

## Détection des substances inhibitrices dans le lait

La présence éventuelle de résidus de médicaments vétérinaires antibactériens dans le lait est source de problèmes technologiques lors de la fabrication de fromages ou de yaourts et peut constituer un risque pour la santé publique. Des méthodes permettant la détection facile, rapide et à grande échelle sont indispensables pour le tri des laits. Il s'agit de tests d'inhibiteurs microbiens, basés sur la mise en évidence de l'inhibition de la croissance d'un microorganisme donné au cas où des résidus d'antibactériens sont présents dans le lait examiné. Les microorganismes tests les plus utilisés sont *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis* ou *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ; plus rarement *Bacillus subtilis* ou *Micrococcus luteus*. Outre une grande facilité d'emploi et de bonnes performances de répétabilité et reproductibilité, ces tests ont pour but de permettre la détection du plus large spectre possible d'antibactériens, à des sensibilités proches des LMRs – définies par la réglementation - pour toutes les catégories d'antibactériens. Dans la pratique, cette exigence théorique ne peut être totalement respectée. Le choix entre différents tests dépend donc d'une réflexion d'ensemble tenant compte des substances à rechercher le plus probablement, des conditions pratiques, de l'existence de tests de confirmation plus ciblés et plus sensibles...

Dès leur apparition dans les années 1930-1940, les substances antibactériennes (antibiotiques et sulfamides) ont été utilisées pour traiter les affections des vaches laitières [18], principalement pour la prévention et le traitement des mammites [15]. Cependant, la présence éventuelle de résidus dans le lait est une source de problèmes technologiques, lors de la fabrication de fromage ou de yaourt... Elle peut, en outre, constituer un risque pour la santé humaine, d'où progressivement, la fixation de limites maximales de résidus (LMRs) dans la réglementation. La recherche des résidus d'antibactériens, ou plus largement, de tout type de substance inhibitrice s'est donc révélée rapidement indispensable. De nombreux tests ont donc été développés au fil des années et restent en constante évolution, comme l'atteste le nombre d'articles sur ce point, parus dans la littérature scientifique et technique du domaine. L'ensemble couvre toutes les étapes envisageables dans une recherche de résidus : il y a ainsi des tests pour leur détection, d'autres pour la confirmation des échantillons présumés positifs, d'autres pour la détection ou l'identification de familles précises d'antibactériens. Les principes des tests diffèrent grandement selon l'objectif visé. Pour la confirmation ou l'identification d'inhibiteurs donnés, sont ainsi proposées des méthodes immunoenzymologiques, radio-immunologiques, enzymatiques, chromatographiques, électrophorétiques, mais aussi microbiennes.

En revanche, pour l'étape de détection des résidus d'inhibiteurs, qui nous intéresse plus particulièrement ici, il s'agit presque uniquement de méthodes microbiennes, c'est à dire, qui visent à mettre en évidence l'inhibition d'un microorganisme test.

Les inhibiteurs sont des substances qui, agissant au niveau moléculaire par divers mécanismes biochimiques, bloquent ou inhibent la croissance d'un ou plusieurs groupes bactériens. Il peut s'agir de désinfectants, détergents, conservateurs, pesticides, certains additifs alimentaires...et de médicaments vétérinaires, dont les anticoccidiens et surtout les antibactériens...

### ↳ Les antibactériens

Les antibactériens sont constitués principalement d'antibiotiques et d'agents chimiothérapeutiques, notamment les sulfamides (ou sulfonamides, plus exactement). Développés dans les années 1930 et aussitôt utilisés dans le traitement des maladies infectieuses, les sulfamides, sont des antibactériens synthétiques. En revanche, les antibiotiques sont des substances produites par

certaines microorganismes, qui inhibent la croissance d'autres microorganismes –voire leur propre croissance-. Les premières observations de telles activités remontent au XIXe siècle, mais c'est dans les années 1930-1940, avec la découverte de la pénicilline, puis de nombreuses autres substances, qu'elles ont été approfondies et que la recherche de substances antimicrobiennes, produites par des microorganismes est devenue systématique. Utilisés en thérapeutique humaine dès le début des années 1940, les antibiotiques ont également été rapidement introduits en médecine vétérinaire, mais aussi utilisés en tant qu'additifs dans l'alimentation animale. Dans l'élevage bovin, leurs indications concernent principalement les mammites (dus à *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'à d'autres germes Gram+ ou Gram-), les traitements préventifs lors du tarissement et quelques pathologies non mammaires (locomotion, problèmes pulmonaires) [8].

Leur gamme n'a cessé de s'élargir depuis, grâce à la recherche microbiologique et au développement, pour certaines familles, des travaux d'hémisynthèse. Ils sont maintenant divisés en une dizaine de familles différentes. Ce sont les :

- $\beta$ -lactamines, elles-mêmes subdivisées en plusieurs sous-familles, dont les pénicillines, les céphalosporines...
- tétracyclines,
- phénicolés, principalement le chloramphénicol,
- aminoglycosides, par exemple la néomycine, la streptomycine et ses analogues,
- macrolides, par exemple l'érythromycine,
- polypeptides, par ex. la bacitracine,
- lincosamides,
- ansamycines, par ex. la rifamycine,,  
et d'autres encore.

Les  $\beta$ -lactamines sont la catégorie la plus largement utilisée dans l'élevage [7], cependant des observations récentes montrent une augmentation de la part des autres catégories (20% des échantillons positifs et plus [7]) : aminoglycosides, tétracyclines, macrolides [7], sulfamides [14], seules ou combinées à une  $\beta$ -lactamine [15]).

Le lait provenant de vaches traitées par des antibactériens doit être éliminé de la collecte pendant la durée du traitement, puis

pendant un certain temps d'attente, prescrit par le fabricant. Cependant, il peut arriver que des résidus d'antibactériens restent présents dans le lait collecté, principalement à cause [8,13] :

- du non-respect, souvent accidentel, de ce temps d'attente,
- de la mauvaise observation des recommandations d'utilisation des médicaments,
- de contaminations accidentelles lors de la traite,
- de périodes d'excrétion du médicament anormalement longues chez certains animaux malades,
- d'un vêlage trop précoce,
- de la présence d'antibactériens dans l'alimentation animale, bien qu'ils soient, en principe, exclus des aliments pour l'élevage laitier.

## ↳ Des résidus indésirables

Or la présence de ces résidus pose à la fois des problèmes technologiques et des problèmes de santé publique. Du point de vue technologique, ils perturbent gravement les processus de fermentation du lait, d'où des conséquences sévères en fabrication de fromages ou de yaourts. [13]

Du point de vue de la santé publique, les risques sont, à la fois d'ordre pharmaco-toxicologiques, microbiologiques (risque de favoriser l'apparition de germes résistants ou pathogènes dans la flore intestinale) ou allergiques. Ces risques sont pris en compte au cours d'études toxicologiques, qui permettent de déterminer, pour chaque antibactérien :

- la dose journalière admissible (DJA), puis à partir de là,
- la limite maximale de résidus (LMR), dans le lait et d'autres aliments.

*NB : Les LMRs sont des concepts utilisés dans le Codex et dans les textes de l'Union Européenne ; aux Etats-Unis, la FDA se réfère à un concept voisin de fourchette de tolérance (safe/tolerance level). Ces deux valeurs peuvent éventuellement différer pour une même substance.*

- et enfin le temps d'attente.[12].

La recherche des résidus d'antibiotiques ou de sulfamides dans le lait s'intéresse donc à ces deux aspects. Du point de vue de la sécurité technologique, les systèmes de paiement du lait à la qualité sont très pénalisants pour les producteurs, en cas de présence d'inhibiteurs. Du point de vue de la santé publique, pendant longtemps, la seule LMR existante concernait la pénicilline [12]. En 1990, dans l'Union Européenne, une procédure communautaire de fixation des LMRs dans les aliments d'origine animale, a été mise en place et depuis, petit à petit, des LMRs sont déterminées pour l'ensemble des médicaments vétérinaires. (cf ci-dessous).

Il y a cependant souvent un fossé entre les concentrations de résidus considérées comme "technologiquement saines" et celles fixées en santé publique [12]. Dès lors, on observe de continuelles tentatives d'amélioration de la sensibilité des tests existants ainsi que le développement de tests nouveaux.

Le survol de la littérature des dernières années montre ainsi la parution de plus d'une centaine d'articles sur la recherche des résidus d'antibactériens en général, ou de certaines catégories d'antibiotiques et/ou sulfamides, en particulier, proposant aussi bien des évolutions de méthodes existantes que de nouvelles méthodes. Parallèlement, on peut également y constater des interrogations sur le positionnement des méthodes officielles en cours, par rapport aux LMRs et par rapport à ces évolutions méthodologiques [6, 14].

Au point de vue réglementaire, cette activité intense s'observe principalement, comme on l'a vu, pour la fixation des LMRs. Le texte d'origine est le règlement 2377/90 du 26/6/1990 définissant la procédure communautaire de fixation des LMRs dans les aliments d'origine animale. Il comportait un certain nombre d'annexes, initialement vides, réservées respectivement :

- "à la liste des substances pour lesquelles des LMRs ont été fixées" (annexe I),
- à la liste des substances non soumises à LMR (annexe II),
- à la liste des substances pour lesquelles des LMRs provisoires ont été fixées (annexe III),
- à la liste des substances pour lesquelles aucune LMR ne peut être fixée" (annexe IV).

Les LMRs des substances actives des médicaments vétérinaires – dont les antibactériens-, intégrées progressivement dans l'annexe I, sont fixées après évaluation scientifique par le Comité des Médicaments Vétérinaires (instance d'expertise établie par la Commission), à partir de la DJA, en tenant compte de facteurs de sécurité. Lorsque les études n'ont pas encore été achevées, une LMR provisoire peut être fixée pour une durée maximale de 7 ans (5 ans initiaux avec possibilité de prolongation exceptionnelle de 2 ans), qui sera donc intégrée à l'annexe III. A l'issue de l'évaluation, il y a, soit effectivement fixation d'une LMR (intégrée alors en annexe I) ; soit il n'apparaît pas nécessaire pour la protection de la santé publique de fixer une limite maximale et la substance est alors intégrée en annexe II. Enfin, pour certaines substances, il s'avère que leurs résidus, "quelle que soit leur limite, constituent un risque pour la santé du consommateur". Aucune LMR ne peut donc leur être fixée et ces substances, interdites d'utilisation, sont alors intégrées en annexe IV. En ce qui concerne les antibactériens, c'est notamment le cas du chloramphénicol et de la dapsone.

Avec cette procédure, ces annexes se sont ainsi remplies au rythme moyen de 5 à 10 règlements modificateurs par an. Le dernier texte résumant l'ensemble des modifications effectuées et récapitulant le contenu de chacune d'entre elles est le règlement n° 508/1999, daté du 4/3/1999. Mais depuis, plus de vingt textes modificateurs sont venus compléter les listes établies alors ! Cependant, l'ensemble des textes en vigueur sur ce point peut être consulté sur le site Internet de l'Union Européenne, à l'adresse suivante : [http://europa.eu.int/eur-lex/fr/lif/dat/1990/fr\\_390R2377.html](http://europa.eu.int/eur-lex/fr/lif/dat/1990/fr_390R2377.html).

Les méthodes officielles de détection d'inhibiteurs, même lorsqu'elles ont été publiées avant les débuts de la procédure de fixation des LMRs, ont connu moins de variations. Elles sont généralement différentes d'un pays à l'autre, mais le plus souvent basées sur des tests d'inhibiteur microbien. Pour l'Union Européenne, les méthodes en vigueur sont décrites dans :

- la décision 91/180 pour la détection dans le lait cru et le lait traité thermiquement (pages 39-47), [2]
- le règlement n° 213/2001 pour le lait écrémé en poudre. (page 79) [5].

Pour la France, c'est l'arrêté du 2 septembre 1983 qui établit les méthodes de tri et de confirmation [1]. Toutefois, pour le paiement du lait, cette situation est en passe d'évoluer, puisque les pouvoirs publics ont accepté, à la demande de l'Interprofession de modifier le principe de la méthode. La nouvelle technique de screening (tri), basée sur l'utilisation du germe *Bacillus stearothermophilus* (cf ci-dessous) sera effective au 1/1/2002.

Dans la multitude de tests existants, il est possible de procéder à un regroupement en deux grandes catégories selon le but visé. Certains tests ont pour objectif de détecter tous les, en tout cas le maximum, d'inhibiteurs possibles. Ils sont utilisés pour le tri (screening) d'un grand nombre d'échantillons de lait, par exemple dans le cadre du paiement du lait à la qualité ou d'auto-contrôles à la ferme ou en industrie laitière. Il s'agit de tests d'inhibiteur microbien, où est mise en évidence l'inhibition d'un microorganisme test. Ces méthodes présentent un certain nombre de traits communs, que nous passerons en revue ci-dessous, avant de détailler leurs différences.

D'autres tests ont pour objectif de détecter spécifiquement une substance ou un groupe de substances données. Ils sont utilisés pour la confirmation des échantillons présumés positifs ou pour la détection ou l'identification de familles précises d'antibactériens. Il peut s'agir à nouveau de méthodes microbiennes, mais faisant alors appel à des techniques de diffusion sur différents milieux gélosés. Mais on trouve en outre de nombreuses autres méthodes, de principe très différent, selon le type de substance recherchée : méthodes enzymatiques, immunoenzymologiques, radio-immunologiques, chromatographiques, électrophorétiques... En dehors d'études expérimentales, ces tests sont conçus pour intervenir plutôt en deuxième étape (ou plus) lors des recherches de résidus d'antibactériens.

## ↳ Les tests d'inhibiteurs microbiens pour le tri

### ↻ POINTS COMMUNS

Il s'agit d'exposer une espèce bactérienne donnée, caractéristique d'un type de test, à l'échantillon de lait à tester et de mettre en évidence par différents moyens, également caractéristiques d'un type de test, une éventuelle inhibition de la croissance des microorganismes si l'échantillon contient des résidus d'antibactériens.

Les microorganismes tests sont généralement issus des genres *Bacillus*, *Micrococcus* et *Streptococcus*... Ils doivent nécessairement être sensibles à un large spectre d'antimicrobiens : antibiotiques de différentes familles et sulfamides. En effet, une méthode de tri satisfaisante doit permettre la détection de la plus grande variété possible d'antimicrobiens. Les tests microbiens de tri devraient, en outre, partager l'ensemble des caractéristiques suivantes, reprises d'après un " portrait " du test d'inhibiteur microbien idéal, donné en [18] :

- Au point de vue des possibilités de détection : permettre de détecter un large spectre d'antimicrobiens, à des concentrations proches des LMRs,
- au point de vue pratique : être peu cher, rapide, facile d'emploi, ne nécessitant en particulier, ni main d'œuvre, ni équipement spécialisé, être éventuellement automatisable ,
- pour limiter les risques de faux positifs : être peu sensible aux inhibiteurs naturels du lait, tels que le lysozyme ou la lactoferrine,
- pour limiter les risques de faux positifs et/ou de faux négatifs : être peu sensible à d'éventuelles interférences liées à la microflore de l'échantillon ou à la procédure suivie (conditions d'incubation, volume des prises d'essai ...etc),
- au point de vue des caractéristiques analytiques : être répétable et reproductible.

Il apparaîtrait, en outre, souhaitable que d'éventuelles étapes de confirmation, d'identification, voire de quantification soient faciles à pratiquer dans la " foulée " d'un premier test de tri. [18].

### ↻ OBSERVER L'INHIBITION DE LA CROISSANCE

Selon les tests, les cultures des microorganismes tests sont, soit prêtes à l'emploi, dans une microplaque, par exemple, soit à reconstituer à partir de souches de collection, dans des milieux bien définis. Le contact avec le l'échantillon de lait se fait, soit par diffusion quand la culture est en milieu gélosé, soit directement dans le milieu liquide de culture. Dans ce dernier cas, les protocoles expérimentaux prévoient alors, le plus souvent, un chauffage préalable de l'échantillon à tester afin d'inactiver les inhibiteurs naturels du lait [9]. Quand l'échantillon de lait testé contient des antibactériens, la croissance du microorganisme test est inhibée. Selon les tests, ce fait est mis en évidence par :

- en milieu gélosé sur boîte, observation d'une zone d'inhibition de croissance, plus ou moins importante aux abords d'un disque imprégné de l'échantillon. Cette zone est plus claire que le reste du milieu ; la différence de coloration pouvant éventuellement être renforcée par la présence d'un indicateur coloré.
- observation de l'éventuel virage d'un indicateur coloré de pH. En effet, la croissance normale des microorganismes test se solde par une acidification du milieu, d'où virage de l'indicateur coloré. En présence d'antibactériens, la croissance est plus ou moins gravement perturbée, d'où une moindre acidification et l'absence de virage. Plus rarement, l'(absence d')acidification peut être mise en évidence par titration.
- Sur un principe voisin, observation de l'éventuel virage d'un indicateur redox, puisque la croissance normale des microorganismes se solde par une réduction des composés du milieu.
- Toujours selon un principe voisin, certains tests reposent sur le changement de couleur (ou non) d'un substrat chromogénique spécifique d'une enzyme produite lors de la croissance normale des microorganismes.

## ➤ TESTS D'INHIBITEURS MICROBIENS

Les tableaux ci-dessous tenteront de faire un tour d'horizon (**non exhaustif**) des différents tests d'inhibiteurs microbiens utilisables pour le tri (screening) des laits.

Ils s'inspirent grandement de la description détaillée des méthodes données dans un inventaire publié par la FIL dans son bulletin n° 258 de 1991 [9], ainsi que de certains articles issus de la monographie publiée sur cette question par la FIL en 1995 [10], notamment des articles [16] et [18]. Les différents tests y seront séparés par rapport aux espèces bactériennes-test sur lesquelles ils reposent. Certains ont fait l'objet de nombreux développements pour améliorer leur sensibilité ou leur facilité d'emploi et il en existe donc plusieurs déclinaisons, bien que le principe de base

soit resté identique ; d'autres ont pu, au contraire tomber en désuétude. Seule une veille portant à la fois sur la (l'abondante) littérature scientifique et technique du domaine et sur les gammes de tests proposés par les fournisseurs permettrait de donner une information exhaustive et - momentanément - à jour. Ce n'est pas notre but aujourd'hui.

Les valeurs annoncées pour la sensibilité des différents tests doivent être considérées avec précaution. Certaines valeurs sont, en effet, issues d'études parcellaires, aux conditions mal connues. En outre, les différences de composition de lait peuvent affecter notablement les résultats, surtout pour de faibles concentrations d'antibactériens. Cette influence apparaît cependant plus limitée en présence de gélose.

tableau 1 : tests reposant sur *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis*  
table 1 : tests based upon the use of *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis*

nom	principe	durée et température	spectre (partiel)	Limite de détection en µg/l	LMR en µg/kg, d'après [4] sauf indication contraire	réf.
name	principle	duration and temperature	spectrum (partial )	Detection limit in µg/l	MRL in µg/kg, from [4] unless otherwise stated	
	diffusion sur boîte de gélose à partir d'un disque et obtention d'une zone d'inhibition  disk assay plate method, giving a clear inhibition zone around the disk	3-4h à 55°C ou 64°C	pénicilline	4.8	4	[9]
FIL / IDF 57 :1970	<i>id.</i>	2.5-5h à 55°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline ampicilline cloxacilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>aminoglycosides</u> néomycine dihydrostreptomycine <u>macrolides</u> erythromycine <u>chloramphénicol</u> <u>sulfonamides</u>	3.6 5 35 400 500 22000 13000 2250 15000 100-1000	4 4 30 100 100 500*** 200*** 40**** 0 100	
	<i>id.</i> + indicateur coloré de croissance <i>id.</i> + indicator	55 ou 64°C jusqu'à obtention d'une zone d'inhibition > 14 mm  inhibition zone > 14 mm				

méthode officielle australienne australian official method	<i>id.</i>	obtention d'une zone d'inhibition inhibition zone	<u>β-lactamines</u> ampicilline oxytétracyclineHCl	5 150-500	4 100	[15]
kit CIA (Charm Inhibition Assay)	<i>id.</i> + indicateur pH <i>id.</i> +pH indicator	3h20 à 64°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline ampicilline cloxacilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>macrolides</u> erythromycine <u>sulfonamides</u>	3.6 10 100 200 250 250 5-10	4 4 30 100 100 40**** 100	[9]
méthode officielle UE et autres EU official method and others	diffusion en tube de gélose + indicateur pH tube diffusion method + pH indicator	2,5-2,75 h à 63°C	cf FIL 57 :1970			[2] [9]
kits BRT * (test réduction noir brillant) méthode officielle de routine allemande Brillant black reduction test, official German routine method	<i>id</i> + indicateur redox          <i>id</i> + redox indicator	2,5-3,5h à 60-70°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline ampicilline cloxacilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>aminoglycosides</u> néomycine dihydrostreptomycine <u>macrolides</u> tylosine <u>chloramphénicol</u> <u>sulfonamides</u>	1.1** 1.5** 13** 70** 50** 175** 1750** 20** 1500** 1-350	4 4 30 100 100 500*** 200*** 50 0 100	[14]
kits Delvotest et apparentés* méthode officielle de routine britannique, belge, néerlandaise,... une des méthodes de routine suédoise  Delvotest kits * and others official British, Dutch, Belgian... routine methods one of swedish routine methods	<i>id.</i> + indicateur pH          <i>id.</i> +pH indicator	2,5-2,75h à 64°C	<u>β-lactamines</u> benzylpénicilline ampicilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>aminoglycosides</u> dihydrostreptomycine <u>macrolides</u> spiramycine <u>sulfonamides</u>	1-3 2.5 1000 200-400 4000-6000 1000-2000 400-800	4 4 100 100 200*** 200 100	[7] [15] [17] [7] [7] [7]

méthode officielle italienne  italian official method	diffusion en gélose + indicateur pH		<u>β-lactamines</u> pénicilline G ampicilline cloxacilline	4 4 30	4 4 30	[6]
	agar diffusion. +pH indicator		<u>aminoglycosides</u> néomycine dihydrostreptomycine <u>macrolides</u> tylosine <u>sulfonamides</u>	500 250 50 100-500	500*** 200*** 50 100	
kit Charm Farm test	milieu liquide + indicateur pH liquid medium + pH indicator	3h50 à 67°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline ampicilline cloxacilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>macrolides</u> erythromycine <u>sulfonamides</u>	2.4 4 50 60 100 250 100-150	4 4 30 100 100 40**** 100	[9]

tableau 2 : tests reposant sur *Bacillus subtilis*  
table 2 : tests based upon the use of *Bacillus subtilis*

nom  name	principe  principle	durée et température  duration and temperature	spectre (partiel)  spectrum (partial )	Limites de détection en µg/l  Detection limit in µg/l	LMR en µg/kg, d'après [4] sauf indication contraire  MRL in µg/kg, from [4] unless otherwise stated	réf.
Arla Microtest  a été une des méthodes de routine suédoise  was one of swedish routine methods	microcupules + indicateur redox  microwells + redox indicator	6h à 40°C	<u>β-lactamines</u> benzylpénicilline	2.4	4	[7]
			<u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>aminoglycosides</u> néomycine dihydrostreptomycine <u>macrolides</u> erythromycine <u>chloramphénicol</u> <u>sulfonamides</u>	100 100 2500 5000 600 600 1000	100 100 500*** 200*** 40**** 0 100	[9]
AOAC " test de terrain "  AOAC field test	diffusion sur boîte de gélose et obtention d'une zone d'inhibition  disk assay plate method, giving a clear inhibition zone around the disk	au plus rapide 3-4h à 37°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline	12	4	[9]

tableau 3 : tests reposant sur *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*  
table 3 : tests based upon the use of *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*

nom name	principe principle	durée et température duration and temperature	spectre (partiel) spectrum (partial )	Limites de détection en µg/l Detection limit in µg/l	LMR en µg/kg, d'après [4] sauf indication contraire MRL in µg/kg, from [4] unless otherwise stated	réf.
méthode officielle française et autres méthodes d'acidification french official method and other acidification methods	culture en milieu liquide + indicateur pH liquid medium + pH indicator	2,5h à 45°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline ampicilline cloxacilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>macrolides</u> erythromycine <u>chloramphénicol</u> <u>sulfonamides</u>	3 5 200 400 400 60 1200 100-1000	4 4 30 100 100 40**** 0 100	[9]
Accusphere (Intertest)	<i>id</i> mais souche et indicateur prêts à l'emploi (lyophilisés) <i>id</i> but lyophilized strain and indicator	4h à 45°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline ampicilline cloxacilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>aminoglycosides</u> néomycine streptomycine <u>macrolides</u> erythromycine tylosine <u>chloramphénicol</u> <u>sulfonamides</u>	6 4 200 500 500 10000 5000 100 1000 500 200	4 4 30 100 100 500*** 200*** 40**** 50 0 100	[9]
Valio T 101	<i>id.</i> mais souche, milieu et indicateur prêts à l'emploi (lyophilisés) <i>id</i> but lyophilized strain, medium and indicator	4,5 h à 42°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline ampicilline cloxacilline <u>tétracyclines</u> tétracycline HCl oxytétracycline <u>aminoglycosides</u> néomycine streptomycine <u>macrolides</u> erythromycine <u>chloramphénicol</u> <u>sulfonamides</u>	3 10 100-200 150-200 150-200 200-500 500-1000 50 500-1000 1000	4 4 30 100 100 500*** 200*** 40**** 0 100	[9] [13] [7]

test bioluminescence Byosis	ratio de l'ATP produit après 20 et 60 mn de croissance. Comparaison à un témoin sans inhibiteur	60 mn à 45°C	<u>β-lactamines</u>			[9]
	ratio of ATP produced after 20 mn and 60 mn of growth. Comparison to a control milk		benzylpénicilline	1.8	4	
Lumac rapid antibiotic test	croissance en milieu liquide avec substrat enzymatique chromogène  growth in liquid medium + chromogenic enzymatic substrate	30 mn à 41°C	ampicilline	3	4	[9]
			cloxacilline	100	30	
			<u>tétracyclines</u>			
			tétracycline HCl	40	100	
			<u>aminoglycosides</u>			
			streptomycine	3000	200***	
			<u>macrolides</u>			
			erythromycine	20	40****	
			<u>chloramphénicol</u>	500	0	
			<u>sulfonamides</u>	3000-30000	100	
test avec <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> test with <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>						
test yaourt yoghurt inhibitor test	culture en milieu liquide. Titration acidité du milieu et comparaison avec acidité culture "yaourt" témoin  growth in liquid medium. Titration of acidity and comparison to a control culture	2-2,5 h à 45°C	<u>β-lactamines</u>			[9]
			benzylpénicilline	1.2	4	
			cloxacilline	500	30	
			<u>tétracyclines</u>			
			oxytétracycline	300	100	
			<u>aminoglycosides</u>			
			néomycine	10000	500***	
			streptomycine	1000	200***	
			<u>macrolides</u>			
			erythromycine	100	40****	
<u>chloramphénicol</u>	2000	0				

#### Légende des tableaux 1 à 4

keys of tables 1 to 4

\* il existe de multiples déclinaisons du kit de base / There are several variances of the test

\*\* obtenu en faisant varier le pH d'incubation selon la substance recherchée / values obtained by modifying the incubation pH, depending on the sought drug

\*\*\* LMRs provisoires, valables jusqu'en juin 2002, règlement n° 1960/2000 du 15/9/2000 / preliminary MRLs, valid until June 2002, regulation n° 1960/2000 of 2000/9/15

\*\*\*\* règlement n° 2338/2000 du 20/10/2000, qui stipule en outre, que cette substance ne doit pas être utilisée chez les espèces produisant du lait destiné à la consommation humaine / regulation n° 2338/2000 of 2000/10/20 also stipulating that this drug should not be used in species producing milk for human consumption



tableau 4 : tests reposant sur *Micrococcus luteus* (anciennement *Sarcina lutea*)

table 4 : tests based upon the use of *Micrococcus luteus* (former *Sarcina lutea*)

nom name	principe principle	durée et température duration and temperature	spectre (partiel) spectrum (partial )	Limites de détection en µg/l Detection limit in µg/l	LMR en µg/kg, d'après [4] MRL in µg/kg, from [4]	réf.
méthode officielle FDA Official FDA method : <i>Micrococcus luteus</i> cylinder plate method	diffusion sur boîte de gélose et obtention d'une zone d'inhibition autour du cylindre contenant le lait disk assay plate method, giving a clear inhibition zone around the milk containing cylinder	16-18h à 30°C	<u>β-lactamines</u> pénicilline	6	4	[9]

Les tableaux montrent que spectres et sensibilités varient selon le microorganisme test.

Dans le détail, les tests basés sur *Bacillus stearothermophilus* s'avèrent particulièrement sensibles aux β-lactamines. Leur sensibilité vis à vis des tétracyclines et des sulfonamides semble davantage liée à leur conception (conditions d'incubation, présence d'additifs...) [16]. La détection de certains aminoglycosides et macrolides est plus délicate, de même que celle du chloramphénicol. En cas de suspicion, cette dernière substance, interdite d'emploi, peut toutefois être l'objet de contrôles plus sévères et plus fins, basés sur des méthodes physico-chimiques spécifiques.

Les tests utilisant *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* détectent avec une sensibilité satisfaisante les β-lactamines, les tétracyclines et les macrolides, plus difficilement les aminoglycosides, sulfamides et chloramphénicol [16].

Le test Arla, utilisant *Bacillus subtilis* est particulièrement sensible aux tétracyclines [7].

En tout cas, aucun test ne peut prétendre détecter toutes les catégories d'antibactériens avec la même sensibilité, ni respecter toutes les LMRs définies progressivement par l'UE [16]. Il semblerait même peu probable qu'un tel test existe un jour [7], [18].

## ↳ **En conclusion**

Les tests d'inhibiteurs microbiens sont indispensables pour pouvoir détecter d'éventuels résidus d'antibactériens dans un grand nombre d'échantillons de lait. Le choix parmi la multitude de tests disponibles dépend autant de l'aspect pratique : présence d'un kit, facilité de manipulation, que des substances recherchées *a priori* ou des performances attendues. Il faut cependant se

rappeler que malgré leur vaste spectre, aucun d'entre eux ne présente une sensibilité équivalente à toutes les familles d'antibactériens et ne peut donc respecter toutes les LMRs, variables d'une substance à l'autre, évoluant au fil des avancées de la réglementation, mais au final, toutes très faibles.

C'est pourquoi il est souhaitable de s'orienter vers des méthodes de confirmation pouvant pallier, au moins partiellement, ces défauts. De même, l'amélioration de la sensibilité des tests existants ou le développement de nouveaux tests restent d'actualité. Ils se doivent cependant d'être conformes à un cadre élaboré progressivement au sein des groupes d'experts FIL / ISO [18], normalisé depuis 1999 au niveau de la FIL, et en passe de l'être au niveau de l'ISO [11]. Cette norme donne une procédure uniforme d'évaluation et de validation, permettant notamment de pouvoir comparer les données issues d'essais et d'études différents.

Parallèlement, il est indispensable de veiller à un suivi attentif de l'évolution des pratiques thérapeutiques en médecine vétérinaire, et des pratiques en élevage pour pouvoir anticiper les probables résidus.

Remerciements à J.P. Moretain de l'AFSSA Fougères, H. Damour, directeur de Cevalait et P. Bouriot, producteur franc-comtois.

### Liste des abréviations / List of abbreviations

DJA : Dose journalière admissible / daily tolerable intake

FDA : Food and Drug Administration

FIL : Fédération Internationale de Laiterie / IDF : International Dairy Federation

ISO : International Standardization Organization

LMR : limite maximale de résidu / MRL : maximal residue limit

UE : Union Européenne / EU : European Union

## Bibliographie

- [1] arrêté du 2 septembre 1983. Méthodes officielles d'analyses relatives à la détection des antibiotiques et des sulfamides dans les laits destinés à l'alimentation humaine ou animale. JO du 6/10/1983, p 9089-9093
- [2] décision 91/180 de la Commission du 14/2/1991, arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait cru et du lait traité thermiquement. JOCE L 93 du 13/4/1991, p. 1-91
- [3] règlement n° 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990, établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. JOCE L 224 du 18/8/1990, p. 1-8
- [4] règlement n° 508/1999 de la Commission du 4 mars 1999, modifiant les annexes I à IV du règlement CEE n°2377/90. JOCE L 60 du 9/3/1999, p. 16-52
- [5] règlement n° 213/2001 de la Commission du 9 janvier 2001 portant modalités d'application du règlement (CE) n°1255/1999, en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers et modifiant les règlements (CE) n° 2771/1999 et (CE) n° 2799/1999. JOCE L 37 du 7/2/2001, p. 1-99
- [6] ABETE M.C., SQUADRONE S., GENTA E. Ricerca degli antibiotici nel latte : uso di un saggio microbiologico. Latte, 1999, V. 24, N. 3, p. 74-76
- [7] CARLSSON A. ; BJORCK L. The use of different microbial assays in combination with the Charm II test in the detection of antibiotic residues in herd milk. International Dairy Journal, 1992, V. 2, p. 109-119
- [8] FABRE J.M. ; MORETAIN J.P. ; ASCHER F. ; BROUILLET P. ; BERTHELOT X. Main causes of inhibitors in milk. A survey in one thousand french dairy farms. In Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Proceedings of the symposium : Kiel, 28-31/8/1995, IDF/FIL ref SI 9505, p. 27-31.
- [9] FIL-IDF (Ed .). Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. Bulletin de la FIL, 1991, n° 258, 99 pages.
- [10] FIL-IDF (Ed .). Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Proceedings of the symposium : Kiel, 28-31/8/1995. Bruxelles : FIL-IDF, 1995, ref SI 9505, 343 pages.
- [11] FIL-IDF : norme internationale 183 :1999 (provisoire) : Guide pour l'évaluation normalisée des tests d'inhibiteur microbien, 6 pages.
- [12] HEESCHEN W.H. Residues of antibiotics and sulfonamides in milk : significance and toxicological evaluation, legal situation within the European Community (EEC), and method-related activities of the International Dairy Federation (IDF). Bulletin of the IDF, 1993, N. 283, p. 3-12
- [13] MAYRA –MAKINEN A. The Valio T101 method (T101 test). Bulletin of the IDF, 1993, N. 283, p. 29-31
- [14] MULLER F.J. ; JONES A. BR-test and BRT-AS methods. Bulletin of the IDF, 1993, N. 283, p. 24-28
- [15] PACKAM W. ; BROOME M.C. ; LIMSOWTIN G.K.Y. ; ROGINSKI H. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. Australian Journal of Dairy Technology, 2001, V. 56, N. 1, p. 15-18
- [16] REYBROECK W. Evaluation of screening tests for the detection of antimicrobial residues in milk. In Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Proceedings of the symposium : Kiel, 28-31/8/1995, IDF/FIL ref SI 9505, p. 182-186.
- [17] SUHREN G. Experiences with an IDF-experimental study for the detection of penicillin and tetracycline applying routinely used methods. Bulletin of the IDF, 1993, N. 283, p. 15-19
- [18] SUHREN G. Possibilities and limitations of microbiological inhibitor tests. In Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Proceedings of the symposium : Kiel, 28-31/8/1995, IDF/FIL ref SI 9505, p. 159-171.