymatique (urea peroxide) ainsi que d'un chromogène (tétraméthylbenzidine – TMB) permet de mettre en évidence la présence des molécules CAP-HRP liées aux anticorps spécifiques. Ce mélange incolore vire au bleu d'une intensité proportionnelle à la concentration en conjugué enzymatique. Cette réaction de coloration est stoppée après 30 minutes par l'addition d'une solution d'acide sulfurique (0.5M) provoquant un virage du bleu au jaune et l'arrêt définitif de la réaction.

La lecture de l'intensité de la couleur jaune se fait à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La densité optique est inversement proportionnelle à la concentration en CAP libre présent

dans la solution standard ou dans l'échantillon. Le Protocole 9 décrit plus précisément le mode opératoire appliqué.

Quatre courbes de calibration ont été réalisées à l'aide des solutions standards de chloramphénicol couvrant une gamme de concentrations allant de 0 à 4050 ng/L (ppt). Les paramètres des courbes sont présentés à la figure 23, la figure 24, la figure 25 et la figure 26. La figure 27 montre les caractéristiques de la moyenne des 4 courbes. On remarque que la droite est linéaire dans ce domaine de concentration.

L'application à des tissus tels que le rein, nécessite une extraction préalable du chloramphénicol. Les fournisseurs du kit suggèrent de broyer 5g de rein dans 20 ml d'un mélange eau/acétonitrile (84/16, v/v). Après homogénéisation à l'aide d'un turax, le mélange est centrifugé 10 minutes à 3000g à 15°C.

3ml de surnageant sont ensuite prélevés et mélangés à 3ml d'eau. L'ajout de 4.5ml d'acétate d'éthyle permet d'extraire le chloramphénicol et après centrifugation, 3ml de la phase d'acétate d'éthyle sont évaporés à sec. Le résidu sec est repris dans 1.5ml de tampon phosphate (0.02M pH 7.2) et agité en présence de 1.5ml d'hexane. Après élimination de la phase organique, 50µl de la phase aqueuse sont utilisés dans le test ELISA (voir Protocole 10).

Le rendement de récupération du chloramphénicol dans la phase d'acétate d'éthyle a été estimé à l'aide d'un surnageant de broyat de rein dopé avec une solution de chloramphénicol marqué au C¹⁴. Le broyat est dopé de manière à avoir environ 10 000 coups par minute (cpm) par ml. Suivant le mode opératoire décrit dans le Protocole 10, 3ml de ce surnageant ont été mélangés à 3ml d'eau et à 4.5ml d'acétate d'éthyle. Après agitation, environ 30 000 cpm de CAP C¹⁴ aurait dû se retrouver dans la phase organique. La moyenne des résultats (n = 3) indiquant 21 300 cpm, le pourcentage de récupération du chloramphénicol dans la phase d'acétate d'éthyle est de 71 %.

La même démarche a été appliquée pour déterminer le rendement de récupération de la méthode. Mais en lieu et place du chloramphénicol marqué au C¹⁴, 5g de rein ont été dopés à 10 ng/g avec 100 µl d'une solution stock de CAP à 5 µg/ml. Le mode opératoire suivi est le même que celui décrit précédemment.

Les résultats ont été calculés comme ceci :

1. 5g de viande + 20ml d'eau/acétonitrile représente une dilution de 1g / 4ml.
2. 3ml de surnageant = 0.75g de tissu
3. les 0.75g de tissu sont repris dans 1.5ml de tampon phosphate dont 50 µl vont dans le puits
4. on a donc x ng de CAP / 50 µl de solution / 0.025g de tissu
5. La courbe d'étalonnage indique les valeurs obtenues pour les standards en ng / L
6. Donc, si 50 µl représentent 0.025g de tissu ; 1 litre représente 500 g de tissu
7. les valeurs obtenues au départ de la courbe d'étalonnage doivent donc être multipliées par 2 pour obtenir une concentration en ng / kg de tissu (ppt).

En tenant compte de ce calcul, la quantification des échantillons dopés (n = 3) équivaut à 7312 ng / kg de rein, soit 7.3 ng / g (ppb).

Le rendement de récupération de la méthode = $(7.3 / 10) * 100 = 73 \%$

Ces valeurs de récupération, respectivement de 71.5 % dans l'acétate d'éthyle et de 73 % dans des échantillons de rein dopés corroborent le rendement de 76 % défini dans le fascicule qui accompagne le kit RIDASCREEN.

Utilisation de colonne SPE :

Afin d'améliorer le rendement d'extraction, les colonnes d'extraction en phase solide C₁₈, (Bond Elut 100mg, Varian) ont été testées.

Les colonnes ont été conditionnées à l'aide de 2ml de méthanol suivis de 2ml d'eau distillée. Ensuite, elles ont été chargées avec une solution contenant 590 µl d'eau + 10 µl d'une solution à 5 µg/ml de CAP dans l'eau (50 ppb) + 40 µl d'une solution CAP C¹⁴ à 10 000 cpm / 100 µl dans l'eau. Après rinçage avec 1 ml d'eau, les colonnes ont été centrifugées 10 minutes à 3000g et 4°C. Le chloramphénicol marqué et non marqué ont été récupérés par élution de 4 fractions successives de 250 µl de méthanol.

Le comptage de 100µl d'éluat de chaque colonne a donné une valeur moyenne de 37485 cpm. Ce qui équivaut à un rendement de récupération de 95.2%.

Cette amélioration sensible du rendement de récupération nous a conduit à établir le schéma d'extraction suivant pour l'analyse des reins dopés. Ce mode opératoire est décrit dans le Protocole 11 de ce rapport.

En bref, 5g de rein sont homogénéisés dans 15 ml d'eau. 1g de broyat est centrifugé 30 minutes à 30 000g et 4°C. Le surnageant obtenu est chargé sur une colonne C₁₈ préalablement conditionnée à l'aide de méthanol et d'eau. Après rinçage avec de l'eau et séchage par centrifugation, le chloramphénicol est élué par 4 * 250µl de méthanol. L'éluat est évaporé à sec avant d'être repris dans 500µl de tampon phosphate. Finalement, 50 µl de cette dernière solution est soumise au test ELISA.

Le rendement d'extraction obtenu après l'analyse d'échantillons de rein dopés à 5 ppb est de 4.85 ng / g soit 97 % (n = 3).

La spécificité du test est décrite par le fournisseur. Elle est de 100 % pour le chloramphénicol. Les autres réactions croisées sont très faibles, elle sont de 0.5 % pour la base du chloramphénicol, 0.05% pour le thiamphénicol et inexistantes pour les tétracyclines, la gentamycine et l'ampicilline.

Le dosage du chloramphénicol est donc réalisable à l'aide du test RIDASCREEN en un minimum de temps et avec peu d'équipement. Ce test ELISA peut donc être utilisé comme test de screening mais uniquement pour le chloramphénicol, les autres phénicolés ne réagissant pas aux anticorps utilisés. Pour doser les autres phénicolés, une méthode plus sensible et multirésidus doit être appliquée.

6.2.4.2 Confirmation

6.2.4.2.1 Méthode utilisée : LC/MS/MS

Le choix de la méthode d'identification et de confirmation des phénicolés s'est porté sur la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. Contrairement à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, cette technique ne nécessite pas la dérivation préalable des molécules. Ce qui réduit le temps de préparation de l'échantillon et les pertes possibles pouvant survenir lors de cette manipulation.

Divers paramètres ont été testés sur les 4 molécules recherchées,

6.2.4.3 Conclusion phénicolés

Le kit RIDASCREEN de la firme Biopharm pour la détermination quantitative du chloramphénicol dans la viande prévoit dans sa notice d'accompagnement un pourcentage de récupération de 76 %. Ce pourcentage a été confirmé sur des échantillons de reins de porcs dopés avec du chloramphénicol à 10ppb.

L'application de la technique simple d'extraction en phase solide sur colonne C18 Bond Elut 100mg de Varian, a permis d'améliorer considérablement ce rendement de récupération jusqu'à environ 97 %.

Selon le fournisseur, la limite de détection du chloramphénicol dans les tissus est de 0.05 ng /g.

Cette technique simple permet dès lors de faire un screening rapide sur des échantillons suspects.

Pour identifier le chloramphénicol ainsi que le florfénicol, le florfénicol amine et le thiamphénicol, les premiers développements d'une méthode LC / APCI / MS / MS ont été testés. Un des principaux avantages de cette technique réside dans l'élimination de l'étape de dérivation des composés comme c'est le cas lors de l'analyse des phénicolés par chromatographie en phase gazeuse.

Plusieurs paramètres variables tels que le mode d'ionisation (positif ou négatif), la phase mobile (méthanol, acétonitrile, mélange acétonitrile – acétate d'ammonium 0.1M), le voltage du cône et l'énergie de collision ont été testés pour chacune des molécules.

Selon la sensibilité observée, nous avons opté pour la source à ionisation chimique à pression atmosphérique en lieu et place de la source par électrospray. Et l'ionisation en mode positif. En effet, celle-ci permet de détecter les 4 molécules simultanément.

Voici les masses des ions représentatifs du chloramphénicol (CAP), du thiamphénicol (TAP), du florfénicol (FF) et du florfénicol amine (FFA) analysés par APCI en mode positif.

Antibiotique	Masse moléc.	[M+H] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-H ₂ O-CH ₂ O] ⁺
CAP	322	323	305	275
TAP	355	356	338	308
FF	357	358	340	310
FFA	247	248	230	202

Nos investigations se sont arrêtées à ce stade pour cause de problèmes techniques. Cependant, il serait intéressant de poursuivre ce développement pour permettre une analyse rapide, d'identification et de quantification des 4 phénicolés.

6.3 Application sur des échantillons réels

Les analyses ont été réalisées sur des échantillons de reins de porcs et de boeufs provenant de différents abattoirs de Belgique, testés positivement au test rénal belge. Dans le cadre de ce programme SSTC, ces échantillons nous ont été fournis par nos partenaires de l'Institut d'Expertise Vétérinaire (IEV). Dans un premier temps, ils ont été analysés pour la présence de résidus de tétracyclines et puis de sulfonamides par nos collègues de l'Université de Gand. Ceux-ci ayant ces deux familles d'antibiotiques dans leur taches décrites dans ce même projet SSTC.

La stratégie appliquée est la suivante :

1. les tissus analysés sont positifs au test rénal belge
2. suivant la probabilité de présence de certaines familles d'antibiotiques, l'ordre suivant a été appliqué :
 - a. analyse des tétracyclines
 - b. analyse des sulfonamides
 - c. analyses des β -lactames
 - d. analyses des macrolides
 - e. analyse des phénicolés
3. pour chaque famille, le test de screening propre à cette famille là a été appliqué avant le test de confirmation (lui aussi spécifique à chaque famille).
4. les échantillons qui se sont révélés positifs au test de screening et qui ont été confirmés positifs par la méthode de confirmation n'ont pas été soumis à l'analyse des autres familles d'antibiotiques.
5. dès lors, des échantillons détectés positifs en tétracyclines n'ont pas été testés pour les familles b, c, d et e.
6. Les échantillons détectés positifs en sulfonamides, n'ont pas été testés pour les familles c, d et e.

Suite aux résultats obtenus de la part de nos collègues flamands, sur 85 échantillons reçus de l'IEV, 17 ont été analysés pour la détection des β -lactames, des macrolides et du chloramphénicol.

Les résultats obtenus pour notre partie sont repris dans le tableau 35 de la page 98.

L'analyse des β -lactames :

Parmi les 17 échantillons analysés, un seul a répondu positivement au test de screening β -STAR. La figure 28 montre clairement l'absence de la première bande sur la tigette de l'échantillon n° 35 qui correspond à un échantillon de rein de boeuf.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance des 17 échantillons a permis de confirmer la présence d'ampicilline dans l'échantillon n°35 et de le quantifier à 1553 ng / g (figure 29).

L'analyse des macrolides :

Le test de screening utilisé pour l'analyse des macrolides est un immuno-assay de type radio-récepteur essai utilisant les ribosomes comme récepteur bactérien. Le

tableau 36 reprend les valeurs des concentrations (ng / g) mesurées pour les 17 échantillons. L'analyse au RRA nous informe qu'un échantillon est très positifs (le n°7) et que 4 autres répondent également positivement au test.

Les limites maximales de résidus étant différentes pour chaque molécule appartenant à la famille des macrolides, les échantillons ont été analysés par LC/MS/MS. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 37, on constate que seul l'échantillon n° 7 d'un rein de bœuf présente une concentration en spiramycine détectable (figure 30). Sa concentration a été calculée à 93.5 ng/g, ce qui est nettement inférieure à sa limite maximale de résidu fixée à 1000 ng/g.

Ceci montre que la méthode de screening présente encore des faux positifs et qu'il faut donc impérativement confirmer les résultats de screening par une méthode physico-chimique.

L'analyse du chloramphénicol :

La figure 31 indique les résultats obtenus par la méthode ELISA appliquée sur les 17 échantillons ainsi que sur un rein témoin négatif (blanc). Le rein témoin a donné une teneur finale en chloramphénicol de 0.1 ng/g. Une fois cette valeur soustraite, quatre échantillons sur dix sept ont présenté des valeurs positives variant de 0.4 à 1.2 ng/g. Il s'agit des échantillons n° 16, 23, 28 et 61.

La méthode physico-chimique étant en cours de développement, la confirmation des ces analyses n'a pu être réalisée.

L'analyse des (fluoro)quinolones :

Actuellement, il n'existe pas sur le marché de test de screening multi-résidus développé pour la famille des quinolones. Une recherche, subsidiée par le Ministère fédéral de l'Agriculture et l'IEV, est en cours à ce sujet dans notre laboratoire avec la collaboration du groupe du Prof. J.M. Frère (CART et CIP, ULg).

Il n'a donc pas été possible à ce stade d'inclure la recherche des quinolones dans les échantillons fournis par l'IEV.

6.4 Conclusions et recommandations ULg

La stratégie analytique suggérée dans le projet a été mise en application pour plusieurs familles d'antibiotiques. Si elle s'est avérée complète pour l'analyse des résidus d'antibiotiques de la famille des β -lactames, il n'en est pas de même pour les autres familles. En effet, il n'existe pas toujours sur le marché de test de screening multi résidus pour une

même famille d'antibiotiques (cfr, les quinolones et les phénicolés). Dès lors, une méthode de confirmation, plus onéreuse mais tout aussi rapide et plus sensible en général que les tests de screening, a été développée.

7. CONCLUSIONS GENERALES DU PROJET ET RECOMMANDATIONS

Les importantes modifications de stratégie du contrôle des résidus dans les denrées alimentaires et dans les produits alimentaires imposés par la directive européenne 96/23/CE et le Règlement du Conseil CEE N°2377/90 qui sont entrés pleinement en application récemment requièrent aussi une modification de la stratégie d'utilisation par les laboratoires de contrôle des méthodes d'analyse pour la détermination des résidus de médicaments vétérinaires et particulièrement des antibiotiques.

Pour ces derniers composés, on doit se poser la question de savoir si la démonstration de la présence de substances inhibant la croissance bactérienne est encore suffisante pour justifier la saisie de la carcasse de l'animal. Les dispositions européennes nouvellement entrées en vigueur nécessiteraient l'identification de la substance antibactérienne, suivie de la détermination de sa concentration dans le produit animal comestible pour le consommateur humain et de la comparaison de sa valeur avec celle de la LMR dans la denrée correspondante. Des méthodes d'analyse quantitative fiables et reproductibles sont donc nécessaires. Ceci ne sera possible qu'après la validation complète et la normalisation des méthodes d'analyse.

Jusqu'à présent, notre projet a atteint en grande partie ses objectifs, à savoir :

- établir un inventaire des outils de contrôle constitués de méthodes disponibles commercialement pour le post-screening des résidus d'antibiotiques ;
- appliquer des méthodes physicochimiques publiées dans la littérature scientifique pour les analyses de confirmation et la quantification des antibiotiques dans les échantillons de reins récoltés dans les abattoirs belges. Celles qui ont été évaluées comme satisfaisantes, ce qui est le cas pour les tétracyclines, les aminoglycosides, les sulfonamides, les macrolides et les antibiotiques à noyau β -lactames, ont été validées en grande partie et sont quasi prêtes pour une évaluation inter-laboratoire ;
- des approches analytiques nouvelles ont été suivies lorsque les méthodes existantes n'ont pas été considérées comme suffisamment performantes comme dans le cas des (fluoro)quinolones ;
- des progrès ont aussi été réalisés dans le développement des réseaux de laboratoires aux niveaux belge et européen dans le domaine du contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Notre projet était clairement en concordance avec les objectifs généraux du Plan d'appui scientifique pour une politique de développement durable dans le secteur des produits alimentaires pour l'harmonisation des méthodes d'analyse. Cela devrait permettre une meilleure protection de la santé du consommateur en ce qui concerne les résidus potentiellement dangereux de certains médicaments vétérinaires tels que les antibiotiques.

La validation des méthodes analytiques développées et testées dans notre projet devra encore être complétée en collaboration étroite avec d'autres laboratoires impliqués dans le contrôle officiel des résidus. Ceci contribuera à l'intégration des résultats et permettra l'identification des domaines dans le secteur de la chaîne de production alimentaire pour lesquels un effort de normalisation est encore nécessaire dans le cadre du développement durable. Le projet devra contribuer à la mise sur pied d'un inventaire des initiatives aux niveaux européen et mondial et au développement de banques de données facilement accessibles. Il examinera les actions menées en Belgique et au niveau international dans le domaine des normes des produits alimentaires (plus précisément, les méthodes d'analyse des résidus dans les produits d'origine animale) dans un contexte de développement durable et il permettra la définition de la contribution belge au niveau international, plus spécialement au niveau européen.