

**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.**

J. PITRE et J. OBATON

avec la collaboration technique de M^{me} J. NOURIS.

(Note présentée par M. Jacquet).

Depuis notre récente communication (1) nous avons eu connaissance du travail sur le même sujet de E. H. KAMPELMACHER et ses collaborateurs (2) qui utilisent la détection biologique dans l'urine des antibiotiques des animaux abattus. Nous croyons nécessaire de signaler cette étude qui comporte une bibliographie intéressante. Pour notre part, nous continuons à préconiser la recherche dans les organes et le muscle pour des raisons de facilité d'identification et de prélèvement des échantillons testés.

Afin de sensibiliser la méthode en abaissant son seuil de détection, nous avons proposé de concentrer sous vide l'extrait de muscle ou d'organe. Nous avons depuis lors envisagé un procédé plus simple et défini les conditions à respecter pour réaliser un titrage plus précis.

●n peut augmenter la quantité de liquide fixé sur le disque de papier simplement en l'imbibant plusieurs fois de liquide analysé au moyen d'une pipette fine au lieu de le tremper dans le liquide. Entre chaque adjonction, on sèche le disque.

Réalisation.

1) Le disque peut être tenu avec une pince fine ; mais le temps nécessaire pour réaliser deux imprégnations, séparées par un séchage, est assez long (5 minutes). Pour plusieurs tests ou pour 5 ou 10 imprégnations l'opération serait ainsi fastidieuse.

Il est plus aisé soit de poser le ou les disques sur une toile métallique, soit de piquer chaque disque à l'extrémité d'une épingle

inoxydable fixée sur une planchette selon le schéma. Par ce dernier moyen, le plus recommandable, tout le liquide reste dans le disque et on peut connaître exactement la quantité utilisée.

2) Séchage : on peut le réaliser au moyen d'un courant d'air chaud fourni par un sèche-cheveux du commerce (ne pas l'approcher trop près pour éviter toute surchauffe), ou bien porter le support de disques (tamis ou épingles) dans une étuve à 42° ou encore le placer au-dessus d'une platine chauffante, selon le matériel dont on dispose.

On peut ainsi faire de nombreux tests en série sans perte de temps.

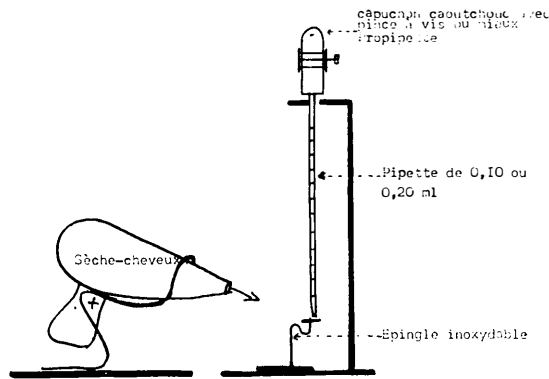


Schéma en coupe du support pour plusieurs tests simultanés

Après la dernière imprégnation, on ne sèche pas pour se retrouver dans les conditions du test normal. La suite est exécutée sans changement au moyen de la gélose pour antibiogramme Difco.

3) Mesure du volume mis en œuvre.

Pour les tests quantitatifs (titrages) il convient de connaître avec précision le volume de liquide testé. On fait les imprégnations avec une pipette de 0,10 ml graduée en 1/100. Pour régler correctement l'écoulement et ne pas perdre de liquide entre deux imprégnations, il faut équiper la pipette avec une micropompe à vis micrométrique (type Préciss).

Vérifications expérimentales.

Nous nous sommes aperçus qu'avec une solution de Pénicilline dans du jus de viande de bovin, l'accroissement des diamètres d'inhibition obtenus en augmentant le nombre d'imprégnations ne

croît pas comme la théorie le voudrait ; à partir de 4 imprégnations on obtient un diamètre limite qui reste le même avec 6 imprégnations et qui, à partir de 8 imprégnations va en diminuant. Au delà de 4 imprégnations on n'augmente donc pas la sensibilité et la méthode ne permettrait pas de servir au titrage. On peut attribuer ce phénomène à l'apport croissant de matière sèche du jus et surtout des protéines qui gênent la diffusion de la Pénicilline.

Pour éviter ce handicap, il suffit de chauffer l'extrait musculaire pendant 10 minutes à 80 °C au bain-marie. Les matières protéiques flocculent ; après refroidissement on les sépare par filtration sur papier ou centrifugation.

L'exemple suivant montre que jusqu'à 0,20 ml soit environ 8 imprégnations de liquide chauffé, on accroît la sensibilité et que le taux de Pénicilline n'est pas diminué par le chauffage.

Essai avec un jus de viande contenant 0,05 UO de Pénicilline par ml.

Nombre d'imprégnations	Volume absorbé en ml	Diamètre d'inhibition obtenu en mm	Concentration correspondante de l'étalonnage en UO/ml	Concentration rapportée à l'unité de volume 0,020 ml
<i>Jus tel que</i>				
1	0,020	9,5	0,06	0,060
2	0,040	12,5	0,17	0,085
4	0,080	14	0,30	0,075
6	0,105	12,5	0,17	0,032
8	0,125	12,5	0,17	0,027
10	0,142	12,5	0,17	0,024
<i>Jus déféqué par chauffage</i>				
1	0,020	10	0,08	0,080
2	0,040	12,5	0,17	0,085
4	0,080	13,5	0,25	0,062
6	0,120	14,5	0,35	0,058
8	0,160	15	0,40	0,050
10	0,190	15	0,40	0,042

Après chauffage, on accroît donc la sensibilité du test en imprégnant jusqu'à 8 fois le disque, c'est-à-dire en multipliant par 8 le volume de liquide mis en œuvre. On ne gagne pas à aller au delà.

On a vérifié que cette méthode permet réellement d'accroître la sensibilité. Exemple :

	Nombre d'imprégnations	Diamètre d'inhibition en mm
Jus contenant 0,01 UO de Pénicilline par ml (chauffé à 80°)	1 2 4 6 8	0 traces 8 9 10
Jus contenant 0,005 UO par ml (chauffé à 80°)	1 4 6 8 10	0 0 8 9 9
— 0,004 — —	8	8
— 0,003 — —	8	0

Ayant rencontré une viande de bovin abattu d'urgence qui contenait un antibiotique autre que la Pénicilline (non inhibé par la Pénicillinase), nous avons constaté dans ce cas :

— que le chauffage du jus diminue sérieusement le diamètre d'inhibition obtenu ;

— que l'inhibition obtenue passe par un maximum avec 4 imprégnations puis décroît ensuite.

A la lumière de ces observations et en attendant les essais qui seront faits avec les divers antibiotiques courants, on peut observer qu'en vue d'accroître la sensibilité de détection :

1) pour la Pénicilline, on a intérêt à déféquer le jus de viande par chauffage et faire absorber au disque 0,16 ml en 6 ou 8 imprégnations. On peut atteindre ainsi la sensibilité limite de la méthode.

2) pour les autres antibiotiques détruits par le chauffage, il convient de ne pas chauffer et de se limiter à 4 ou 6 imprégnations (soit 0,08 à 0,12 ml).

En routine, si l'on veut opérer avec le maximum de sensibilité et de sécurité, il faudrait donc faire trois tests avec : un disque imprégné une fois de jus brut, un disque imprégné 4 fois de jus brut et un disque imprégné 8 fois de jus chauffé.

Nous avons recherché les diamètres d'inhibition obtenus avec la même Pénicilline G lyophilisée pour diverses concentrations réalisées en eau distillée, dans du lait écrémé et dans du jus de viande de

bœuf. Les résultats ci-après montrent que les différences sont faibles et dans les limites de précision de la méthode que l'on peut espérer, compte-tenu notamment de la précision de la mesure des diamètres, même lorsque celle-ci est faite avec un pied à coulisse.

Concentrations réalisées en UO/ml	Diamètres d'inhibition en mm selon le liquide de dilution		
	eau distillée	lait	jus de viande
5	20	20,5	20,5
2	17,5	18,5	18,5
1	17	17	16,5
0,8	16,5	16,5	16
0,6	16	16	15,5
0,4	15	15	15
0,2	13,5	14	13
0,1	12	11,5	11,5
0,08	10	11	10
0,06	9	10,5	9,5
0,04	8	8	8
0,02	0	0	0
0,01	0	0	0

Limite de sensibilité.

Les disques étant suspendus piqués à une aiguille, on absorbe facilement sans perte 0,03 ml ; on peut répéter l'opération 8 fois et plus sans difficulté d'absorption. En 8 imprégnations, on peut donc absorber 0,20 à 0,30 ml de suc musculaire.

Grâce à cette méthode, on peut connaître exactement le volume de liquide mis en œuvre et accroître la sensibilité huit à dix fois par rapport aux concentrations minima détectables que nous avons indiquées. Pour la Pénicilline, on peut ainsi doser jusqu'à 0,004 UO par ml.

Choix des méthodes à utiliser.

1) *Test qualitatif de routine.*

a) En une seule imprégnation (macrométhode).

On utilise une seule imprégnation par trempage.

Ce procédé simple et rapide convient pour la recherche :

Dans le lait : d'antibiotique en concentration pouvant provoquer des défauts de fabrication des fromages à pâte molle. Sensibilité nécessaire de 0,05 UO/ml.

Dans la viande : d'antibiotique résultant d'un traitement ante-mortem ou d'une utilisation comme conservateur. Sensibilité nécessaire 0,05 UO /ml.

b) En plusieurs imprégnations (microméthode).

Avec disque imprégné 2, 5 ou 8 fois avec une pipette (pour sensibiliser le test qualitatif), imprégnations successives suivies de séchages du disque sur tamis ou suspendu à la pointe d'une aiguille. Sensibilité 0,005 UO/ml nécessaire pour le lait lorsque l'on veut détecter les concentrations néfastes en fabrication des laits fermentés type Yaourth dont les ferments (lactobacilles surtout) sont sensibles à ces faibles concentrations ou des concentrations même faibles prohibées pour la fabrication du lait en poudre destiné à l'alimentation infantile. Cette méthode atteint la même sensibilité, avec plus de facilité que celle des pastilles de lait desséché de KOSKOWSKI et WOLIN (3).

Pour les viandes, il ne paraît pas nécessaire de descendre à une aussi grande sensibilité, surtout si l'on teste les organes d'élimination en même temps que le muscle. On peut toutefois recommander 2 à 5 imprégnations pour atteindre la sensibilité de 0,025 à 0,01 UO/ml.

2) *Test quantitatif.*

On utilise obligatoirement le disque suspendu piqué à une épingle et une pipette de 0,10 ou 0,20 ml graduée en 1/100 dont une graduation représente 0,001 ml, pour obtenir une bonne précision.

La gélose doit être parfaitement standardisée, et coulée en volume constant dans des boîtes à fond bien plat. Après le dernier séchage, il faut que la dernière imprégnation soit faite toujours avec le même volume de liquide (0,015 ml par exemple) pour que l'état final d'hydratation du disque soit constant d'un test à l'autre.

Grâce à ces précautions, on obtient une bonne reproductibilité.

Par ce procédé, on peut d'ailleurs déterminer la teneur absolue du muscle en antibiotique en broyant la viande finement, puis en extrayant un poids connu avec un volume mesuré d'eau distillée. Nous n'avons pas retenu ce procédé antérieurement parce qu'il apporte une dilution qui diminue d'autant la concentration minima décelable. Si l'on fait des imprégnations successives, on peut compenser la dilution par les séchages qui réalisent une véritable concentration. Si l'on a dilué le broyat 5 fois, il suffit théoriquement de faire 5 imprégnations pour annuler l'effet de la dilution. Pas tout à fait cependant, car on ne dessèche pas totalement à chaque séchage ; il vaut donc mieux imprégner un volume connu en 10 fois. Un calcul simple permet ensuite, connaissant la concentration par ml d'extrait, de passer à la concentration par gramme de viande. Cette technique paraît superflue en routine de l'inspection

des viandes ; elle pourrait présenter un intérêt dans des travaux de recherche ou dans les cas d'expertise.

Conclusion.

Le test perfectionné proposé utilise un procédé simple de concentration et permet de déceler et de doser facilement de faibles teneurs d'antibiotique dans le lait, la viande et d'autres produits. La grande sensibilité de ce procédé le rend tout à fait utilisable en vue de rechercher dans les viandes d'animaux nourris avec des aliments antibio-supplémentés les faibles traces d'antibiotiques d'origine alimentaire et dans le lait les faibles teneurs nuisibles à la fabrication des yaourts, que l'on ne peut détecter par la méthode directe.

Il nous donne aussi satisfaction dans l'analyse des aliments du bétail antibio-supplémentés.

Cette technique pourra sans doute être améliorée en sensibilité en utilisant une espèce microbienne plus sensible à certains antibiotiques, dont la Pénicilline, *Bacillus stearothermophilus* que GALESLOOT et HASSING (4) ont proposé. J. JACQUET et F. CHARTON (5) l'utilisent pour le lait par la méthode biophotométrique. Des essais seront faits en ce sens selon les indications de M. le Professeur J. JACQUET.

BIBLIOGRAPHIE COMPLÉMENTAIRE

1. (J.) PITRE. — *Bull. Ac. Vét.* 1963, avril, 175-182.
2. (E. H) KANPELMACHER, (P. A) GUINÉE et (L. M.) VAN NOORLE. — *Janssen-Tijdschr voor diezgeneeskunde*, 1962, janv. deel 87, afl 1, 16-29.
3. (F. V.) KOSIKOWSKI et (A. S. G.) WOLIN. — *J. Dairy Sc.* 1955, 38, 597.
4. GALESLOOT et (F.) HASSING. — *Neth Milk Dairy J*, 1962, 16, 189.
5. (Jl) JACQUET et (F.) CHARTON. — *Le Lait*, 1944 (à paraître).

*Laboratoire Départemental et Régional
de Biologie et d'Hygiène
36, rue Fred Scamaroni, Caen.*