

EVALUATION DE TESTS RAPIDES DE DETECTION DES ANTIBIOTIQUES β -LACTAMINES ET TETRACYCLINES DANS LE LAIT

Cette étude a pour objet l'évaluation de deux kits de détection des antibiotiques des familles des β -lactamines et des tétracyclines dans le lait (kit 1 détection rapide de β -lactamines et kit 2 : détection rapide de β -lactamines et tétracyclines).

Ces kits, produits par la société Bioeasy, sont distribués en France par la société Humeau.

La méthode testée est basée sur une technique d'immuno-chromatographie sur bandelettes et est applicable à deux matrices différentes : lait cru ou poudre de lait reconstituée.

L'étude s'est déroulée en 2 étapes :

- 1 - Détermination du seuil de détection de la méthode pour 14 antibiotiques (kit 1) ou 18 antibiotiques (kit 2)
- 2 - Détermination du seuil de détection et robustesse de la méthode pour 1 antibiotique



PRINCIPE DE LA METHODE

Cette méthode est basée sur une technique d'immuno-chromatographie sur bandelettes.

Inoculation et incubation :

200 μ l d'échantillon sont introduits, après homogénéisation, dans une micro cuvette contenant le réactif. Celle-ci est mise à incuber 3 minutes à $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Cette première étape permet l'interaction entre les éventuels antibiotiques contenus dans le lait et les réactifs contenus dans la micro cuvette.

Après cette première incubation, la bandelette est introduite dans la micro cuvette. Une seconde incubation de 3 minutes pour le kit 1 et de 5 minutes pour le kit 2 permet la migration du mélange réactionnel dans la bandelette.

Lecture et interprétation des résultats :

La lecture a été réalisée visuellement. Un lecteur automatique existe mais n'a pas été utilisé dans le cadre de cette évaluation.

Vous trouverez ci-dessous, le schéma et grille d'interprétation des résultats du test pour la détection d'une molécule :

Figure 1 : Interprétation des résultats

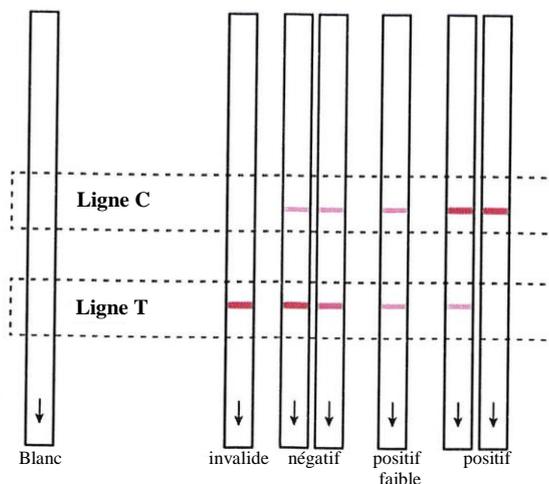


Tableau 1 : Interprétation des résultats

Comparaison de l'intensité de couleur entre la ligne de test T et la ligne de contrôle C	Résultats d'analyse	Interprétation des résultats
T>C	NEGATIF	L'échantillon de lait ne contient pas d'antibiotique ou contient une quantité d'antibiotique inférieure à la valeur de limite de détection (indiquée dans la notice).
T=C	POSITIF FAIBLE	L'échantillon de lait contient une quantité d'antibiotique égale à la valeur de détection (indiquée dans la notice).
T<C ou absence de ligne T	POSITIF	L'échantillon de lait contient une quantité d'antibiotique supérieure à la valeur de détection (indiquée dans la notice).

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel

Matériel utilisé lors de cette étude :

- micropipette 200 µl vérifiée métrologiquement
- trois incubateurs fournis par la société Humeau pour l'incubation à 40 °C ± 3 °C.

2- Lait cru de base

Chaque lait cru mis en œuvre a été analysé par la méthode à évaluer et par le kit d'un autre fournisseur (Kit C), basé sur le même principe d'immuno-chromatographie sur bandelettes, afin de vérifier l'absence d'antibiotique dans le lait de base.

2.1 Détermination du seuil de détection pour 14 ou 18 antibiotiques

Pour les 2 kits évalués, les essais ont été réalisés à partir de laits crus de vache de grand mélange prélevés dans des coopératives fromagères AOP Comté. Le lait cru mis en œuvre était différent pour chaque antibiotique testé.

2.2 Détermination du seuil de détection et robustesse pour 1 antibiotique

Afin d'étudier la variabilité provenant de l'origine des laits, deux laits crus AOP de grand mélange et un lait cru non AOP de mélange ont été utilisés.

3 - Préparation des échantillons

Les solutions mères ont été préparées à 1 mg/ml en se référant à l'annexe 2 des exigences AFNOR certification N° NF102¹ qui précise le solvant utilisé pour la solution mère, ainsi que la température et la durée maximale de son stockage. Les solutions filles ont été préparées par des dilutions successives de la solution mère. Un petit volume de la dilution finale a été ajouté dans le lait cru de base pour constituer l'échantillon à tester.

4 - Protocole

Les limites de détection (LOD) annoncées par le fournisseur sont celles figurant dans la notice Humeau. Le kit C a été utilisé pour vérifier les concentrations des échantillons testés.

4.1 Détermination du seuil de détection pour 14 ou 18 antibiotiques

14 molécules de la famille des β -lactamines et 4 molécules de la famille des tétracyclines ont été testées. Pour chaque molécule au moins 3 concentrations par kit ont été évaluées (LOD annoncée, légèrement supérieure et légèrement inférieure). En fonction des premiers résultats obtenus, les concentrations suivantes ont été réajustées. Pour chaque molécule d'antibiotique et pour 3 concentrations, 5 échantillons ont été analysés en double, quelques concentrations autres ont été testées sur 1 échantillon analysé en double. L'évaluation n'a été réalisée que sur un lot, il n'a donc pas été possible d'évaluer la variabilité inter-lots.

4.2 Détermination du seuil de détection et robustesse pour 1 antibiotique

Une deuxième étude a été réalisée sur une molécule testée lors de la première étude, afin de confirmer les résultats obtenus, en faisant varier les lots des kits ainsi que l'origine des laits mis en œuvre.

Cette deuxième étude a été réalisée sur la dicloxacilline qui présentait dans la première partie de l'étude une limite de détection 10 fois inférieure à la LOD annoncée. 3 laits de différentes origines et 2 lots différents par kit ont été évalués.

Les résultats ont été obtenus sur 10 échantillons analysés en doubles par concentration, par type de lait et par kit et ont permis de déterminer la capacité de détection ($Cc\beta$) selon les exigences AFNOR certification N° NF102¹. $Cc\beta$ est la plus petite teneur en substance qui peut être détectée, identifiée et/ou mesurée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur β de 5 %.

RESULTATS

Au cours de l'évaluation, aucune bandelette n'a présenté de tests invalides, la ligne de contrôle était toujours présente.

1 Détermination du seuil de détection pour 14 ou 18 antibiotiques

Les tableaux ci-dessous reprennent l'ensemble des résultats obtenus lors de l'évaluation pour 5 échantillons analysés en double par concentration. Ils sont adjoints des LOD annoncées par le fournisseur et des limites maximales réglementaires (LMR) d'après le règlement européen n° 37/2010.

La colonne LOD observée synthétise les limites de détection constatées dans cette évaluation. Un code couleur permet de les positionner par rapport aux LOD annoncées par le fournisseur.

Tableau 2: Limites de détection obtenues pour le Kit N°1 de détection des β-lactamines

Famille	Antibiotique	LOD annoncée par le fournisseur (ppb)*	Limite de détection observée (ppb)*	LMR (ppb)*
β-lactamines	Pénicilline G	1-1,5	0,5-1	4
	Ampicilline	2-4	0,5-1	4
	Amoxicilline	2-4	0,5-1	4
	Oxacilline	5-7	2-3	30
	Cloxacilline	5-7	2-3	30
	Dicloxacilline	10-20	1-2,5	30
	Nafcilline	20-30	2,5-5	30
	Céfapirine	8-10	6-8	60
	Céfalonium	6-8	1-2	20
	Céfazoline	40-50	20-30	50
	Céfoperazone	4-6	1-2	50
	Cefquinome	12-18	2,5-5	20
	Ceftiofur	80-100	40-60	100
	Céfacétrile	25-30	15-20	125

Tableau 3: Limites de détection obtenues pour le Kit N° 2 de détection des β-lactamines et tétracyclines

Famille	Antibiotique	LOD annoncée par le fournisseur (ppb)*	Limite de détection observée (ppb)*	LMR (ppb)*
β-lactamines	Penicilline G	1,5-2	1,5-2	4
	Ampicilline	3-5	1-3	4
	Amoxicilline	3-5	1-2	4
	Oxacilline	5-7	2-3	30
	Cloxacilline	6-8	2-3	30
	Dicloxacilline	10-20	1-2,5	30
	Nafcilline	20-30	2,5-5	30
	Céfapirine	15-18	6-8	60
	Céfalonium	6-8	2-4	20
	Céfazoline	40-50	30-40	50
	Céfoperazone	4-6	1-2	50
	Cefquinome	12-18	2,5-5	20
	Ceftiofur	80-100	40-60	100
	Céfacétrile	25-30	15-20	125
Tétracyclines	Doxycycline	30-50	5-10	ND
	Chloretétracycline	30-50	10-20	100
	Oxytétracycline	30-50	5-10	100
	Tétracycline	30-50	10-20	100

Limite observée = LOD annoncée

LOD annoncée /2 < Limite observée < LOD annoncée

Limite observée < LOD annoncée /2

Clé de lecture du code couleur pour l'interprétation des différences entre LOD annoncées et limites de détection observées

La limite de détection du kit 1 observée pour la Pénicilline G, la Céfapirine et la Céfacétrile est comprise entre la LOD/2 et la LOD annoncée. Pour toutes les autres molécules, la limite de détection observée est très en dessous de la LOD annoncée.

En ce qui concerne le kit 2, la limite de détection observée pour la Pénicilline G correspond à la LOD annoncée. Pour l'Ampicilline, la Céfazoline et la Céfacétrile, la limite de détection observée est comprise entre LOD/2 et LOD annoncée. Et pour toutes les autres molécules, la limite de détection observée est très en dessous de la LOD annoncée.

2 Détermination du seuil de détection et robustesse pour 1 antibiotique

Tableau 4: Résultats par type de lait et par lot (en % de résultats positifs pour n analyses)

KITS	LOTS	Concentration en dicloxacilline (ppb)	Résultats	Lait AOP N°1 n=20	Lait Non AOP n=20	Lait AOP N°2 n=20
KIT N°1	LOT A	2,5	% pos	100%	100%	100%
		2	% pos	100%	100%	100%
		1,5	% pos	95%	30%	85%
	LOT B	2,5	% pos	100%	100%	100%
		2	% pos	100%	100%	100%
		1,5	% pos	90%	30%	85%
KIT N°2	LOT C	2,5	% pos	100%	100%	100%
		2	% pos	100%	95%	100%
		1,5	% pos	30%	0%	0%
	LOT D	2,5	% pos	100%	100%	100%
		2	% pos	100%	95%	100%
		1,5	% pos	90%	0%	0%

C_β : capacité de détection

La capacité de détection pour la dicloxacilline est de 2 ppb pour tous les kits et laits testés, sauf pour le kit 1 sur un lait et un lot avec une C_β de 1,5 ppb, mais la différence ne semble pas significative : 100% de résultats positifs sur 20 à 2 ppb, contre 95% à 1,5 ppb.

Tableau 5: Résultats par kit (en % de résultats positifs pour n analyses)

Concentration en Dicloxacilline n=120	1,5 ppb	2 ppb	2,5 ppb
KIT n° 1 Détection des β-lactamines	69%	100%	100%
KIT n° 2 Détection des β-lactamines et tétracyclines	20%	98%	100%

C_β : capacité de détection

Globalement la capacité de détection pour la dicloxacilline a été évaluée à 2 ppb, et est identique pour les deux kits

CONCLUSION GENERALE

Ce test de détection des antibiotiques β -lactamines et tétracyclines est rapide et pratique à mettre en œuvre, et des témoins négatifs et positifs attestant de la performance du lot sont dorénavant fournis avec le kit. Sa mise en œuvre globale est simple et ne nécessite pas de qualification technique particulière. L'interprétation des résultats en lecture visuelle ne présente pas de difficulté, du fait des 3 possibilités de résultats : négatif, positif faible ou positif. De plus, après séchage des bandelettes (3 minutes à l'air libre), les lignes sont plus marquées et permettent de mieux visualiser l'intensité, surtout en limite de détection.

La première étude réalisée sur 10 molécules de β -lactamines et 4 de tétracyclines a permis d'observer pour les deux kits des seuils de détection inférieurs ou égaux aux LOD annoncées par le fournisseur.

La deuxième étude réalisée sur la dicloxacilline a permis de confirmer et d'affiner ces résultats avec une détermination de $Cc\beta$ à 2 ppb pour les 2 kits. Cette étude réalisée sur plusieurs lots, des laits de différentes origines, et avec différents manipulateurs sur plusieurs jours a aussi démontré la robustesse de la méthode.

¹AFNOR certification N° NF102 : « *Protocole de validation des méthodes de détection et de quantification des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits agro-alimentaire - Exigences relatives aux études préliminaire et interlaboratoires menées par un laboratoire expert* » révision n° 1 : 1^{er} juin 2017