

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

J. PITRE

avec la collaboration technique de P. MARTINET

En 1956, M. CAMY (1) attirait l'attention des vétérinaires-inspecteurs des viandes et des laboratoires d'analyse sur les discordances que l'on observe parfois lors des contrôles bactériologiques, à savoir la présence de germes visibles sur le décalque coloré d'une application faite sur le bloc musculaire incisé selon la méthode officielle (C. M. du 26 mai 1953) et d'autre part la négativité des cultures faites à partir du même bloc. — Nous avons rencontré ce phénomène dans 7 cas sur 249 soit 2,8%. — Notre confrère attribuait ce phénomène à la présence d'antibiotique administré à l'animal avant l'abattage d'urgence pour cause de maladie; il expliquait ainsi les modifications morphologiques, les formes monstrueuses des germes observées dans ce cas.

Le problème de la diffusion des antibiotiques dans le muscle a surtout commencé à intéresser les chercheurs en fonction de leur utilisation comme facteurs de la nutrition animale et comme conservateurs. Les travaux sur la 1^{re} utilisation, intéressants sur le plan de l'hygiène alimentaire humaine, ne nous concernent pas ici car les concentrations utilisées dans les aliments antibiosupplémentés sont si faibles que les teneurs résiduelles dans les muscles ne peuvent gêner nos cultures. J. JACQUET (2) rapportant récemment les travaux de FÉVRIER et Coll. sur les porcs et les poulets, indique que la teneur dans les cas les plus défavorables ne dépasse pas 1,25 mcg par g de tissu; presque toujours elle est plus faible ou nulle.

L'emploi des antibiotiques pour la conservation des viandes et des poissons a suscité des recherches intéressantes, mais il reste jusqu'alors interdit en France et ne saurait donc actuellement nous poser de problème. F. LEBERT a fait connaître (3) les résultats de ses essais et la bibliographie sur la question. En 1960, MEYN, KALICH et MERCKENSCHLAGER (4) ont expérimenté sur des veaux et montré que l'administration d'auréomycine sous forme d'aliment antibio-

supplémenté n'influe pas sur l'inspection bactériologique des veaux. Il en est tout autrement de l'emploi de doses thérapeutiques (20 à 30 mg/kg, 4 j et 36 h avant l'abattage) puisqu'il retrouve dans le muscle 0,09 à 0,6 mcg/g, dans la rate 0,15 à 0,84, dans le rein 0,84 à 2,85, dans le foie 0,40 à 1,35.

TECHNIQUE.

1° *Extraction.* Pour rechercher en pratique la présence d'antibiotiques dans les viandes provenant d'animaux abattus pour maladie ou accident, nous utilisons l'extrait musculaire obtenu par pression selon la technique suivante. On hache grossièrement un morceau de muscle ou d'organe ; on en place 10 à 15 g (gros comme une noix) dans un nouet de gaze stérile, puis l'ensemble dans une petite presse à main flambée à l'alcool ou bouillie (presse vendue couramment sous le nom de presse-ail, grand modèle). Par pression progressive on obtient facilement 1 ml d'extrait de muscle ou d'organe.

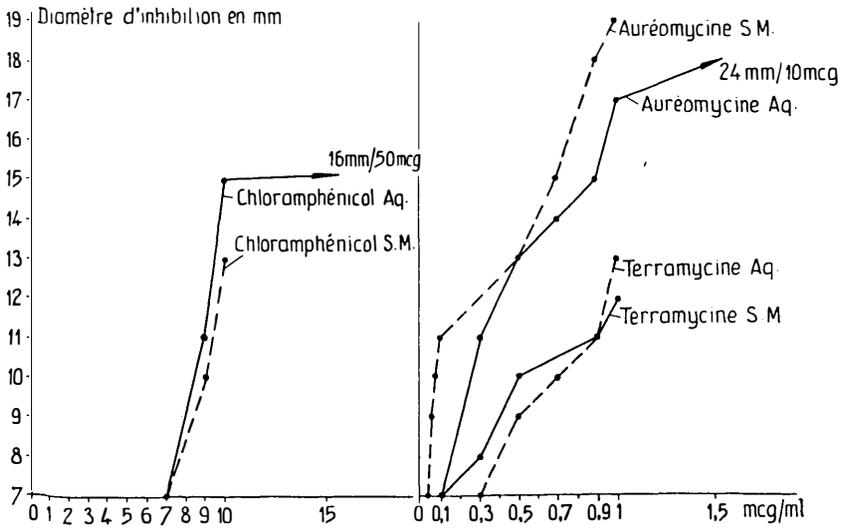
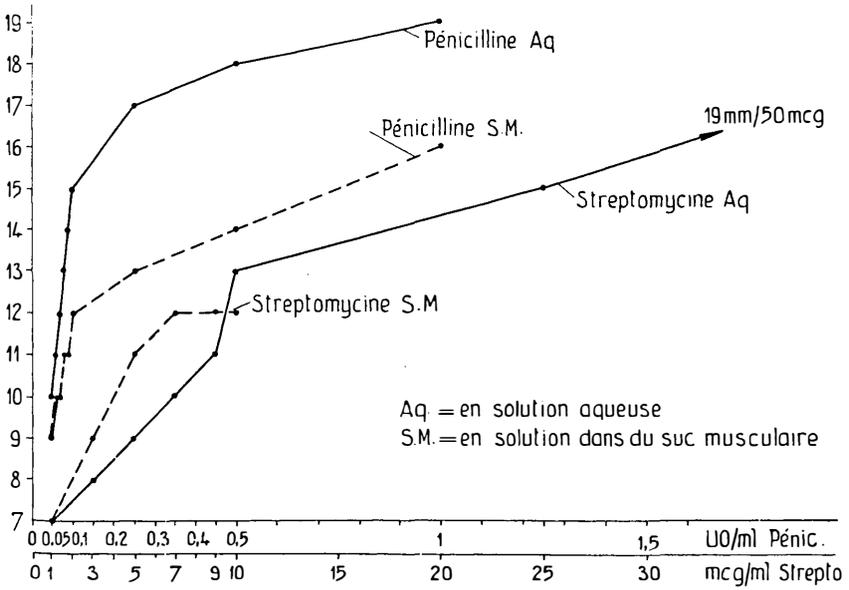
Avantage : pas de dilution. Inconvénient : le test porte sur l'extrait et non sur la totalité du muscle ; mais ceci est sans importance si l'on exprime conventionnellement les résultats par ml d'extrait et non par g de muscle.

2° *Test.* Nous avons adopté en raison de sa facilité d'exécution, de sa rapidité de réponse et de sa sensibilité suffisante, la méthode utilisant les disques en papier filtre épais vendus par DIFCO pour la recherche de la Pénicilline dans le lait (Bacto-concentration disks, spore suspension and media for detecting penicillin in milk).

Ce procédé qui donne toute satisfaction pour le lait est aussi parfait pour notre propos. Il a été préconisé pour le lait par divers auteurs (6-7-8) et retenu par les « Standard Methods » (9) ; il utilise la diffusion en gélose et la sensibilité de *Bacillus subtilis*.

Le disque de papier est plongé pour l'imprégnation dans le suc musculaire. Pour les titrages, il est important de le saisir avec une pince brucelle à mors pointus et fins, sinon, bien qu'on essore le liquide sur les bords du récipient on retient, entre les mors d'une pince à extrémités arrondies, une quantité excessive de liquide et les titrages sont faussés, c'est-à-dire non proportionnels. On vérifie que la technique est satisfaisante en faisant plusieurs tests avec la même solution d'antibiotique ; on doit obtenir les mêmes diamètres d'inhibition.

Au préalable, on a coulé dans une boîte de PÉTRI 10 ml de milieu (*B. antibiotic* medium n° 1) fondu, ramené à 45° C et ensemencé



dans la masse avec 0,1 ml de suspension de spores de *Bacillus subtilis* (vendue en ampoules par DIFCO).

Le disque imprégné de suc musculaire est placé à la surface du milieuensemencé refroidi. Sur une plaque on peut ainsi faire 6 tests.

Il existe deux sortes de disques ayant 7 et 13 mm de diamètre. Les premiers conviennent parfaitement ; on peut en placer plus que des seconds dans une boîte et la sensibilité est aussi bonne.

Après 3 ou 4 heures d'étuve à 37° C on recherche l'inhibition autour des disques ; la culture est déjà très visible par transparence, l'auréole d'inhibition se distingue bien dans la masse opaque. Si des germes résistant à l'antibiotique présent existent dans le suc musculaire ils n'ont pas le temps de proliférer suffisamment en un si court délai pour pouvoir masquer l'inhibition de culture du *Bacillus* abondamment ensemencé.

Il y a donc intérêt à lire le test après quelques heures plutôt que de le laisser une nuit à l'étuve.

En cas de positivité, on peut de la même façon faire *un titrage* en comparant le diamètre d'inhibition à ceux obtenus avec une gamme de disques imprégnés de pénicilline à concentration croissante (0,05-0,10-0,25-0,5-1-2,5-5-UO/ml) vendus par DIFCO. Enfin on peut caractériser si l'antibiotique est la *Pénicilline* au moyen d'un disque imprégné de Pénicillinase.

L'ensemble est fourni en coffret.

La sensibilité de la méthode est de 0,05 UO/ml, soit 0,3 mcg environ de Pénicilline par ml.

S'il ne s'agit pas de Pénicilline, c'est-à-dire si l'inhibition n'est pas supprimée par la Pénase, le titrage donne un résultat que l'on peut exprimer en équivalent-pénicilline. Si l'antibiotique administré est connu (indiqué par le certificat du vétérinaire-traitant) la concentration peut être exprimée en l'antibiotique réellement présent par titrage comparatif.

En ce qui concerne la sensibilité de la méthode à d'autres antibiotiques, et aux sulfamides, nous avons déterminé les concentrations minima détectables en testant selon la même technique des concentrations de chaque produit en dilution aqueuse. Les résultats sont figurés dans le graphique suivant. Pour la Sulfamérazine, la concentration minima détectable est de 50 à 75 mg/ml.

Pour savoir si ces résultats sont encore valables lorsque l'antibiotique n'est plus en solution aqueuse mais dans le suc musculaire, on a fait le même titrage avec des dilutions d'antibiotiques en suc musculaire extrait par pression de viande rassise de bovin.

Concentrations minima détectables dans le suc musculaire donnant une inhibition de 8 ou 9 mm de diamètre :

Pénicilline	0,05 UG/ml
Streptomycine	2 mcg/ml
Chloramphénicol	8 mcg/ml
Auréomycine	0,05 mcg/ml
Terramycine	0,3 mcg/ml

La sensibilité en suc musculaire par rapport à la dilution aqueuse est :

- plus grande pour Auréomycine, Terramycine, Streptomycine ;
- légèrement plus faible pour Pénicilline, Chloramphénicol.

On peut d'ailleurs augmenter la sensibilité en diminuant le volume de milieu, de façon à étendre la zone de diffusion la surface restant constante, ceci selon le principe de la méthode de titrage des antibiotiques de D. VIDEAU qui opère en couche mince de 1 mm sur plaque de verre.

En cas de doute et pour accroître la sensibilité du test on peut extraire une quantité plus grande de suc musculaire et le concentrer en rapport connu dans un évaporateur rotatif sous vide.

Différenciation antibiotique-antiseptique.

D'autres anti-infectieux peuvent fournir un test positif (sulfa-mides, antiseptiques). L'emploi d'un test biologique utilisant des microorganismes antibiorésistants (levures) soit en milieu liquide (cf. article de P. DARMON) (10), soit par le procédé ici décrit modifié, permet de faire la différenciation. Des recherches sont en cours pour préciser les germes-test appropriés.

Valeur pratique.

La limite de sensibilité de la méthode proposée paraît suffisante pour déceler les antibiotiques s'ils sont présents à une concentration capable d'inhiber la culture des germes au cours de l'examen microbiologique des viandes, c'est-à-dire s'ils proviennent d'une thérapeutique administrée avant la mort ou en cas d'emploi à titre de conservation. Telle que proposée sa sensibilité serait par contre insuffisante pour affirmer l'absence d'antibiotique en concentration minimale pouvant résulter de l'emploi d'aliments antibiosupplémentés. Tout compte fait, c'est le premier objectif qui intéresse surtout l'inspecteur des viandes et la santé des consommateurs.

Résultats.

Ce test exécuté sur 96 blocs de viandes reçus pour analyse a donné les résultats rapportés dans le tableau suivant.

Résultats négatifs	Résultats positifs analyse microbiologique	
	Décalque du bloc	Cultures
<i>Abattages d'urgence</i>	1 — PGV	Bacillus
a) Absence d'indication concernant le traitement effectué	1 — < de 5 ge/ch	Clostridium
	1 — PGV	Microcoque
	1 = PGV	Clostridium
Total :	4	
b) Avec indication qu'aucun traitement n'a été effectué..	0	
c) Avec indication qu'un traitement antibiotique a été effectué	0	
<i>Abattages normaux</i> (lésions trouvées à l'inspection ayant nécessité un examen de laboratoire)	0	
Total	4 (sur 96 soit 4,1 %)	

Il s'avère donc à l'usage que :

— La présence dans les muscles de la cuisse de substances bactériostatiques à un taux inhibiteur est assez rare. Même dans ces cas nos cultures ont été positives.

— Même lorsqu'un traitement antibiotique a été effectué, la dose employée paraît avoir été insuffisante, ou le délai trop long ou trop court entre l'injection et l'abattage, pour qu'une concentration inhibitrice ait pu être observée dans les conditions de l'essai.

— Dans un des quatre cas positifs nous disposions d'un fragment de foie outre le bloc de viande ; la concentration hépatique était beaucoup plus forte et l'inhibition était spectaculaire.

Conséquences pour l'inspection des viandes.

Il conviendrait de discuter de la décision que le vétérinaire-inspecteur doit prendre lorsque la viande soumise à son examen renferme une substance bactériostatique ou bactéricide ; il faudrait tenir compte de la concentration pour apprécier les risques d'altération de la flore intestinale et d'accidents allergiques chez les consommateurs, risques discutés par H. VELU (11). Compte tenu des essais de F. LEBERT, de MEYN et Coll. et des nôtres, ces risques paraissent minimes lorsqu'il ne s'agit pas d'un antibiotique employé comme conservateur.

L'inconvénient majeur nous paraît plutôt être d'ordre microbiologique dans les cas où la viande contiendrait une forte concentration d'antibiotique. Pourraient être inhibés les germes les plus sensibles dont la viande se charge au cours des manipulations, et les germes responsables de la maturation du saucisson. Les putréfiants aérobies et anaérobies Gram + seraient inhibés ; leur pullulation se traduit par l'apparition des signes de la putréfaction qui rend les produits inconsommables ; ils sont donc peu dangereux. Par contre, les entérobactéries et moisissures, non inhibées, pourraient proliférer d'une façon inapparente et le risque de toxi-infection alimentaire serait accru. Ces viandes sont à proscrire de la fabrication du saucisson.

L'exécution du test paraît être indiquée même lorsque le certificat vétérinaire indique qu'aucun traitement n'a été effectué car on peut toujours craindre une injection thérapeutique faite à l'insu du vétérinaire-traitant pour essayer de guérir l'animal malade ou même avec une intention frauduleuse pour rendre l'examen bactériologique favorable dont les professionnels savent qu'il est souvent mis en œuvre lors d'abattage d'urgence.

En attendant des instructions officielles sur l'opportunité de la saisie de la carcasse, il nous semble que le vétérinaire-inspecteur agirait sagement et remplirait sa mission de sauvegarde de la santé publique en :

1° spécifiant soigneusement dans son certificat ou sa demande d'analyse le fait que l'animal abattu d'urgence a été traité et en indiquant avec précision la nature, la date et l'heure, le mode d'administration et la posologie des médicaments anti-infectieux ;

2° en demandant au laboratoire de rechercher la présence d'antibiotique dans l'échantillon de muscle et les organes qu'il lui adresse ;

3° en saisissant systématiquement le foie et les reins lorsqu'il estampille sans analyse la carcasse provenant d'un animal traité par un antibiotique ou un médicament (antimonial, arsénical par exemple) pouvant rendre toxiques les organes à fonction éliminatoire ou détoxifiante. En saisissant ces organes lorsqu'ils ont donné un test positif.

Il est donc toujours nécessaire d'adjoindre aux classiques prélèvements musculaires, un fragment de foie et un rein. Cette modalité n'est qu'indiquée par la circulaire du 26 mai 1953 ; à notre avis elle devrait être rendue obligatoire.

RÉSUMÉ

La recherche des antibiotiques dans la viande et les organes des animaux de boucherie provenant soit d'une intervention thérapeutique avant leur abattage d'urgence, soit de leur emploi comme conservateurs, telle que proposée est simple, rapide et efficace.

Nos recherches en cours préciseront les conditions dans lesquelles on peut, en employant d'autres germes-test, l'utiliser aussi pour la recherche des antiseptiques, thérapeutiques ou adjoints comme conservateurs ; nous pensons même pouvoir ainsi caractériser les substances par groupes.

BIBLIOGRAPHIE

1. M. CAMY. — *Bull. Ac. Vét. Fr.*, 1956, 9, 459.
2. J. JACQUET. — Les antibiotiques dans l'alimentation des animaux domestiques, *Journées pharmaceutiques françaises*, 1960. SEPES éd. Paris.
3. F. LEBERT. — *Cahiers Méd. Vét.*, 1962, 1, 1.
4. A. MEYN, J. KALICH et M. MERKENSCHLAGER. — *Berl. münch. tierarztl. Wschr.*, 1960, 73, 81-87.
6. CHURCHILL et FRANK. — Paper read at Mich. Branch., *Soc. Am. Bact.*, 1951, avril.
7. HENNINGSON, SILVERMAN et KOSIKOWSKY. — *J. Dairy Sc.*, 1952, 35, 533.
8. SILVERMAN et KOSIKOWSKY. — *J. Milk and Food Techn.*, 1952, 15, 120.
9. Standard methods for the examination of dairy products. 1953, 321, 10 éd.
10. P. DARMON. — Mises au point de Chimie analytique et d'analyse bromatologique, 1957, 5^e série, 33.
11. H. VELU. — *Rev. Path. Gén. et Phys. Clin.*, 1957, 690, 1169.

(Laboratoire Départemental et Régional de Biologie
et d'Hygiène de Caen.)