

Recherche des résidus à activité antibiotique dans les tissus animaux

I. — Mise au point d'une méthode de détection des antibiotiques dans le muscle

D. FRÈRES et P. VALDEBOUZE

avec la collaboration technique de F. BALLAND

Note présentée par M. J. JACQUET

L'utilisation des antibiotiques en élevage pose un important problème. En effet, les hygiénistes craignent que les aliments d'origine animale contiennent des résidus qui pourraient provoquer chez l'homme des phénomènes d'allergie et de toxicité, ainsi que l'apparition de souches bactériennes résistantes (GOUNELLE et SZAKVARY, 1965). Aussi est-il apparu nécessaire de pouvoir détecter les antibiotiques à faible dose dans les tissus et produits animaux.

A ce point de vue, le lait et les produits laitiers ont fait l'objet de nombreux travaux (AUCLAIR et VASSAL, 1964 ; KASTLI, 1968 ; JACQUET, 1952, 1953, 1966, 1967 ; JACQUET et RIQUIER, 1968). Les études sur les viandes sont moins fréquentes et portent sur un nombre limité d'antibiotiques : tétracyclines (TOMIYAMA et al., 1960 ; MEREDITH et al., 1965), pénicilline (PITRE, 1964), tétracyclines et pénicilline (PEDERSEN, 1964), streptomycine et tylosine (KLINE et al., 1965), tylosine (VALDEBOUZE et al., 1969). KRAMER et al. (1968) ont proposé des méthodes pour la recherche de pénicilline, bacitracine, tétracyclines, streptomycine, néomycine, polymyxine et novobiocine dans le lait, les produits laitiers et les tissus animaux. Mais, dans le cas où l'origine de la « contamination » est inconnue, elles doivent être appliquées simultanément, ce qui est matériellement impossible.

C'est la raison pour laquelle nous avons voulu mettre au point une méthode de détection dans les viandes de tous les antibiotiques dont l'utilisation est autorisée en France à titre nutritionnel (chlorotétracycline, oxytétracycline, érythromycine, bacitracine, hygromycine, framycétine, pénicilline, néomycine, spiramycine, oléandomycine tylosine) ou thérapeutique (chloramphénicol, strepto-

mycine, tétracycline). Etant donné les faibles doses à mettre en évidence et les propriétés physicochimiques différentes des substances considérées, la voie microbiologique semble être la plus efficace. Nous avons choisi une méthode qui consiste à laisser diffuser l'antibiotique déposé sur un disque de papier filtre dans une gélose préalablement ensemencée et à observer les inhibitions de croissance produites. La technique comporte trois étapes : extraction par trois solvants, concentration de l'extrait par dépôts répétés de ce dernier sur disque et mise en évidence de l'action antibactérienne sur quatre germes tests.

A. — JUSTIFICATION DE LA MÉTHODE

1. — *Extraction.*

Certaines techniques mettent en évidence l'antibiotique directement à partir du broyat musculaire, sans extraction préalable (PITRE et OBATON, 1964 ; TAKACS and KOVACS, 1969). Une mise en solution semble, cependant, préférable car les protéines gênent la diffusion de la substance active. Le choix des solvants a été guidé par deux critères :

a) Solubilité des substances considérées : les unes sont solubles en milieu organique, les autres dans l'eau. D'autre part, la solubilité varie selon que le produit est à l'état de sel ou de base.

b) Stabilité à des pH différents.

Les trois solvants choisis nous permettent de réunir ces diverses conditions. Le solvant I (méthanol pur) convient aux antibiotiques solubles en milieu organique et stables à pH acide. En effet, le pH d'un broyat de muscle avec le méthanol est de 5,5. Ce solvant a sur d'autres l'avantage d'extraire un plus grand nombre de substances, de précipiter les protéines et de s'évaporer rapidement, ce qui facilite la concentration de l'extrait. Les solvants II (méthanol pur-tampon pH 8 bicarbonaté 1 : 1 [v/v]) et III (eau distillée tampon pH 8 bicarbonaté 3 : 7 [v/v]) correspondent aux produits stables à un pH voisin de la neutralité.

Cependant, un produit n'est jamais totalement soluble dans un solvant et totalement insoluble dans un autre. Dans le tableau 1 sont indiqués les solvants les mieux adaptés aux divers antibiotiques. Ce critère permet de classer les antibiotiques en trois groupes (1 — 2 — 3) selon le solvant qui se montre le meilleur.

TABLEAU 1

Solvants d'extraction et germes tests permettant d'obtenir les sensibilités optimales

Groupe	Antibiotique	Solvant	Germe-test	Sensibilité en p. p. m.
1	Bacitracine	I	<i>M. flavus</i>	0,05
	Chloramphénicol	I	<i>B. cereus</i>	5,0
	Chlortétracycline	I	<i>B. cereus</i>	0,04
	Oxytétracycline	I	<i>B. cereus</i>	0,09
	Tétracycline	I	<i>B. cereus</i>	0,09
2	Erythromycine	II	<i>S. lutea</i>	0,01
	Oléandomycine	II	<i>B. cereus</i>	0,09
	Spiramycine	II	<i>S. lutea</i>	0,09
	Tylosine	II	<i>S. lutea</i>	0,20
3	Framycétine	III	<i>B. subtilis</i>	0,20
	Hygromycine	III	<i>B. subtilis</i>	30,0
	Néomycine	III	<i>B. subtilis</i>	0,20
	Pénicilline	III	<i>S. lutea</i>	0,10
	Streptomycine	III	<i>B. subtilis</i>	0,20

2. — Concentration de l'extrait.

Il est inutile d'insister sur la nécessité de concentrer au maximum l'extrait pour accroître la sensibilité de la détection.

Le procédé utilisé est celui proposé par PITRE et OBATON (1964), et déjà appliqué au dosage de la tylosine dans les tissus de porc (VALDEBOUZE et al. 1969). Il consiste à augmenter la quantité d'antibiotique fixée sur le disque par adjonctions répétées de liquide.

Les extraits à base de méthanol s'évaporent facilement et on peut en déposer sur chaque disque XVI gouttes. En revanche, les surcharges d'extraits aqueux, moins volatils, restent en pratique inférieures à X gouttes. Nous avons, d'ailleurs, constaté que l'augmentation du nombre de gouttes au-delà de ce point n'améliore pas la sensibilité, mais au contraire, la diminue.

TABLEAU 2

Seuil de détection des différents antibiotiques ajoutés en surcharge à du muscle de porc
 Résultats exprimés en parties par million (p. p. m.)

Antibiotique	Solvant I				Solvant II				Solvant III			
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. lutea</i>	<i>M. flavus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. lutea</i>	<i>M. flavus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. lutea</i>	<i>M. flavus</i>
Chlortétracycline.	0,04	0,09	0,20 F	0,40 F	0,09	0,7	—	—	1,0	—	—	—
Oxytétracycline .	0,09	0,40	0,8 F	0,8 F	0,40	1,0	—	—	—	—	—	—
Tétracycline	0,09	0,40	—	—	0,20	0,8	—	—	1,0	—	—	—
Bacitracine	—	—	0,20	0,05	—	—	0,6	0,20	—	—	1,0	0,8
Erythromycine ..	—	—	0,20	—	0,09	0,09	0,01	0,8 F	0,09	0,09	0,02	0,8
Oléandomycine ..	0,40	—	—	—	0,09	0,40	0,10 F	0,40 F	0,09	0,40	0,10	0,40 F
Spiramycine	—	—	—	—	0,7	0,7	0,09	0,40	—	—	0,09	0,7
Tylosine	—	—	0,8 F	0,20	0,8	0,40	0,20	0,20	1,0	1,0	0,40	0,40
Pénicilline	—	0,20	0,20	0,40	—	0,10	0,02	1,0	—	0,20	0,10	—
Néomycine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,20	—	—
Framycétine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,20	—	—
Streptomycine ..	—	—	—	—	—	0,40	—	—	—	0,20	—	—

— Pas d'action inhibitrice à des concentrations inférieures à 1 p. p. m.

F : zones à contours flous.

3. — Mise en évidence de l'antibiotique.

Parmi les micro-organismes possibles, ont été retenus ceux que distinguent leur polyvalence et leur sensibilité aux antibiotiques.

Quatre germes ont été jugés nécessaires pour les déterminer tous : *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. Nous avons indiqué dans le tableau 2 lequel d'entre eux est le plus sensible à un antibiotique déterminé. Les concentrations des ensemencements sont abaissées au maximum de façon à obtenir, pour une dose donnée d'antibiotique, la zone d'inhibition la plus grande possible, qui reste nette. Deux couches de gélose sont généralement utilisées ; la première sert de support à la seconde, qui est seule ensemencée. Dans les cultures de *B. cereus*, nous avons pu supprimer la couche de base, ce qui, à ensemencement égal, augmente la sensibilité, comme l'ont remarqué KLINE et al. (1965).

4. — Interprétation des résultats.

Lors de la mise au point de la méthode, une gamme de chaque substance étalon a été préparée dans les trois solvants et ajoutée en surcharge à du muscle de porc. Son activité antibactérienne testée sur les 4 micro-organismes choisis a permis de connaître la sensibilité des différents germes en fonction du solvant d'extraction. Le tableau 2 regroupe les limites de sensibilité pour les antibiotiques étudiés. Lors de l'analyse d'un échantillon, les critères de solubilité et de sensibilité aux différents germes sont les deux facteurs essentiels de différenciation des antibiotiques. Mais celle-ci n'est possible que dans le cas où un seul antibiotique est présent, et encore sous forme libre.

Par exemple, à la lecture des boîtes, on observe les résultats figurés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Solvant	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sarcina lutea</i>
I	—	—	—	—
II	+	—	—	+
III	+	—	—	+

+ présence de roues d'inhibition.

— absence de roues d'inhibition.

La substance provoque l'apparition de zones d'inhibition uniquement lorsqu'elle est extraite par les solvants II ou III. Tous les antibiotiques classés dans le troisième groupe inhibent les cultures de *B. subtilis*, ce qui n'est pas le cas ici. Il s'agit donc d'un produit du deuxième groupe. Or, dans cette série, il y a un seul cas où une action antibiotique s'exerce à faible concentration, à la fois sur *B. cereus* et *S. lutea* et sur eux seuls : l'oléandomycine.

B. — RÉSULTATS

La validité de cette méthode a été étudiée dans deux séries d'expériences portant sur :

- 1) la recherche de résidus à action antibiotique dans les tissus d'animaux ayant reçu une dose alimentaire connue d'un antibiotique déterminé ;
- 2) des essais d'identification d'antibiotiques ajoutés en surcharge à du muscle de porc.

1. — Recherche d'un antibiotique dans les tissus d'animaux ayant reçu une dose connue.

Les tissus de trois lots d'animaux ont été analysés :

a) dans un lot de vingt poulets nourris durant toute leur croissance avec un aliment à 12 g par tonne de chlortétracycline (dose normale), nous n'avons pu mettre en évidence de résidus, ni dans la chair (cuisse, blanc), ni dans le foie de ces animaux ;

b) neuf poulets ont reçu un aliment à 1.000 g par tonne d'oxytétracycline (20 à 50 fois la dose habituelle) pendant 12 jours, et ont été abattus après 48 heures de jeûne hydrique. L'analyse a porté sur les mêmes tissus que précédemment. Elle a montré (tableau 4) la présence de résidus allant de 0,09 à 0,17 p. p. m. dans le foie (4 animaux), de 0,14 à 0,19 p. p. m. dans le blanc (4 animaux) et de 0,09 à 0,40 p. p. m. dans les cuisses (6 animaux). Les tissus où se retrouvaient les traces d'antibiotiques n'appartenaient pas toujours aux mêmes individus : la présence simultanée de l'activité antibiotique dans les trois tissus d'un même animal n'a été observée que dans deux cas ;

c) sur 10 porcs ayant ingéré durant toute leur croissance (entre 20 et 100 kg) un aliment contenant 100 g par tonne (5 fois la dose normale) de tylosine, aucune activité antibiotique n'a pu être

décelée dans les divers tissus prélevés (muscle, graisse, foie, rein, sang) (VALDEBOUZE et al., 1969).

2. — *Essai d'identification d'antibiotiques ajoutés séparément en surcharge à du muscle de porc.*

Différents antibiotiques, inconnus de l'expérimentateur, ont été ajoutés en surcharge à du muscle de porc à une concentration double de la limite de sensibilité précisée au tableau 2 et à 1 p. p. m. Il a été possible d'identifier la bacitracine, le chloramphénicol, la tylosine, l'oléandomycine, la spiramycine, l'érythromycine, la pénicilline, la streptomycine et l'hygromycine. Par contre, les substances des deux groupes suivants n'ont pu être séparées entre elles :

- chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline
- néomycine, framycétine.

C. — DISCUSSION

1. — *Sensibilité.*

La manière de déterminer la sensibilité de la méthode, en surchargeant le tissu témoin avant broyage, est celle qui a déjà été utilisée dans le dosage de la tylosine dans les tissus (VALDEBOUZE et al., 1969). Ce procédé semble préférable, car il tient compte des possibilités de fixation des antibiotiques sur les protéines, qui dans notre méthode sont précipitées par le méthanol.

L'examen du tableau 1 montre que la majorité des substances peuvent être détectées à des concentrations situées entre 0,01 et 0,2 p. p. m., ce qui peut être considéré comme une sensibilité satisfaisante. Cependant, une réserve doit être faite pour le chloramphénicol et l'hygromycine qui ne sont mis en évidence qu'à des doses nettement supérieures, respectivement 5 p. p. m. et 30 p. p. m.. Dans le cas du chloramphénicol, cette limite de sensibilité est trop élevée, étant donné les accidents toxiques par atteinte de la moelle osseuse que peut provoquer ce médicament.

2. — *Spécificité.*

Comme le faisaient remarquer JACQUET et RIQUIER (1968) à propos du lait « une sensibilité aussi grande peut parfois devenir

un inconvénient dans la mesure où l'inhibition de la culture n'est pas spécifique ». On peut craindre, en effet, que des substances autres que des antibiotiques aient une action antibactérienne. C'est pourquoi nous avons étudié les interférences possibles provenant des anticoccidiens et des sulfamides. D'autre part, de même que dans le lait certains constituants naturels, les lacténines, peuvent interférer dans la recherche des antibiotiques, de même dans les muscles témoins de certaines espèces on observe la présence de substances à action inhibitrice.

1) *Interférence des anticoccidiens.*

Le D. O. T. et l'amprolium n'interfèrent pas ; mais, le nitrofurazone et le furazolidone ont une action antibactérienne sur les cultures de *B. cereus* à partir respectivement de 4 et 2 p. p. m., et peuvent être confondus avec les tétracyclines.

2) *Interférence des sulfamides.*

Deux sulfamides couramment utilisés en thérapeutique vétérinaire ont été testés : la sulfaguanidine et la sulfaméthoxyypyridazine. Ces deux substances n'interfèrent qu'à des concentrations élevées : respectivement 1700 p. p. m. et 250 p. p. m., et uniquement sur les cultures de *B. subtilis*.

3) *Interférence de substances naturelles.*

Quelques essais sur le muscle de veau et de bœuf témoin ont mis en évidence la présence dans ces tissus d'un composant inhibant les cultures de *M. flavus*, cet effet étant plus marqué chez le bœuf. Si l'on amène l'extrait méthanolique à pH 7, on constate la disparition de ces zones.

Ce type d'observation a déjà été fait par plusieurs chercheurs (SKARNES et WATSON, 1957 ; HANSEN et al., 1963 ; PEDERSEN, 1965 ; JACQUET, 1967). HANSEN et al., pensent que cette inhibition serait due à l'acide lactique. Mais des surcharges d'acide lactique sur un muscle de porc ne provoquent cette action qu'à partir d'une concentration de 1 p. 100 et sur les quatre germes tests.

Pour éviter cette interférence, la méthode a été modifiée comme suit, pour les examens de muscle de veau et de bœuf : la partie de l'extrait méthanolique mise en contact avec les cultures de *M. flavus* est amenée à pH 7 avec de la soude N. Ceci n'empêche pas de détecter la bacitracine.

TABLEAU 4
Résidus d'oxytétracycline dans les tissus de poulets
 Résultats exprimés en p. p. m. de tissu frais

Poulet	Foie	Blanc	Cuisse
1	0,09	0,14	—
2	—	—	0,40
3	—	—	0,12
4	0,09	0,14	0,13
5	0,19	—	—
6	—	—	0,09
7	—	—	—
8	0,17	0,15	0,11
9	—	0,19	0,13

— pas de résidus à des concentrations \leq 0,08.

D. — CONCLUSION

Nous disposons d'une méthode permettant de détecter dans les tissus et organes des animaux tous les antibiotiques sous forme libre et à des concentrations généralement faibles. Mais il faut être très prudent quant à l'origine de la substance inhibitrice. Lors de l'examen de viandes de provenance inconnue, aucune identification ne peut être faite avec certitude puisque l'on ignore toujours si un ou plusieurs produits ont été administrés à l'animal. Enfin, certains antibiotiques peuvent être fortement liés aux protéines et ainsi échapper à toute détection. Une telle méthode nous a permis, malgré ses imperfections, d'aborder le problème des résidus à activité antibiotique dans les viandes et d'en évaluer l'importance pratique.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en partie grâce au contrat N° 66/419 de l'Institut national de la Santé et de la Recherche médicale, auquel nous adressons nos remerciements.

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire d'Essai et d'Analyse des Aliments.
 1, rue Santos Dumont, Paris XV^e

BIBLIOGRAPHIE

- AUCLAIR (J.) et VASSAL (L.) (1964). — Fréquence des antibiotiques dans le lait en France. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **15**, 121-129.
- GOUNELLE (H.) et SZAKVARY (A.) (1965). — Une enquête auprès du corps médical sur les résidus d'antibiotiques dans les aliments. *Ann. Hyg. L. Fr.*, **1**, 55-63.
- HANSEN (J.), RODIN (F.) et MADELUNG (P.) (1963). — Orienterende forsøg vedrørende anvendeligheden af acetonitrilekstrakter til påvisning af antibiotikarester i kød og organer af slagtedyr. *Medlemsbl. Danske Dyrlægeforen*, **46**, 211-218.
- JACQUET (J.) (1952). — Le traitement des infections de la mamelle de la vache par les antibiotiques et ses conséquences. *Rev. Path. Gén.*, **52**, 557.
- JACQUET (J.) (1953). — Le traitement des infections de la mamelle de la vache par les antibiotiques et ses conséquences. *Rec. Méd. Vét.*, **129**, 803.
- JACQUET (J.) (1966). — Les antibiotiques et de lait. *Rev. Serv. Biol. et Vét. Armées*, **19**, 113.
- JACQUET (J.) (1967). — Les antibiotiques et les aliments d'origine animale destinés à l'homme. *Rev. Path. Gén.*, **67**, 181-200.
- JACQUET (J.) (1968). — Les antibiotiques et les aliments d'origine animale destinés à l'homme. Discussion. *Rev. Path. Gén.*, **68**, 227-231.
- JACQUET (J.) et RIQUIER (N.) (1968). — Recherche et titrage des antibiotiques dans le lait et les produits laitiers. *Bull. Ac. Vét.*, **6**, 227-247.
- KASTLI (P.) (1968). — Les antibiotiques dans le lait. Antibiotiques en agriculture. *Nutritio et Dieta*, **10**, 35-39.
- KLINE (R. M.), REDMAN (C. E.), TEPE (J. B.) and HAMILL (R. L.) (1965). — Antibiotic residues. Microbiological procedures. *Agricult. and Food Chem.*, **13**, 301-303.
- KRAMER (J.), CARTER (G. G.), ARRET (B.), WILNER (J.), WRIGHT (W. W.) KIRSHBAUM (A.) (1968). — Antibiotics residues in milk, dairy products and animal tissues methods, reports and protocols. Food and drug administration, Department of Health education and Welfare, Washington D. C.
- MEREDITH (W. E.), WEISSER (H. H.) and WINTER (A. R.) (1965). — Chlortetracycline and oxytetracycline residues in poultry tissues and eggs. *Appl. Microbiol.*, **13**, 86-88.
- PEDERSEN (H.) (1965). — The use of concentrated extracts from tissues in the determination of penicilline and tetracyclines in slaughtered poultry to which feeders containing antibiotics have been fed. *Kgl. Vet. Land. Bohoyskole, A. R. S. S. K.*, 33-60.
- PITRE (J.) (1963). — Méthode de recherche et de titrage par diffusion en gélose des antibiotiques dans les viandes et les abats des animaux de boucherie. Résultats et conséquences. *Bull. Ac. Vét.*, **36**, 175-182.
- PITRE (J.) et OBATON (J.) (1964). — Accroissement de la sensibilité de la méthode des disques par imprégnations répétées pour la détection et le titrage des antibiotiques présents dans le lait, les viandes et les aliments du bétail. *Bull. Ac. Vét.*, **37**, 63-69.

- SKARNES** (R. C.) and **WATSON** (D. W.) (1957). — Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol. Reviews*, **21**, 273-294.
- TAKACS** (J.) and **KOVACS** (S.) (1969). — Demonstration of antibiotic residues in the meat of slaughtered animals. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, **19**, 11-19.
- TOMIYAMA** (T.), **TSUDA** (A.) and **YONE** (Y.) (1960). — The determination of chlortetracycline in tissues. I. An improved pad-plate method. *Food Res.*, **25**, 97-106.
- VALDEBOUZE** (P.), **BOZZI** (F.) et **FRÈRES** (D.) (1969). — Dosage de la tylosine dans les tissus de porc (en cours de publication).
-