

Méthode de détection des antibiotiques dans les tissus animaux

par D. FRÈRES et P. VALDEBOUZE
Note présentée par M. JACQUET

1. — OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Dans une note précédente (1), nous avons exposé les principes et les caractéristiques d'une technique de recherche qui s'applique à la détection des antibiotiques utilisés en alimentation animale et en thérapeutique vétérinaire, dans le muscle de porc, de bœuf et de veau. Il apparaît nécessaire d'en donner les détails, de façon à ce qu'elle puisse être reproduite.

2. — PRINCIPE

Les antibiotiques sont extraits des tissus par trois solvants : méthanol pur (I) ; méthanol-tampon pH 8 bicarbonaté 1/1 v/v (II) ; eau distillée-tampon pH 8 bicarbonaté 3/7 v/v (III). L'activité antibiotique des extraits concentrés sur disques de papier filtre est mise en évidence par diffusion en milieu gélosé sur : *Bacillus cereus* A. T. C. C. 11778, *Bacillus subtilis* A. T. C. C. 6633, *Sarcina lutea* A. T. C. C. 9341, *Micrococcus flavus* A. T. C. C. 10240.

3. — MILIEUX DE CULTURE

3. 1.

Faire macérer une nuit 100 g de haricots secs dans un litre d'eau distillée. Chauffer jusqu'à ramollissement. Au filtrat, ajouter pour un litre :

— saccharose 5 g.
— gélose 20 g.

Stériliser 30 mn à 120 °C.

(1) D. FRÈRES et P. VALDEBOUZE. Recherche des résidus à activité antibiotique dans les tissus animaux. I. Mise au point d'une méthode de détection des antibiotiques dans le muscle. *Bull. Acad. Vét.*, 1969, 42.

3. 2.

Peptone	6 g.
Tryptone	4 g.
Extrait de levure	3 g.
Extrait de bœuf	1,5 g.
Dextrose	1 g.
Agar	15 g.
Eau distillée	q. s. p. 1.000 ml.

pH 6,6 après stérilisation.

3. 3.

Même composition que le milieu 3. 2, mais additionné de 10 g de gélose au lieu de 15 g.

3. 4.

Peptone	6 g.
Extrait de levure	3 g.
Extrait de bœuf	1,5 g.
Gélose	15 g.
Eau distillée	q. s. p. 1.000 ml.

pH 6,5-6,6 après stérilisation.

3. 5.

Peptone	5 g.
Extrait de bœuf	3 g.
Gélose	15 g.
Eau distillée	q. s. p. 1.000 ml.

pH 8,3 avant stérilisation.

3. 6.

Même composition que le milieu 3. 5, mais additionné de 10 g de gélose au lieu de 15 g.

3. 7.

Peptone	5 g.
Extrait de bœuf	1,5 g.
Extrait de levure	1,5 g.
Chlorure de sodium	3,5 g.
Gélose	15 g.
Eau distillée	q. s. p. 1.000 ml.

pH 8,3 avant stérilisation.

3. 8.

Même composition que le milieu 3. 7, mais additionné de 10 g de gélose au lieu de 15 g.

3. 9.

Peptone.....	6 g.
Extrait de bœuf.....	1,5 g.
Extrait de levure.....	3 g.
Dextrose.....	1 g.
Gélose.....	15 g.
Eau distillée.....	q. s. p. 1.000 ml.

pH 7,2 avant stérilisation.

4. — SOLVANTS

4. 1. *Tampon pH 8 bicarbonaté.*

Phosphate dipotassique.....	16,73 g.
Phosphate monopotassique.....	0,523 g.
Carbonate monosodique.....	20 g.
Eau distillée.....	q. s. p. 1.000 ml.

4. 2. *Solvant I.*

Méthanol pur.

4. 3. *Solvant II.*

Méthanol pur.....	500 ml.
Tampon pH 8 bicarbonaté (4. 1) ...	500 ml.

4. 4. *Solvant III.*

Eau distillée.....	300 ml.
Tampon pH 8 bicarbonaté (4. 1)....	700 ml.

4. 5. *Sérum physiologique.*

Chlorure de sodium pur.....	9 g.
Eau distillée q. s. p.....	1.000 ml.

4. 6. *Mélange éthanol-sérum physiologique.*

Ethanol pur.....	200 ml.
Sérum physiologique (4. 5) stérile...	800 ml.

5. — APPAREILLAGE

Hachoir à viande.

Réfrigérateur à + 4 °C.

Congélateur à — 20 °C.

Etuve bactériologique à 30 °C.

Etuve bactériologique à 37 °C.
Bain-marie thermostaté.
Autoclave.
Spectrophotomètre Coleman junior.
Centrifugeuse réfrigérée.
Ventilateur.
Compte-gouttes normalisés.
Homogénéiseur.
Carrés de toile métallique inoxydable.
Disques en papier filtre Ø 9 mm.
Boîte de Pétri Ø 100 mm.
Lecteur de boîtes.

6. — ORGANISMES-TESTS

6. 1. *Conservation des souches mères.*

6. 1. 1. *Bacillus cereus* A. T. C. C. 11778 : Inoculer *B. cereus* sur gélose inclinée en tube de milieu 3. 2. Incuber 24 heures à 30 °C. Conserver au réfrigérateur entre 4 et 10 °C. Entretenir cette souche par repiquage bimensuel sur gélose inclinée.

6. 1. 2. *Bacillus subtilis* A. T. C. C. 6633 : Inoculer *B. subtilis* sur gélose inclinée en tube de milieu 3. 2. Incuber 24 heures à 37 °C. Conserver au réfrigérateur entre 4 et 10 °C. Entretenir cette souche par repiquage bimensuel sur gélose inclinée.

6. 1. 3. *Sarcina lutea* A. T. C. C. 9341 : Inoculer *S. lutea* sur gélose inclinée en tube de milieu 3. 2. Incuber 48 heures à 30 °C. Conserver au réfrigérateur entre 4 et 10 °C. Entretenir cette souche par repiquage hebdomadaire sur gélose inclinée.

6. 1. 4. *Micrococcus flavus* A. T. C. C. 10240 : Inoculer *M. flavus* sur gélose inclinée en tube de milieu 3. 2. Incuber 24 heures à 37 °C. Conserver au réfrigérateur entre 4 et 10 °C. Entretenir cette souche par repiquage hebdomadaire sur gélose inclinée.

6. 2. *Préparation des suspensions de germes.*

6. 2. 1. *Bacillus cereus* A. T. C. C. 11778 : Récolter les germes d'une gélose inclinée de 24 heures (6. 1. 1.) par 2,5 ml de sérum physiologique stérile. Transférer cette suspension dans une boîte de Roux contenant 250 ml de milieu 3. 1. Incuber 10 jours environ à 30 °C. Récolter les spores de la boîte de Roux par 20 ml de mélange 4. 6. Diluer la suspension ainsi obtenue dans du sérum physiolo-

gique de façon à obtenir une densité optique de 0,5 à 630 nm. Déterminer par essais préliminaires la quantité d'inoculum nécessaire pour obtenir, pour les concentrations d'antibiotiques recherchées, des zones aussi grandes et aussi nettes que possible. L'inoculation du milieu de culture se fait à 60 °C.

Maintenue à + 4 °C., cette suspension peut être conservée plusieurs mois si elle est protégée des contaminations et des évaporations.

6. 2. 2. *Bacillus subtilis* A. T. C. C. 6633 : Récolter les germes d'une gélose inclinée de 24 heures (6. 1. 2.) par 50 ml de sérum physiologique stérile. Transférer 10 ml de cette suspension dans une boîte de Roux contenant 250 ml de milieu 3. 9. Incuber 10 jours environ à 37 °C. Récolter les spores de la boîte de Roux par 10 ml de sérum physiologique stérile. Porter la suspension 3 jours de suite 30 minutes à 60 °C. Diluer la suspension ainsi obtenue dans du sérum physiologique de façon à obtenir une densité optique de 0.09 à 650 nm. Déterminer par essais préliminaires la quantité d'inoculum nécessaire pour obtenir, pour les concentrations d'antibiotiques recherchées, des zones aussi grandes et aussi nettes que possible. L'inoculation du milieu de culture se fait à 60 °C.

Maintenue à + 4 °C., cette suspension peut être conservée plusieurs mois si elle est protégée des contaminations et des évaporations.

6. 2. 3. *Sarcina lutea* A. T. C. C. 9341 : Récolter les germes d'une gélose inclinée (6. 1. 3.) de 48 heures dans 10 ml de sérum physiologique stérile. La densité optique de la suspension ainsi obtenue doit être de 1,0 à 630 nm. Déterminer par essais préliminaires la quantité d'inoculum nécessaire pour obtenir, pour les concentrations d'antibiotiques recherchées, des zones aussi grandes et aussi nettes que possible. L'inoculation du milieu de culture se fait à 48 °C. Conservée à + 4 °C., cette suspension peut être utilisée pendant 15 jours.

6. 2. 4. *Micrococcus flavus* A. T. C. C. 10240 : Récolter les germes d'une gélose inclinée (6. 1. 4.) de 24 heures par 2,5 ml de sérum physiologique stérile. Transférer cette suspension dans une boîte de Roux contenant 250 ml de milieu 3. 2. Incuber 18 heures à 37 °C. Récolter les germes de la boîte de Roux par 25 ml de sérum physiologique stérile. Diluer dans du sérum physiologique stérile, de façon à obtenir une suspension qui, diluée au 1/50, ait une densité optique de 0,12 à 650 nm.

Déterminer par essais préliminaires, la quantité d'inoculum nécessaire pour obtenir, pour les concentrations d'antibiotiques

recherchées, des zones aussi grandes et aussi nettes que possible. L'inoculation du milieu de culture se fait à 48 °C.

Conservée à + 4 °C., cette suspension peut être utilisée pendant 15 jours.

7. — PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les muscles sont débarrassés des nerfs et de la graisse, et broyés au hachoir à viande. Sur chaque échantillon sont effectuées trois prises d'essai I, II, III, de 50 g chacune, qui sont conservées dans l'attente de l'analyse au maximum 3 jours à + 4 °C. Les tissus témoins sont préparés de la même façon et sont conservés au congélateur à - 20 °C.

8. — PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE SURCHARGE

Pour contrôler le bon déroulement du dosage, un antibiotique de référence est dissous dans chacun des 3 solvants (voir tableau 1 de la note précédente). La concentration de la solution est déterminée de façon que la teneur en substance active de l'extrait soit double de la limite de sensibilité en estimant à 25 p. 100 le taux de matière sèche du tissu.

9. — PRÉPARATION DES BOÎTES DE PÉTRI

Ces boîtes sont préparées le jour de leur utilisation et conservées au réfrigérateur à + 4 °C. jusqu'à leur emploi. Le tableau ci-dessous indique les milieux à utiliser et les concentrations choisies pour les ensemencements.

Germes	1 ^{re} couche	2 ^e couche	Ensemencement
<i>B. cereus</i>	3-4 : 7 ml		1 p. 100
<i>B. subtilis</i>	3-5 : 10 ml	3-6 : 4 ml	0,8 p. 100
<i>S. lutea</i>	3-7 : 10 ml	3-8 : 4 ml	0,3 p. 100
<i>M. flavus</i>	3-4 : 10 ml	3-3 : 4 ml	0,2 p. 100

10. — MODE OPÉRATOIRE

Un échantillon de tissu témoin (animal n'ayant reçu ni antibiotique ni anticoccidien au cours de sa croissance) est traité de la même façon que les prélèvements à analyser.

a) *Extraction* :

Chaque prise d'essai est broyée avec 50 ml du solvant correspondant ou avec 50 ml de la solution de surcharge.

Centrifuger 20 mn à 9.000 tours/mn à + 4 °C.

b) *Concentration de l'extrait* :

Le surnageant est déposé sur des disques par additions répétées de III gouttes chaque fois jusqu'à un total de :

extrait I : XVI gouttes

extrait II : XVI gouttes

extrait III : IX gouttes

les disques ont été préalablement préparés sur des toiles en acier inoxydable placées sur des boîtes de Pétri, afin d'améliorer le séchage qui est d'autre part accéléré par ventilation et chauffage modéré de la paillasse.

c) *Mise en évidence de l'action antibactérienne* :

Après séchage, les disques sont déposés sur des boîtes de Pétri, en plaçant dans une même boîte un disque imprégné d'extrait témoin, deux disques imprégnés d'extrait étalon et 4 disques imprégnés de l'extrait de l'échantillon à analyser. Les séries de disques correspondant à chaque extrait (I, II, III) sont placées sur les différentes cultures à raison de deux boîtes par germe. Le temps et la température d'incubation varient selon les germes.

B. cereus : 16 h à 30 °C.

B. subtilis : 16 h à 37 °C.

M. flavus : 16 h à 37 °C.

S. lutea : 20 h à 30 °C.

Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées au lecteur de boîtes. Si pour un même germe et un même extrait, tous les disques échantillons sont entourés de zones d'inhibition et non les disques témoins, l'échantillon est classé comme positif.

11. — OBSERVATION

L'extrait méthanolique du muscle de bœuf ou de veau doit être amené à neutralité par addition de soude N.

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