



Le contrôle des antibiotiques dans le lait de ferme : hier et aujourd'hui

Jean-Michel ROMNEE

Les antibiotiques dans le lait

Introduction



- **Quelques dates ...**
- **Les molécules ...**
- **La détection**
 - La détection microbiologique**
 - La détection rapide**
 - La détection physico-chimique**
- **La législation**
- **En Belgique ...**
- **Quelques chiffres ...**
- **Conclusions**



Les antibiotiques dans le lait

Quelques dates



Une histoire ...

Année	Événement
1929	Découverte de la pénicilline G
1935	Découverte de la sulfanilamide
1938	Utilisation de la sulfanilamide pour le traitement des mammites
1948	Utilisation de la pénicilline G pour le traitement des mammites
1951	Utilisation des antibiotiques comme additifs dans l'alimentation animale



Une histoire ...

Année	Événement
1952	Développement d'un test de recherche des inhibiteurs dans le lait : <i>Bacillus subtilis</i>
1961	Développement du Br Test utilisant <i>Bacillus stearothermophilus</i>
1975	Développement du Delvotest P [®] utilisant <i>Bacillus stearothermophilus</i>
1978	Développement du Penzym [®] - test enzymatique



Une histoire ...

Année	Événement
1981	Textes européens sur la pharmacie vétérinaire (Directives 81/851 et 81/852)
1990	Règlement européen sur les LMR (Règlement 2377/90)
1991	Proposition d'une méthode de détection utilisant <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Décision 91/180/CEE)
1992	Texte sur l'hygiène dans la filière lait (Directive 92/46



Une histoire ...

Année	Événement
1994	Passage à la méthode de diffusion en tube et/ou Delvotest® SP
1996	Texte relatif au plan de contrôle (Directive 96/23/CEE)
1997	Premier monitoring
2000	Texte relatif aux performances analytiques des méthodes mises en œuvres (Draft SANCO/1085/2000)



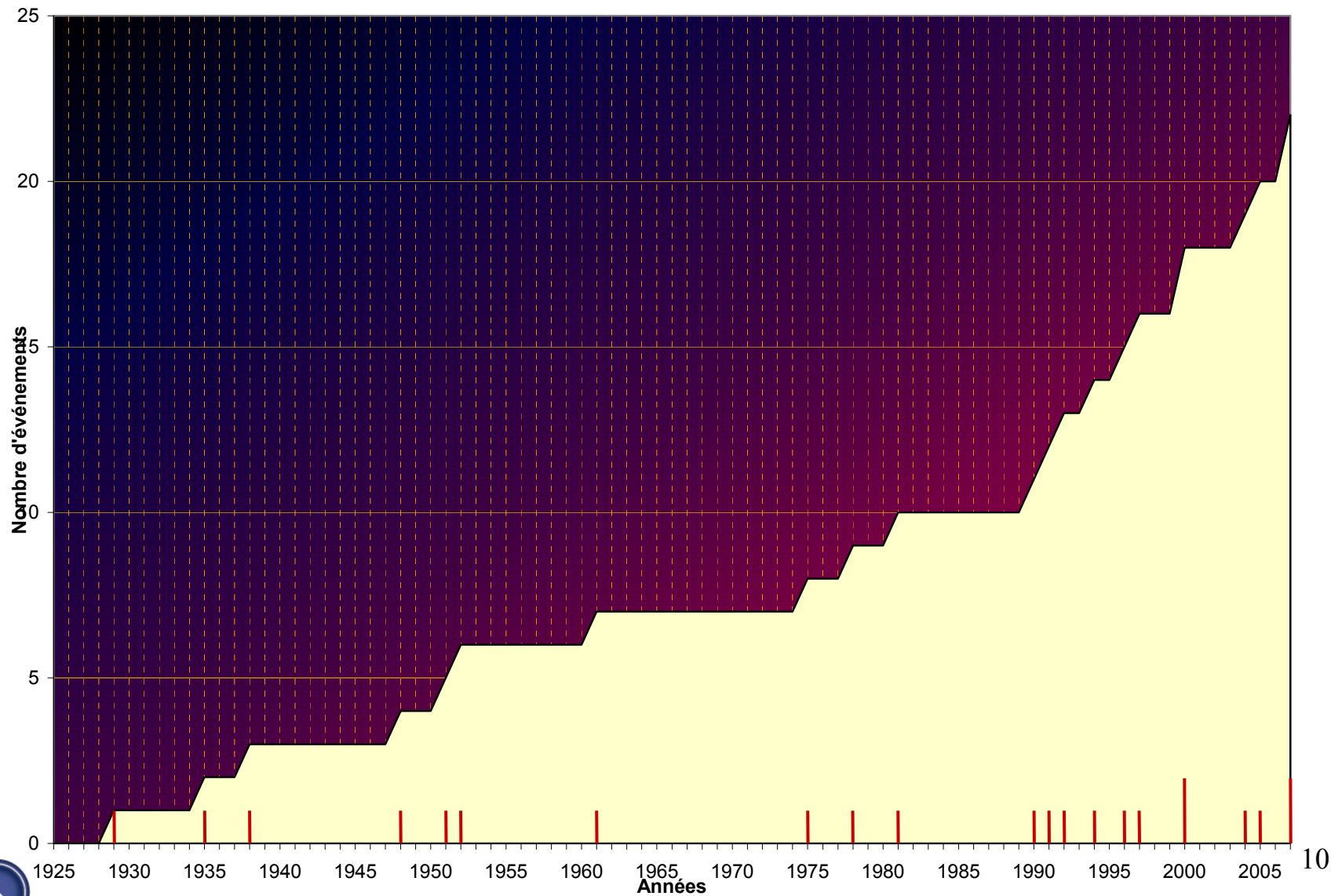
Une histoire ...

Année	Événement
2000	Uniformisation : Delvotest® MCS sur toutes les livraisons
2004	Abandon de la lecture visuelle au profit de la lecture réflectométrique
2005	Utilisation du Copan Milk Test
2007	Modification de la méthode de confirmation - introduction des tests rapides
2007	Création du LNR Lait et Produits laitiers



Quelques dates – 6

Une histoire ...

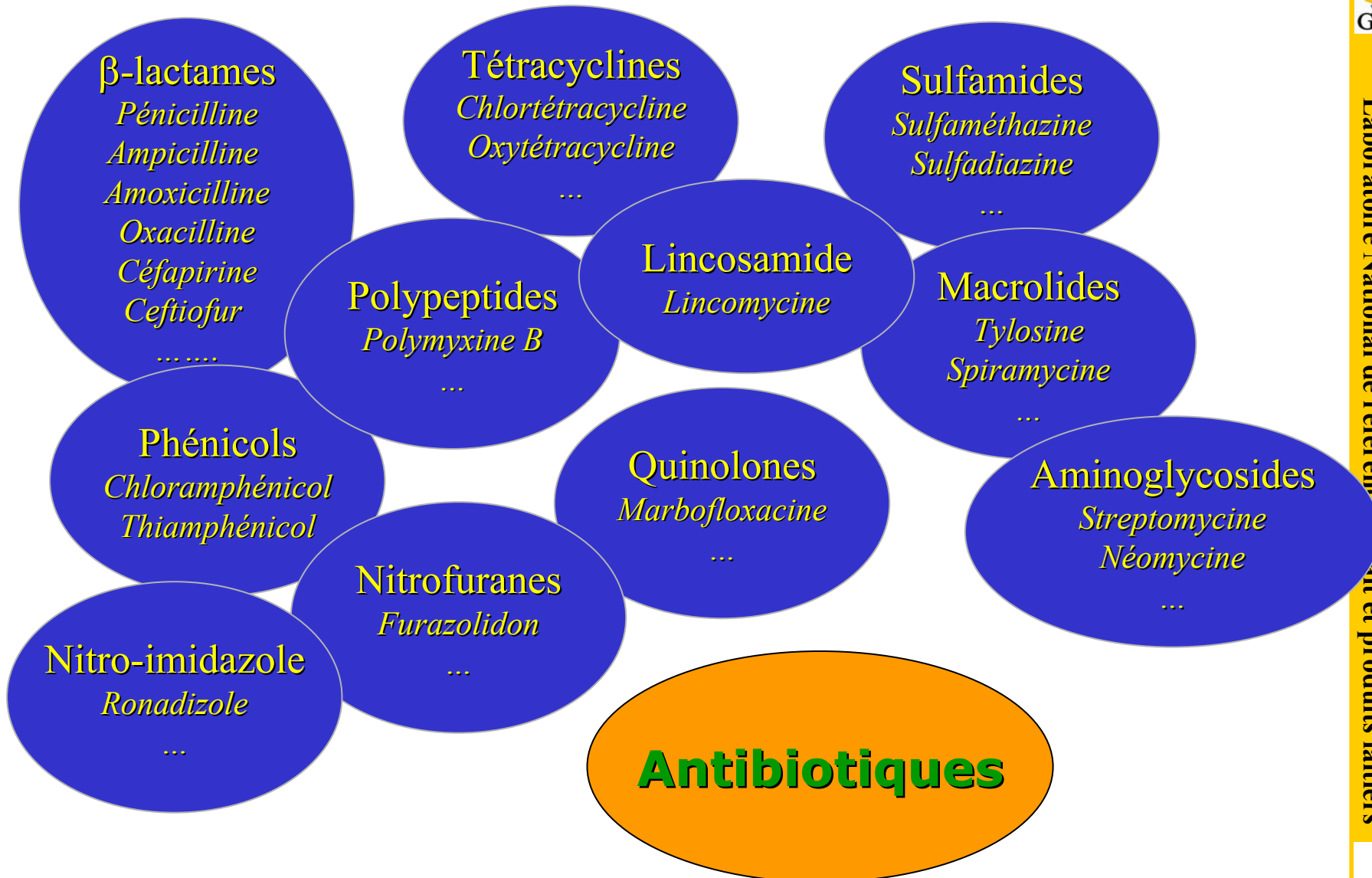


Les antibiotiques dans le lait

Les molécules



Les molécules – 1



Et bien d'autres encore ...
Environ 70 molécules concernées ...



Les antibiotiques dans le lait

La détection ...



Quels outils ?

Pour quoi faire ?

Trois modes de détection

- **Microbiologique**
- **Rapide**
- **Physico-chimique**



lait individuel

lait de tank

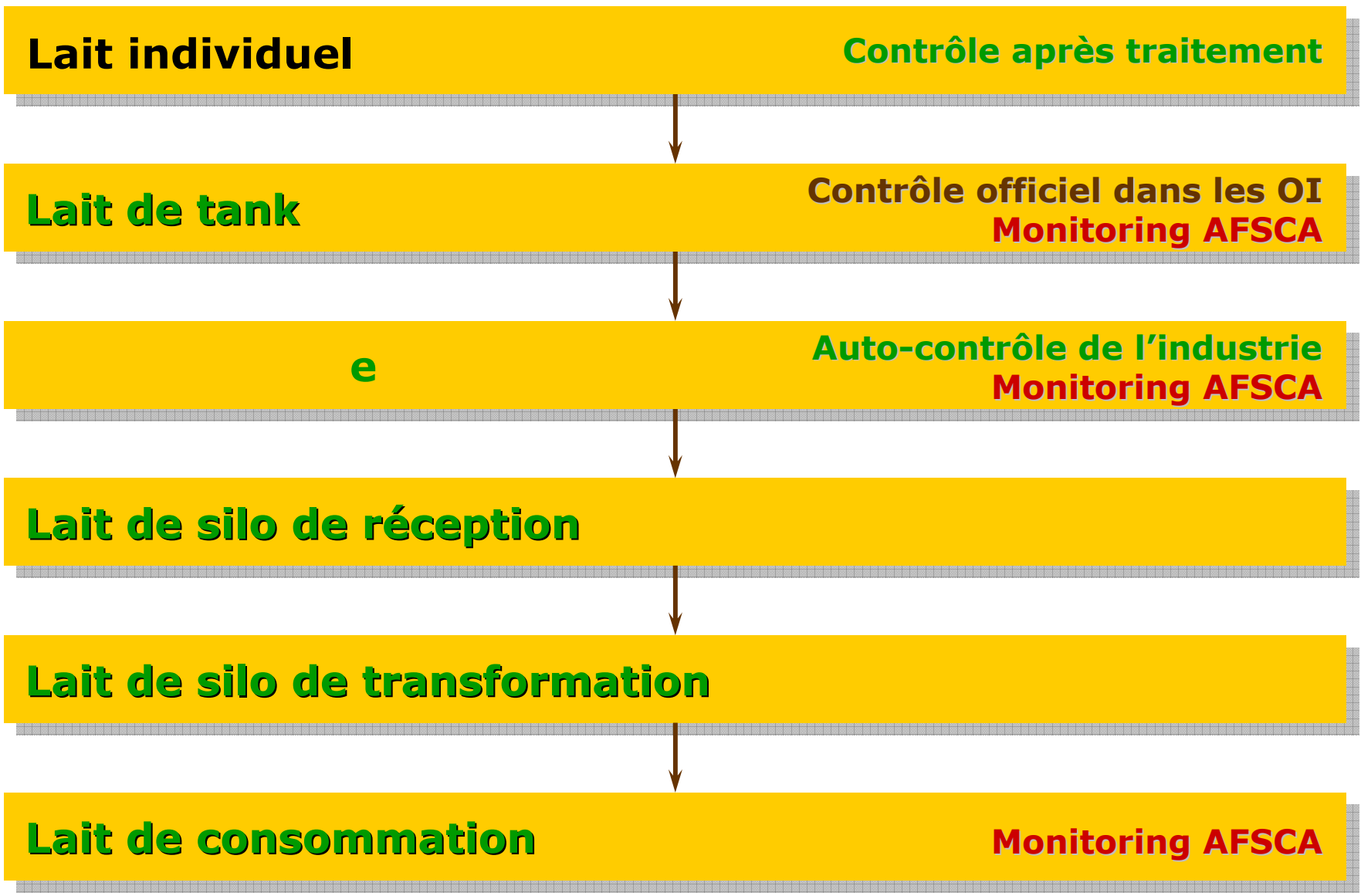
e

Industrie – lait de silo de réception

Industrie – lait de silo de transformation

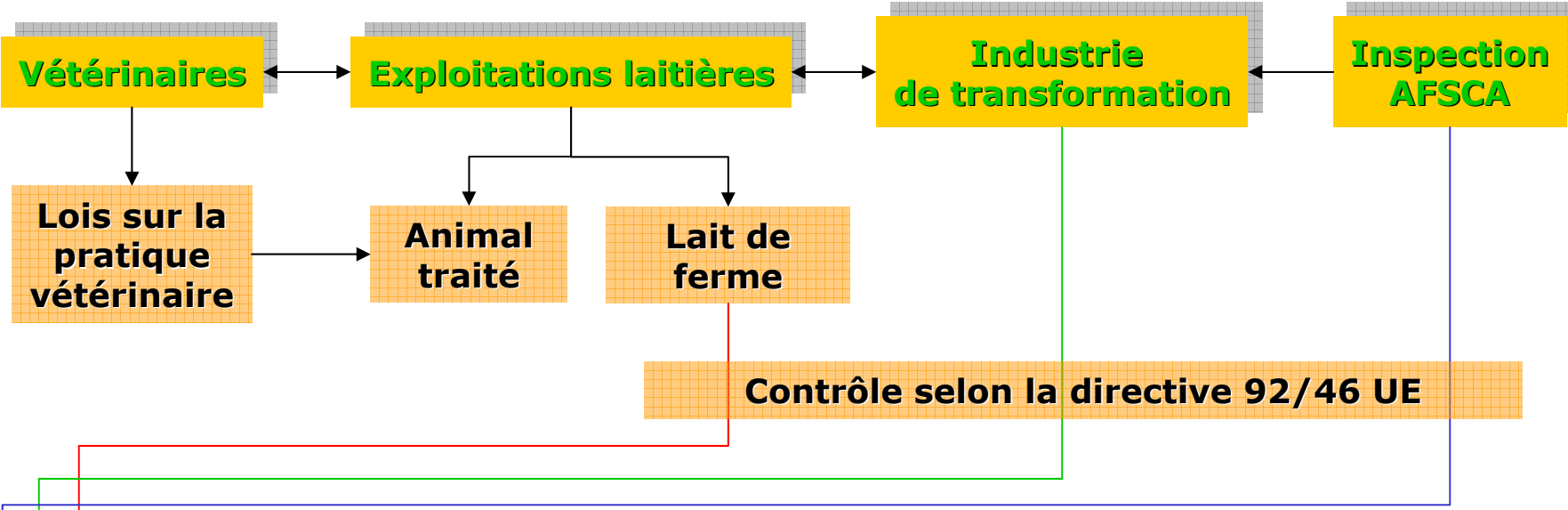
Distribution – lait de consommation





Nationale Referentie Laboratoria - Melk en Zuivelproducten
Laboratoire National de référence – Lait et produits laitiers





- **Contrôle de la présence d'inhibiteurs**
- **Résultat : réduction de prix dans le cas d'un résultat positif à un test d'inhibition**

- **S'assure du respect de LMR (respect de 2377/90 UE)**
- **Prévoit une tolérance zéro pour les composés interdits (chloramphénicol, par exemple)**
- **Objectif : respect des LMRs (sécurité technologique)**

- **S'assure du respect de LMR (respect de 2377/90 UE) – vérification qualitative et quantitative**
- **Résultat : un dépassement des LMRS conduit à une pénalisation**



Niveau I

**Exploitations
laitières**

Période de retrait

**Tests d'inhibition
microbiologique**

Niveau II

**Industrie de
transformation**

Auto contrôles

**Tests d'inhibition
microbiologique**

**Tests qualitatifs
(mise en évidence
de groupes)**

Niveau III

**Inspection
AFSCA**

**Monitoring
Assurer le suivi des
autos contrôles de
l'industrie**

**Tests d'inhibition
microbiologique**

**Tests qualitatifs
(mise en évidence
de groupes)**

**Identification et
quantification
(LMR)**



Les antibiotiques dans le lait

... microbiologique



Basée sur l'inhibition de la croissance bactérienne

Mise en évidence par différents paramètres :

- La zone d'inhibition



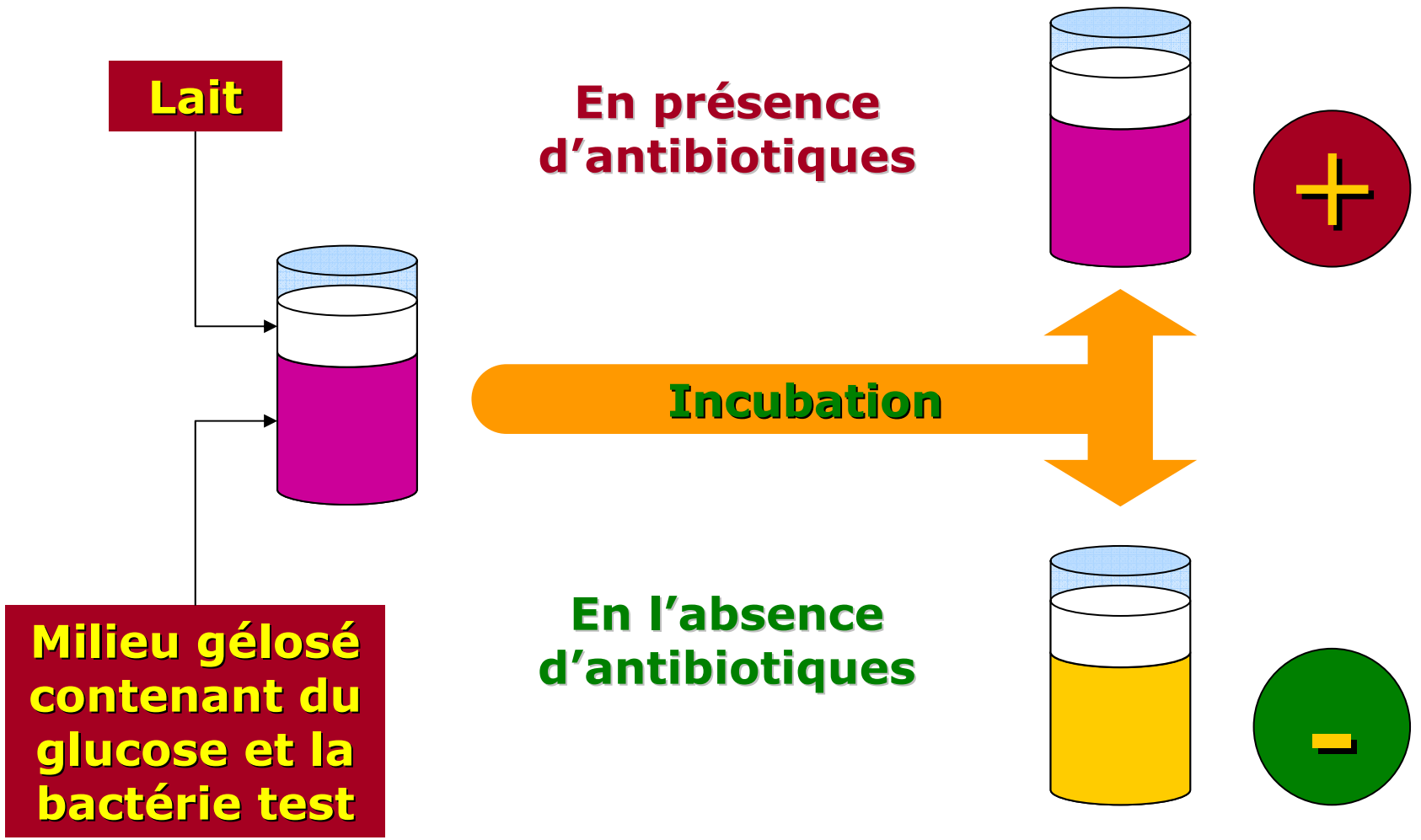
- La production d'acide (indicateur de pH)



- La coagulation
- L'activité (ATP ou activité enzymatique)
- La production de lumière (Valio T102®)



Principe des tests microbiologiques les plus courants



Avantages

- **Simple**
- **Nécessitent peu d'équipement**
- **Nécessitent un volume réduit d'échantillon**
- **Présentent un large spectre de détection**
- **Relativement sensibles**
- **Relativement rapides**
- **Peu coûteux**
- **Possibilité d'avoir une information sur le groupe**
 - *En choisissant le micro-organisme*
 - *En ajoutant des réactifs*
- **Possibilité d'automatisation**
- **Bien adaptés pour les tests de screening**

Désavantages

- **Lecture de la coloration parfois subjective**
- **Interférences possibles**
 - *Non spécifiques aux antimicrobiens*
 - *Microflore*
- **Trop lents pour être utilisés à l'entrée d'usine**
- **Non spécifiques**
- **Non quantitatifs**
- **Certaines substances peu ou pas décelées**
 - *Chloramphénicol – nitrofuranes – nitro-imidazoles*
- **La sensibilité dépend des conditions de la souche test**

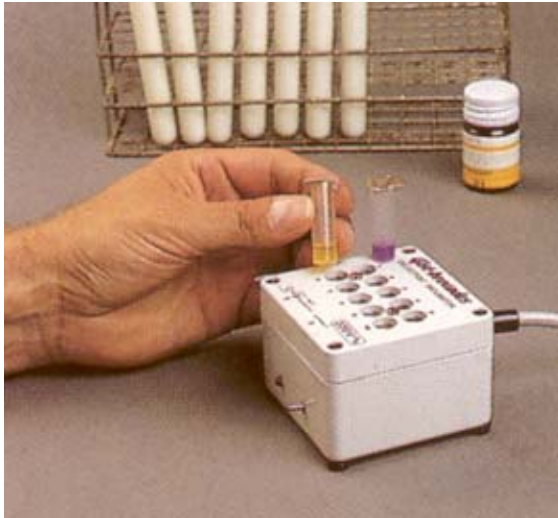


Quelques exemples

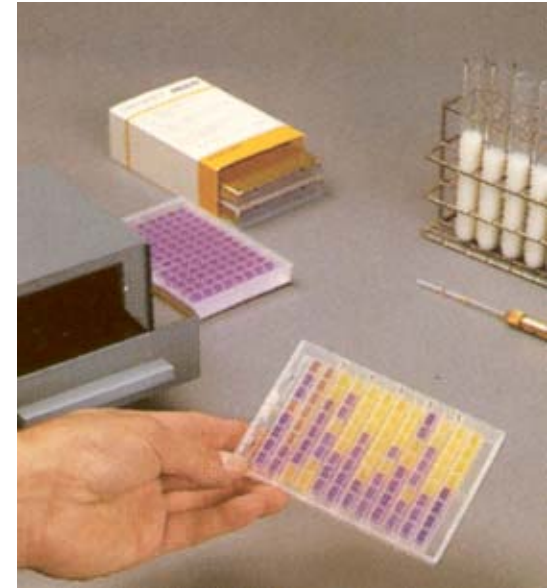
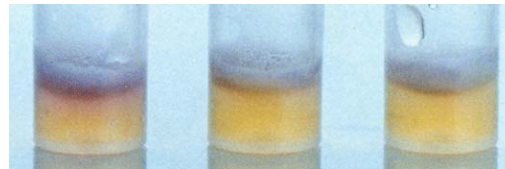
- **Le Delvotest[®] P – le Delvotest[®] SP – le Delvotest[®] MCS**
(*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*)
- **Le Copan[®] Milk Test**
(*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*)
- **Le Valio T101[®]**
(*Streptococcus thermophilus*)



Exemple de tests microbiologiques : le Delvotest SP



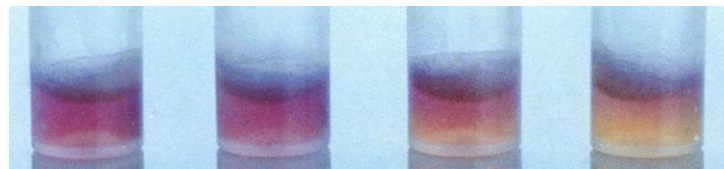
Conforme



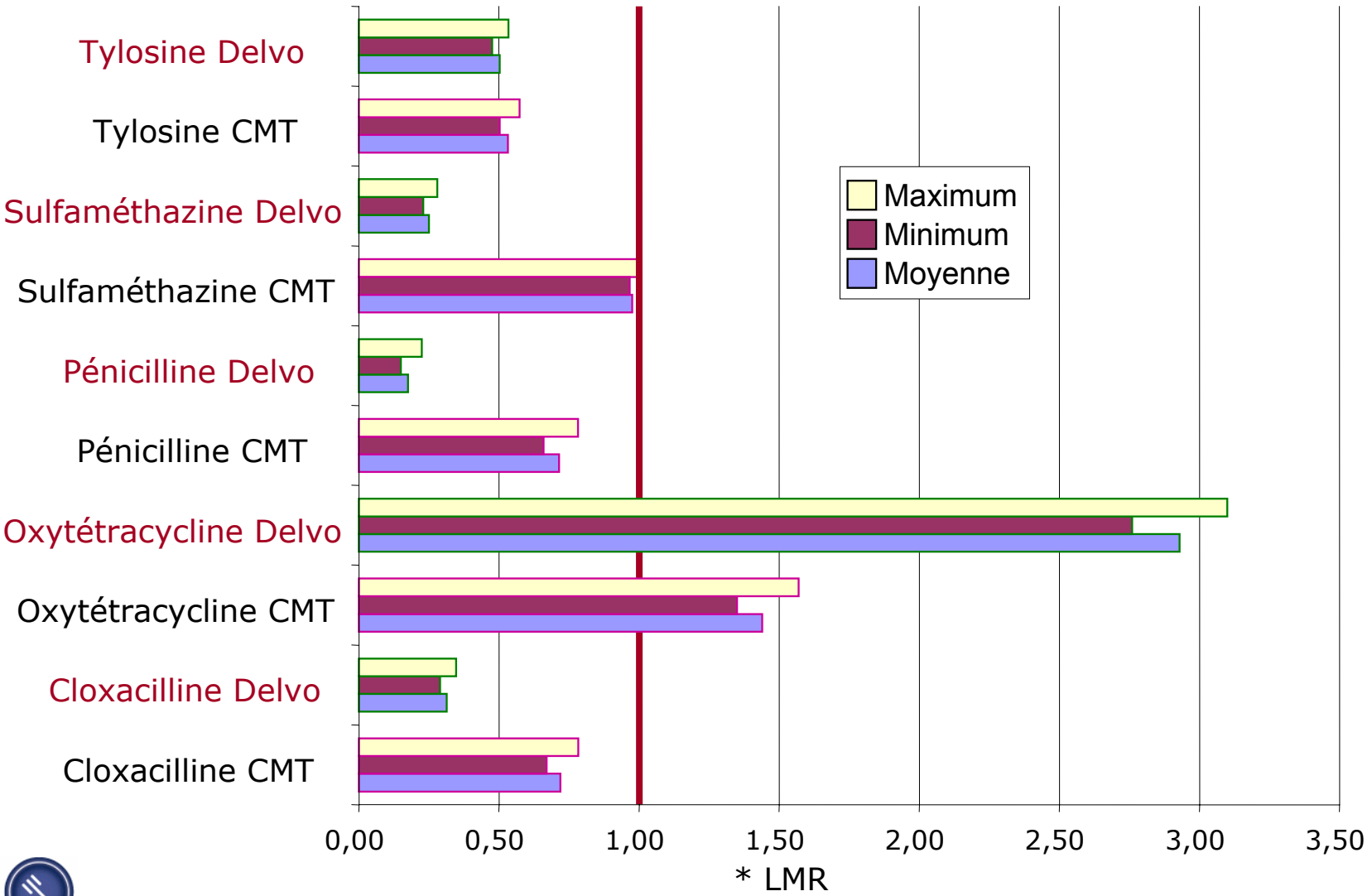
Version ferme

Non conforme

Version labo



Comparaison de la sensibilité du Delvotest[®] MCS et du Copan[®] Milk Test pour 5 antibiotiques



Les antibiotiques dans le lait

... rapide



Basée sur une reconnaissance spécifique de l'antibiotique

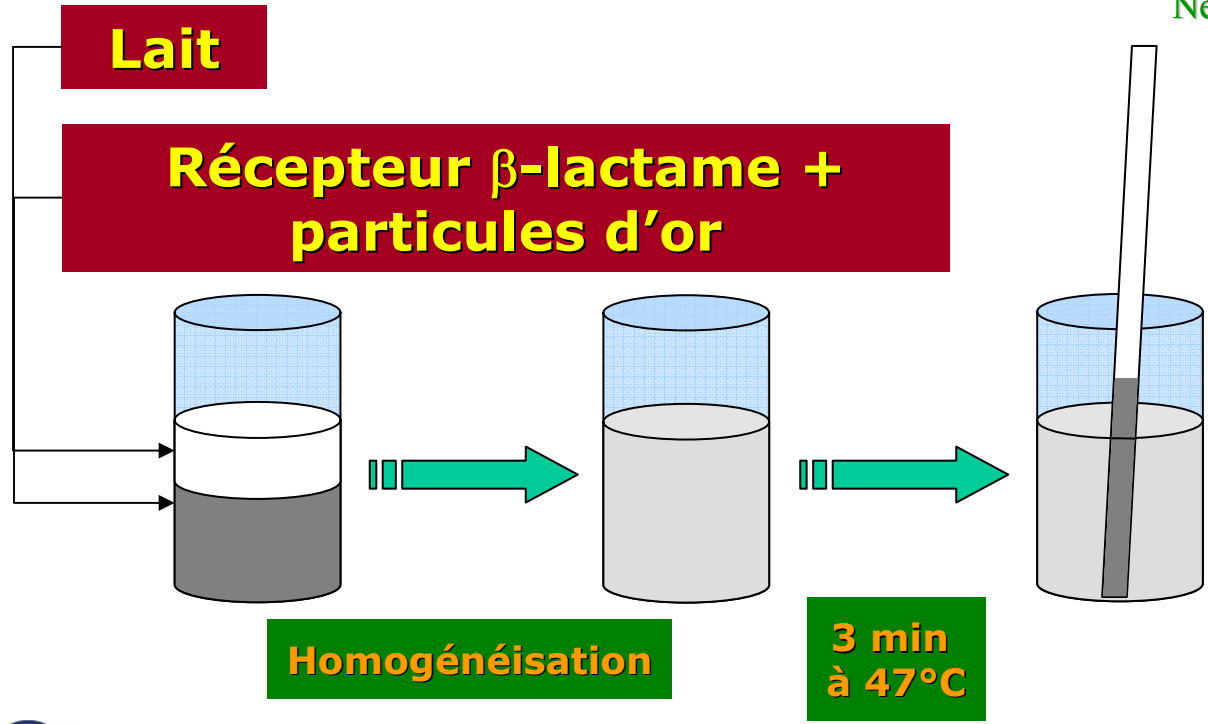
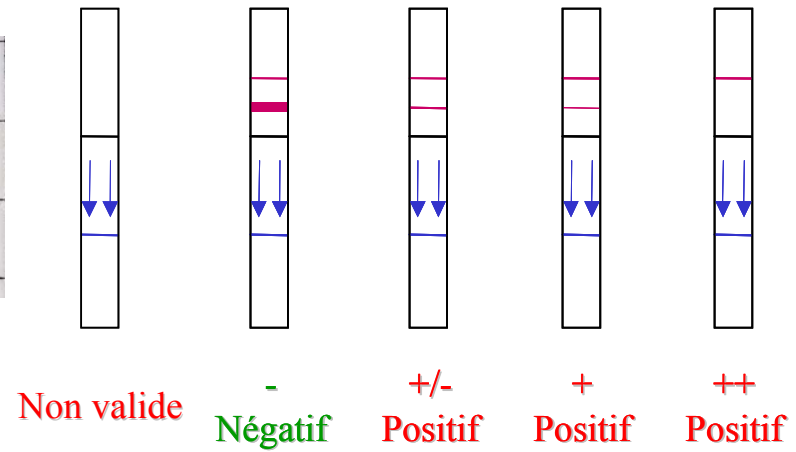
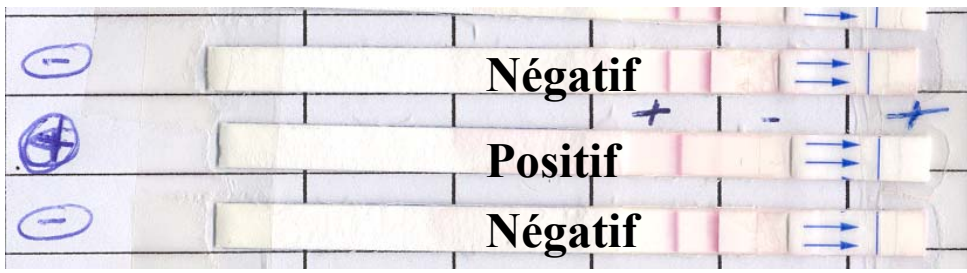
Mise en évidence par différents paramètres :

- **Une réaction de type immuno-enzymatique**
- **Une réaction enzymatique**
- **Un récepteur test**



La détection rapide – 2

Beta Star®

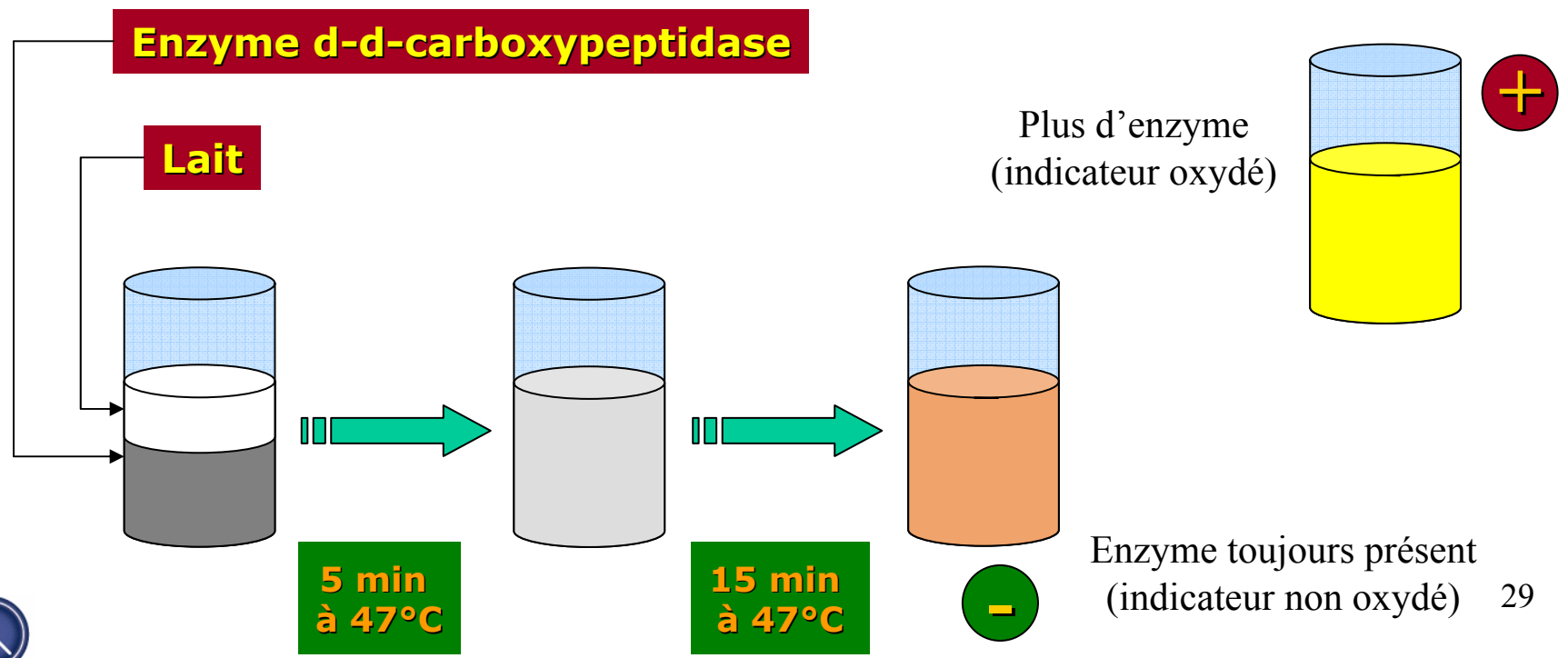
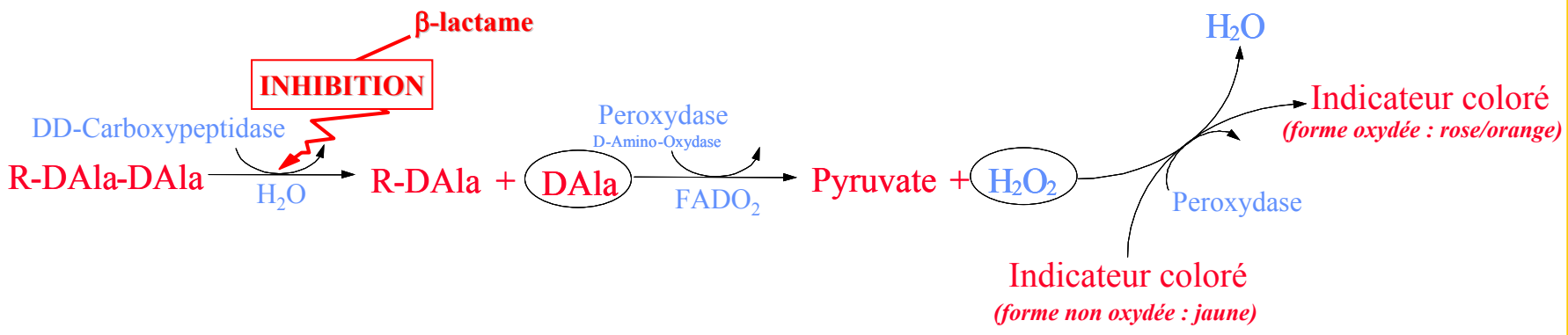


Migration du mélange
lait-récepteur et
apparition de bandes
colorées (2 min)

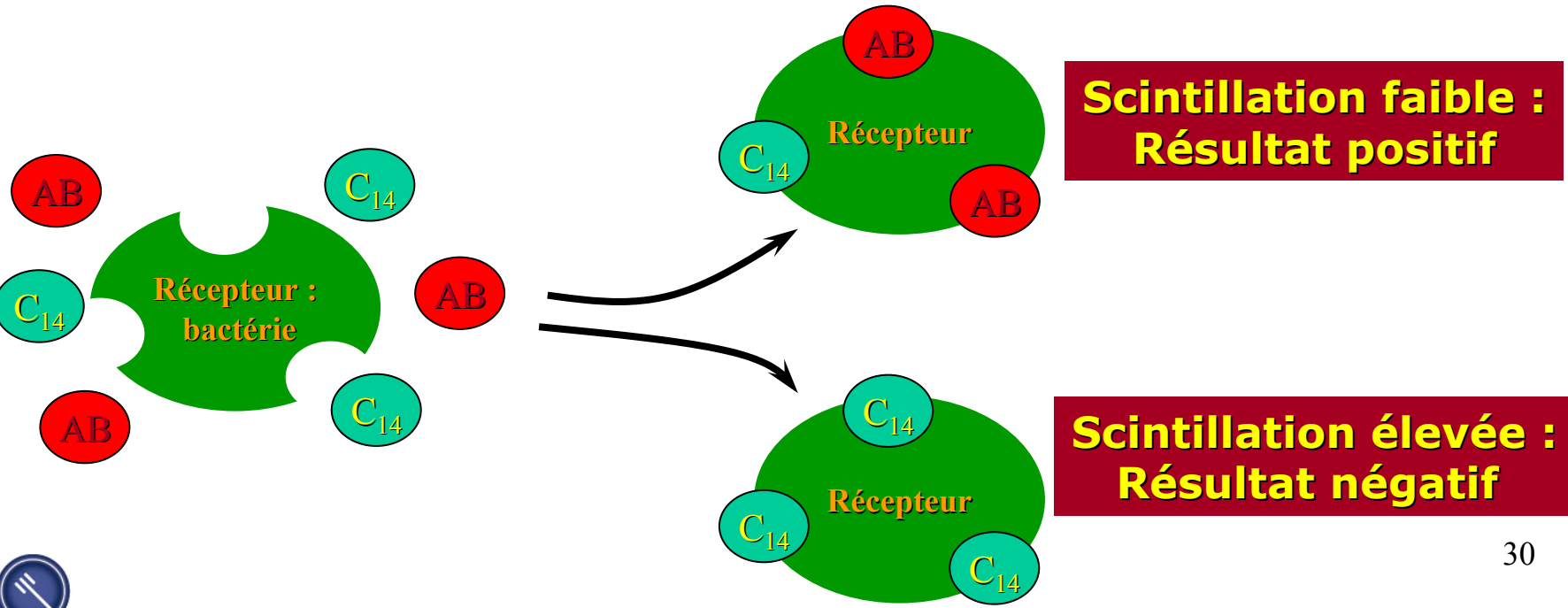
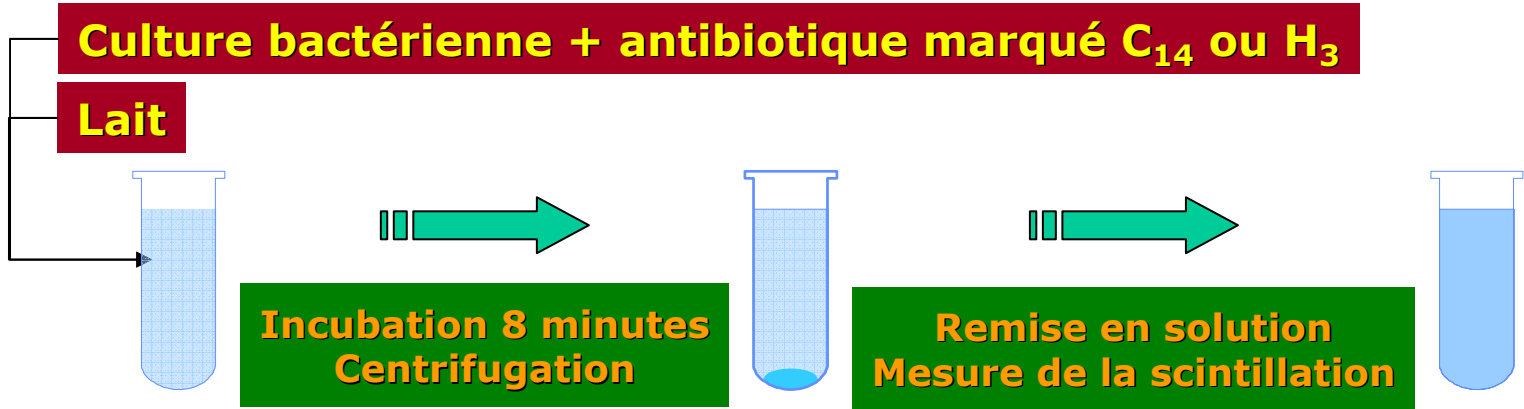


La détection rapide – 3

Penzym®



Charm Test II®



Avantages

- **Spécifiques**
- **Sensibles**
- **Applicables sur différentes matrices**
- **Semi-quantitatifs**
- **Résultats d'analyse rapidement obtenus**
- **Bien adaptés pour être utilisés à l'entrée d'usine**

Désavantages

- **Coût**
- **Manipulations plus importantes que les tests microbiologiques**
- **Spécificité**
- **Sensibilité**
- **Réactions croisées (résultats « faux positifs »)**
- **Effets de matrice possibles (nature de l'échantillon)**
- **Anticorps pas toujours disponibles**



Quelques exemples

- **Le BetaStar[®] 25**
- **Le Snap Betalactamine[®] - Le Snap Tétracycline[®]**
- **Le Penzym[®]**
- **Le Charm Test II[®] - Le Rosa Betalactame – Tétracycline**
- **Le Delvo X Press TM BL[®]**



Les antibiotiques dans le lait

... physico-chimique



Dans le cadre des contrôles sur les résidus de médicaments vétérinaires effectués en application de la directive 96/23, un lait est impropre à la consommation dans trois cas :

- 1. Lorsque la concentration mesurée est supérieure à la limite maximale de résidus, pour une substance ayant une limite maximale de résidus dans le lait;**
- 2. Lorsque des substances n'ayant pas de limites maximales de résidus fixées dans le lait sont mises en évidence, ce qui signifie l'utilisation de médicaments en dehors du résumé des caractéristiques du produit;**
- 3. Lorsque des substances listées en annexe IV du règlement 2377/90 sont mises en évidence, ce qui signifie l'utilisation de substances interdites chez l'animal.**



L'application de la directive 96/23 sur les limites maximales de résidus (LMR) est un défi pour les analystes ...



Dans les années 80

Développement des méthodes physico-chimiques grâce au progrès de l'électronique et de l'informatique

- **HPLC de plus en plus performant (système de pompe mais aussi les détecteurs qui y sont associés : UV-DAD, fluorescence, ...)**
- **Nombreuses méthodes mises au point pour différentes familles de molécules (tétracyclines, betalactames, sulfamides, macrolides, quinolones, chloramphénicol)**
- **Méthodes de plus en plus complexes pour les molécules n'absorbant pas ou faiblement dans l'UV (dérivatisation pré ou post colonne pour greffer des groupements chromophores)**



Dans les années 80

Développement des méthodes physico-chimiques grâce au progrès de l'électronique et de l'informatique

Limitations de ces développements

- **Autant de méthodes que de familles d'antibiotiques et nécessité de tests microbiologiques d'orientation**
- **Critères d'identification insuffisants pour confirmer la présence d'une substance si utilisation d'une seule longueur d'onde – nécessité de la prise d'un spectre UV grâce à un détecteur à barette de diodes**



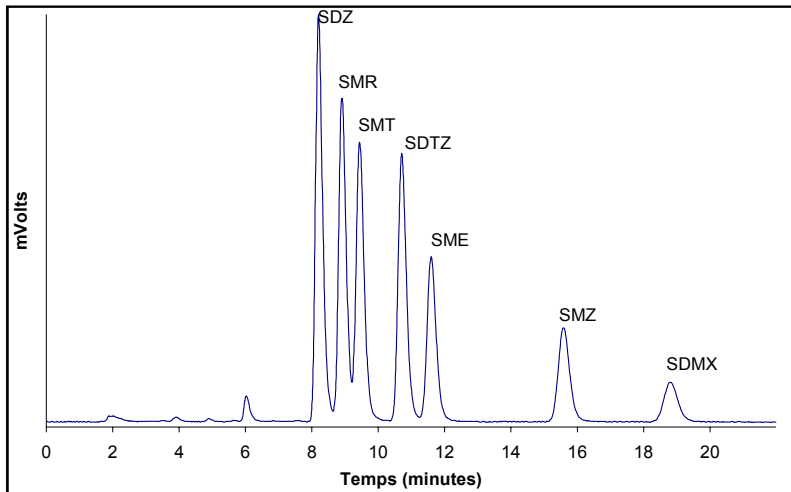
Dans les années 90

Apparition du couplage HPLC avec les détecteurs de masse de type « Quadripôle »

- **Combinaison du pouvoir de séparation de la chromatographie liquide et de l'information structurale générée par le spectromètre de masse**
- **Premiers couplages de type « Thermospray » ou « Particle beam » limités à quelques familles d'antibiotiques à polarité compatible avec les conditions chromatographiques**
- **Sources d'ionisation à pression atmosphérique « Electrospray » et « Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) » : élargissement du spectre d'ionisation**
- **Spectrométrie de masse en tandem (LC-MSMS)**



Schématiquement ... la détection analytique devient



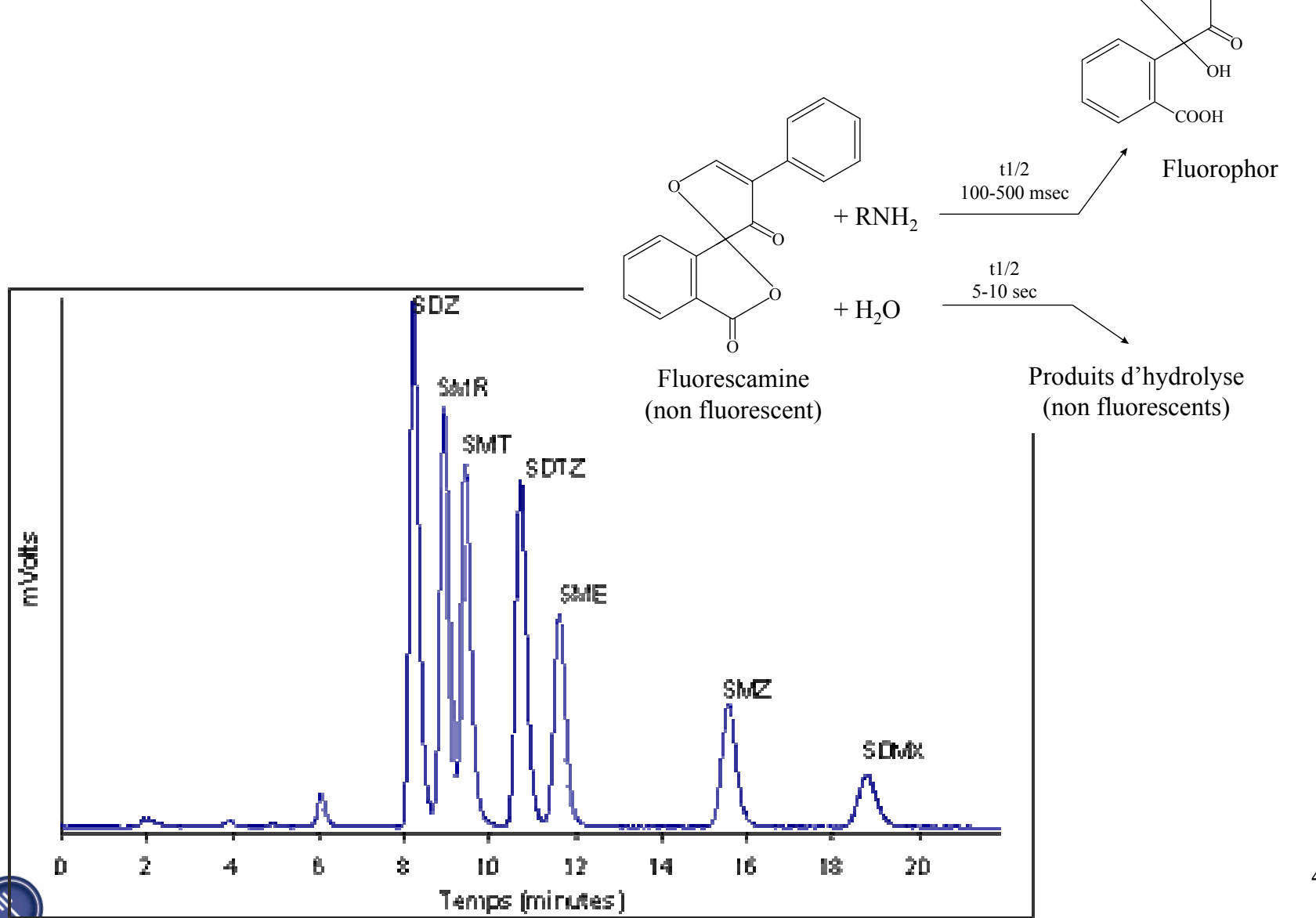
Injection

(Dérivatisation)

Purification

Extraction

Détection de sulfamides par fluorescence



Elimination des antibiotiques dans le lait

Dosage de la sulfaméthazine dans le lait après traitement intra-utérin au Sulfaphénicol®

Pathologie : métrite

Vaches traitées : 4

Traitement : 1 * 75 ml de Sulfaphénicol®

2 * 75 ml de Sulfaphénicol® (6 jours
d'intervalle)

Dose recommandée : 30 à 50 ml dans l'utérus

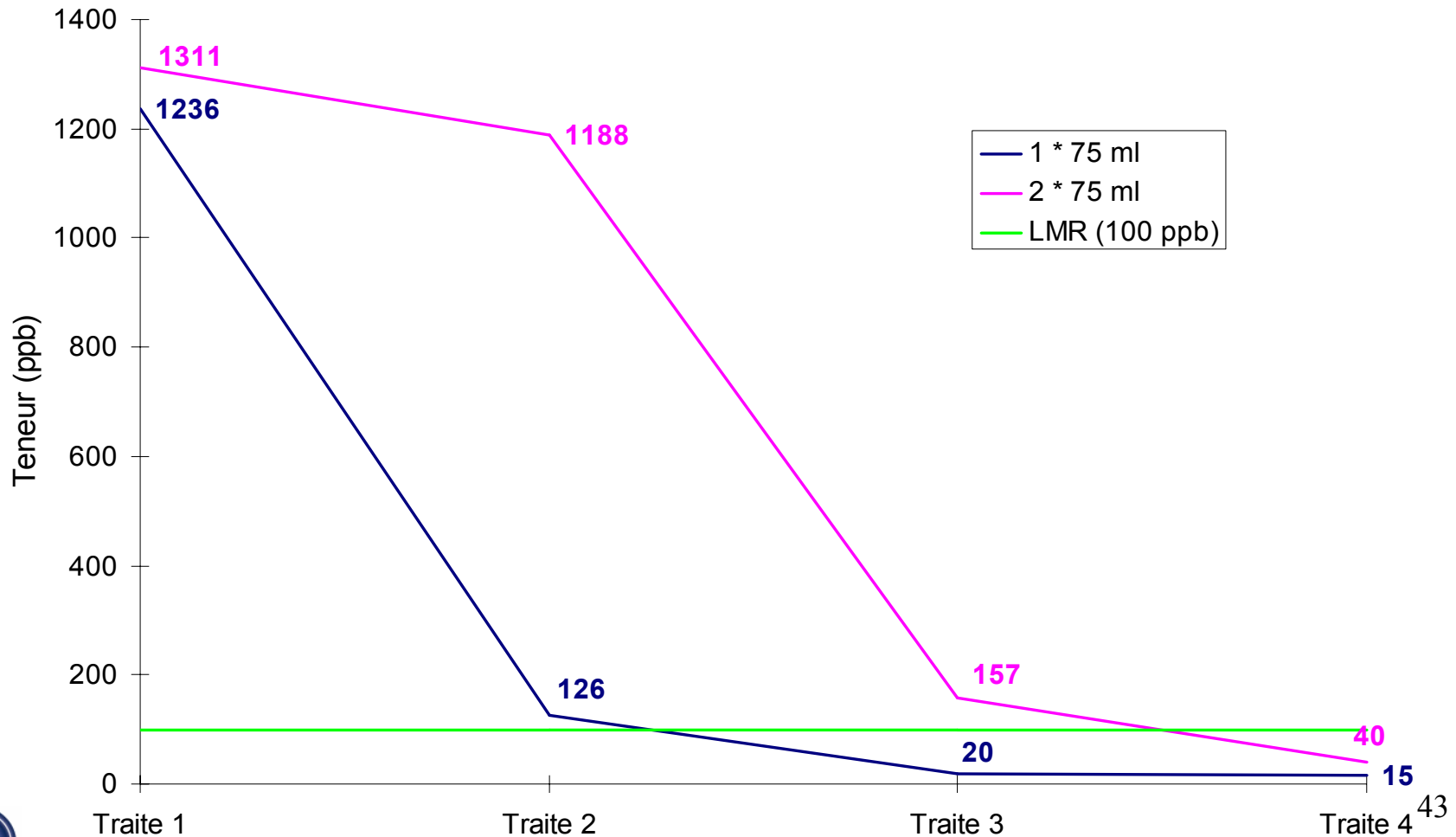
Composition : par ml : 100 mg de sulfadimidine
5 mg de chloramphénicol

Délai préconisé : aucune indication (*Compendium
Médicaments Vétérinaires 1993*)



Elimination des antibiotiques dans le lait

Dosage de la sulfaméthazine dans le lait après traitement intra-utérin au Sulfaphénicol®



Avantages

- **Temps de préparation**
- **Multi résidus**
- **Multi matrices**
- **Fiabilité**

Désavantages

- **Investissement élevé**
- **Compétences techniques**



Les antibiotiques dans le lait

La législation



Quelques textes européens de base (modifications ultérieures ou globalisation à intégrer) :

- **Règlement (CEE) n°2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale**
- **Décision 91/180/CEE de la Commission arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait cru et du lait traité thermiquement**
- **Directive 92/46/CEE du Conseil arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait**
- **Directive 96/23**



Règlement (CEE) n°2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale

4 classes de substances :

Annexe I : LMR définitives

Annexe II : pas de LMR nécessaires

Annexe III : LMR provisoires

Annexe IV : pas de LMR possibles, donc interdits

Pour être utilisables, les antibiotiques doivent appartenir à une des trois premières classes.



Liste des substances pharmacologiquement actives pour lesquelles des limites maximales de résidus ont été fixées

1. Médicaments anti-infectieux

1.1. Agents chimiothérapeutiques

1.1.1. Sulfamides

Substances pharmacologiquement active	Résidu marqueur	Espèces animales	LMR	Denrées cibles	Autres dispositions
Toutes les substances du groupe des sulfamides	Substance parentale	Toutes les espèces productrices d'aliments	100 µg/kg	Muscles, foie, reins, tissus adipeux	(1)

1.2. Antibiotiques

1.2.1. Pénicillines

Substances pharmacologiquement active	Résidu marqueur	Espèces animales	LMR	Denrées cibles	Autres dispositions
1.2.1.2. Ampicilline	Substance parentale	Toutes les espèces productrices d'aliments	50 µg/kg 4 µg/kg	Muscles, foie, reins, tissus adipeux Lait	
1.2.1.6. Dicloxacilline	Substance parentale	Toutes les espèces productrices d'aliments	300 µg/kg 30 µg/kg	Muscles, foie, reins, tissus adipeux Lait	

(1) : Le total combiné des résidus de toutes les substances ne doit pas dépasser 100 µg/kg



D'un point de vue législatif : le règlement 2377/90 – quelques exemples

Antibiotique	LMR (µg/kg)	Statut	Classe (annexe)
Benzylpénicilline (β-lactames)	4	définitif	I
Cloxacilline (β-lactames)	30	définitif	I
Oxytétracycline (tétracyclines)	100	définitif	I
Lincomycine (lincosamides)	150	définitif	I
Sulfaméthazine (sulfamides)	100	définitif	I
Spiramycine (macrolides)	200	définitif	I
Tylosine (macrolides)	50	définitif	I
Streptomycine (aminoglycosides)	200	définitif	I
Néomycine + framycétine (aminoglycosides)	1.500	définitif	I
Marbofloxacine (quinolones)	75	définitif	I
Nitrofuranes (furazolidon, ...)	interdit	définitif	IV
Nitro-imidazoles (ronidazol, metronidazol, ..)	interdit	définitif	IV
Dapson	interdit	définitif	IV
Chloramphénicol (phénicol)	interdit	définitif	IV

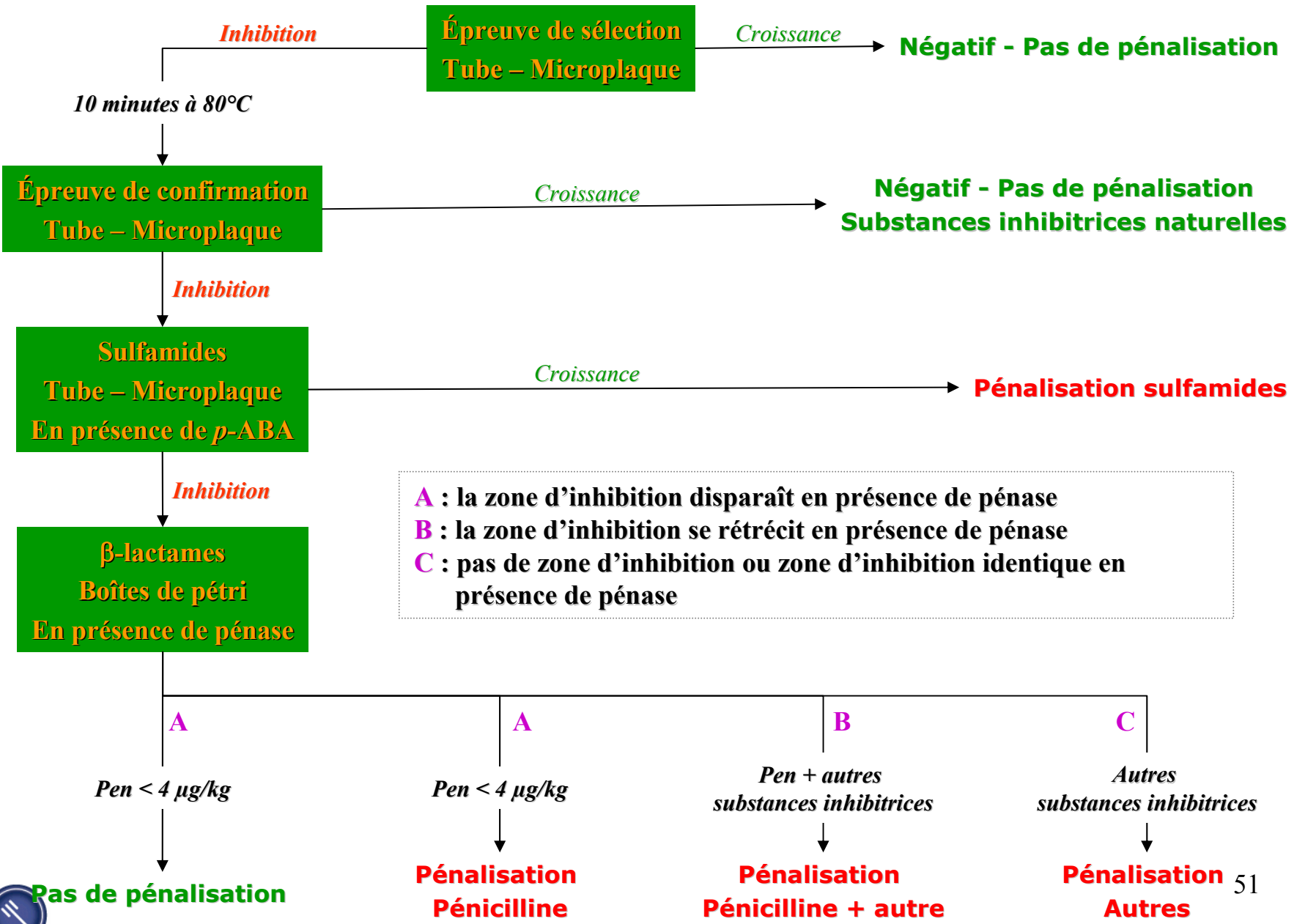


Les antibiotiques dans le lait

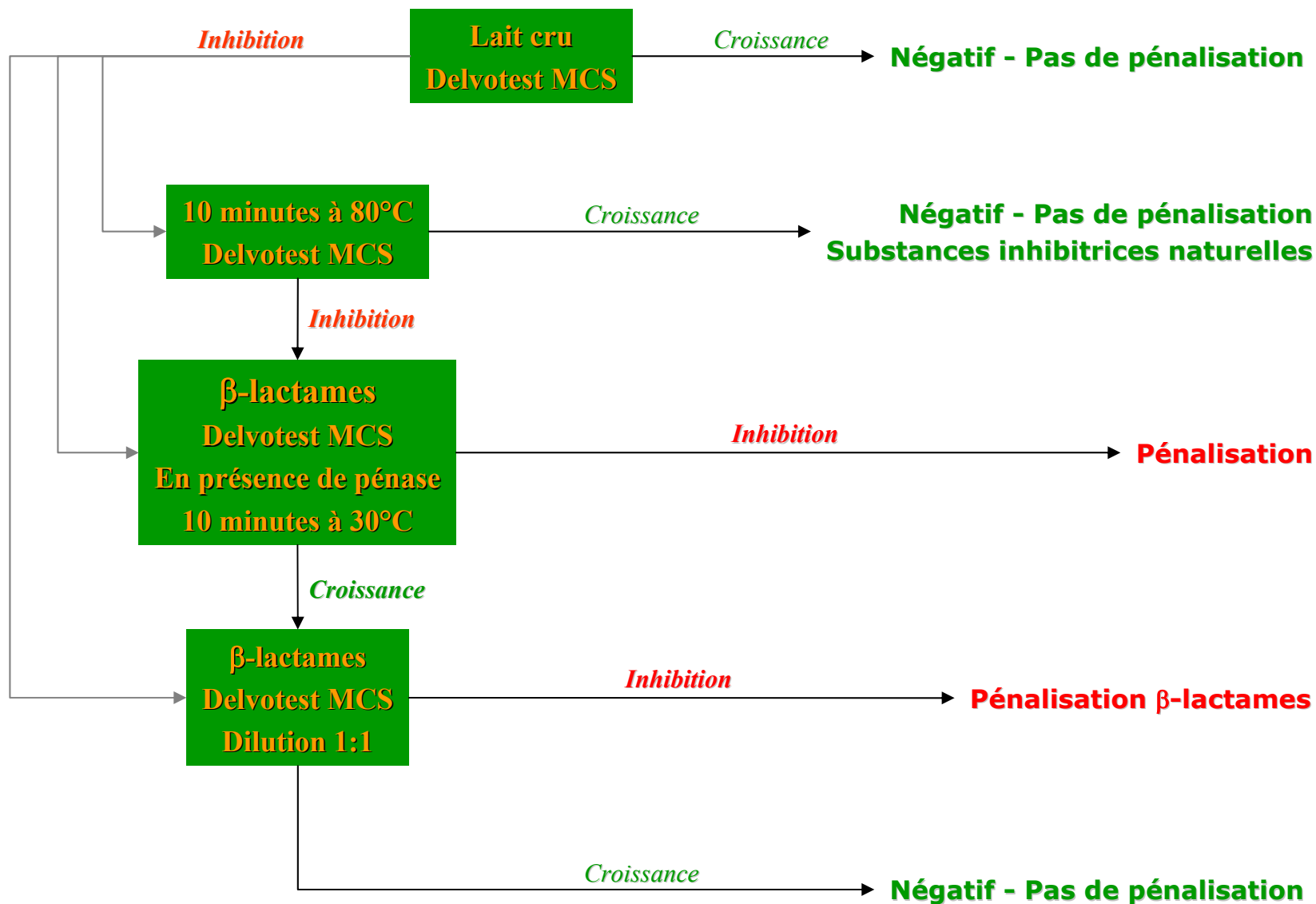
En Belgique



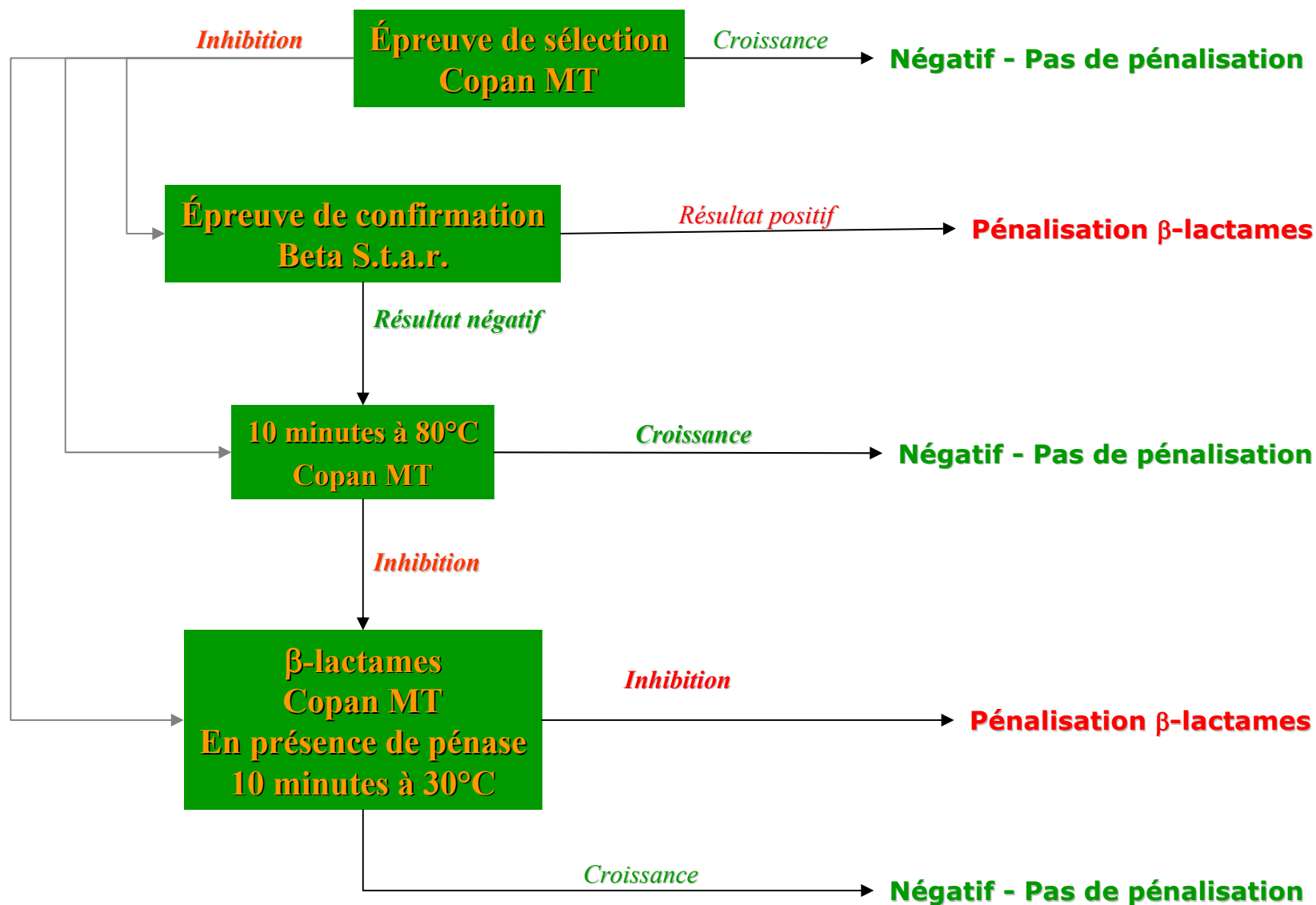
Substances inhibitrices – 03/10/1994



Substances inhibitrices – 06/10/2000



Substances inhibitrices – 01/01/2007



2 Contrôles mensuels

**Absence
Présence**

**Pas de pénalisation
1 BEF/litre sur les litres
du mois (2,5 €/100 litres)**

En cas de récurrence endéans les 6 mois (espacée de minimum 8 jours) :

**Doublement de la pénalisation (2 BEF/litre sur les
litres du mois – 5,0 €/100 litres)**



Substances inhibitrices – 2007

Chaque collecte

litres

Absence
Présence

Pas de pénalisation
29,75 €/100l sur les
du jour

En cas de résultat défavorable : avis spécifique envoyé à l'unité de production (arrêté royal du 21 décembre 2006 article 7 § 2, relatif au contrôle de la qualité du lait cru et à l'agrément des Organismes Interprofessionnels)

En cas de mauvais résultat : suspension de livraison – levée de la suspension après accompagnement de l'unité de production

En cas de 4 résultats positifs au cours de 12 mois : interdiction de livraison
Dans ce cas, à la demande de l'unité de production, visite d'un représentant de l'OI et de l'acheteur pour vérifier le suivi des mesures correctives proposées

Levée de l'interdiction lorsque le résultat est à nouveau favorable et que le rapport d'évaluation de la de la visite est positif.

(Arrêté ministériel portant approbation du document établi par les OI agréés en ce qui concerne les modalités du contrôle de la qualité du lait cru de vache – 1^{er} février 2007 – MB du 16 février 2007)

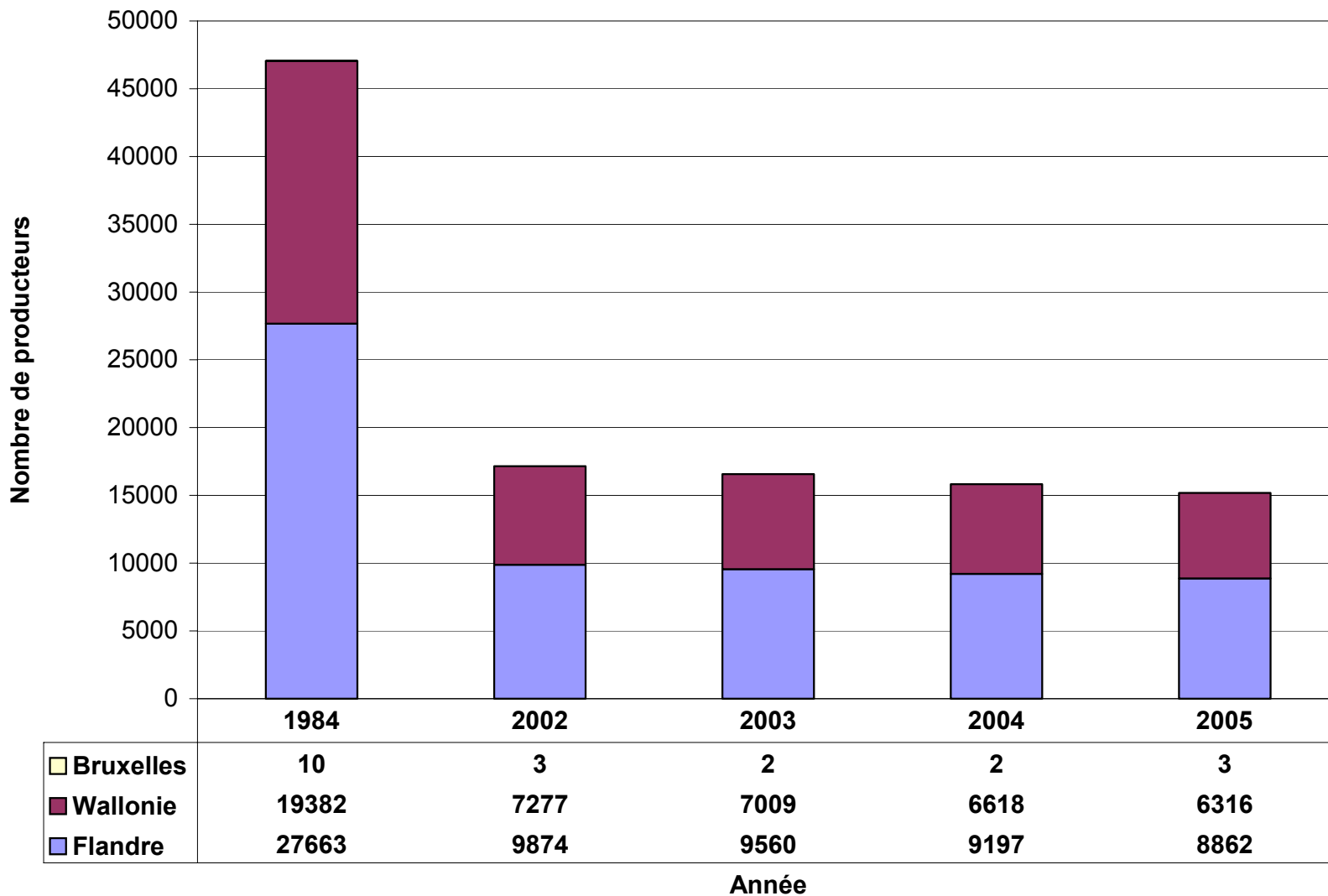


Les antibiotiques dans le lait

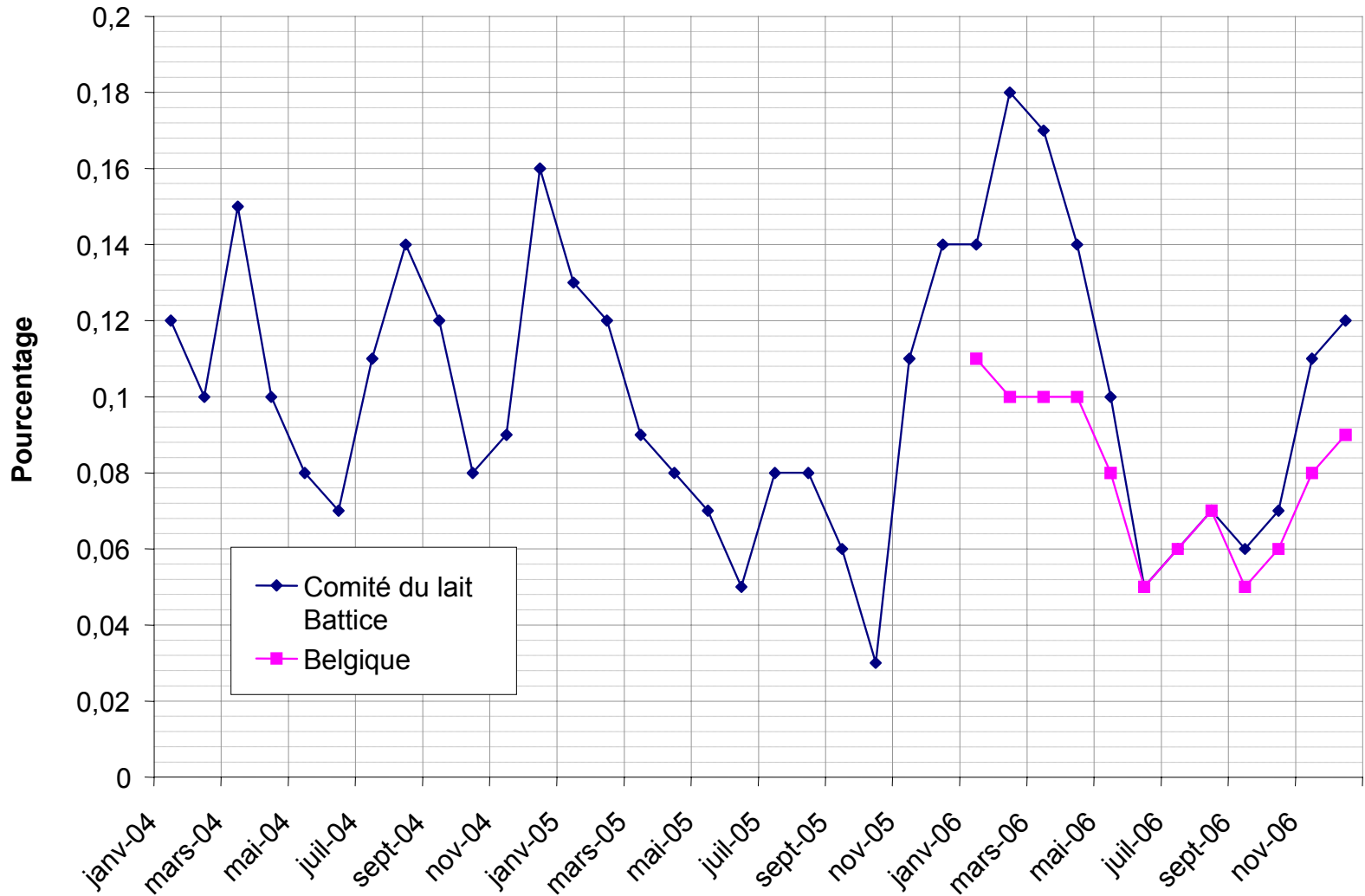
Quelques chiffres
provenant de 'OI de Battice



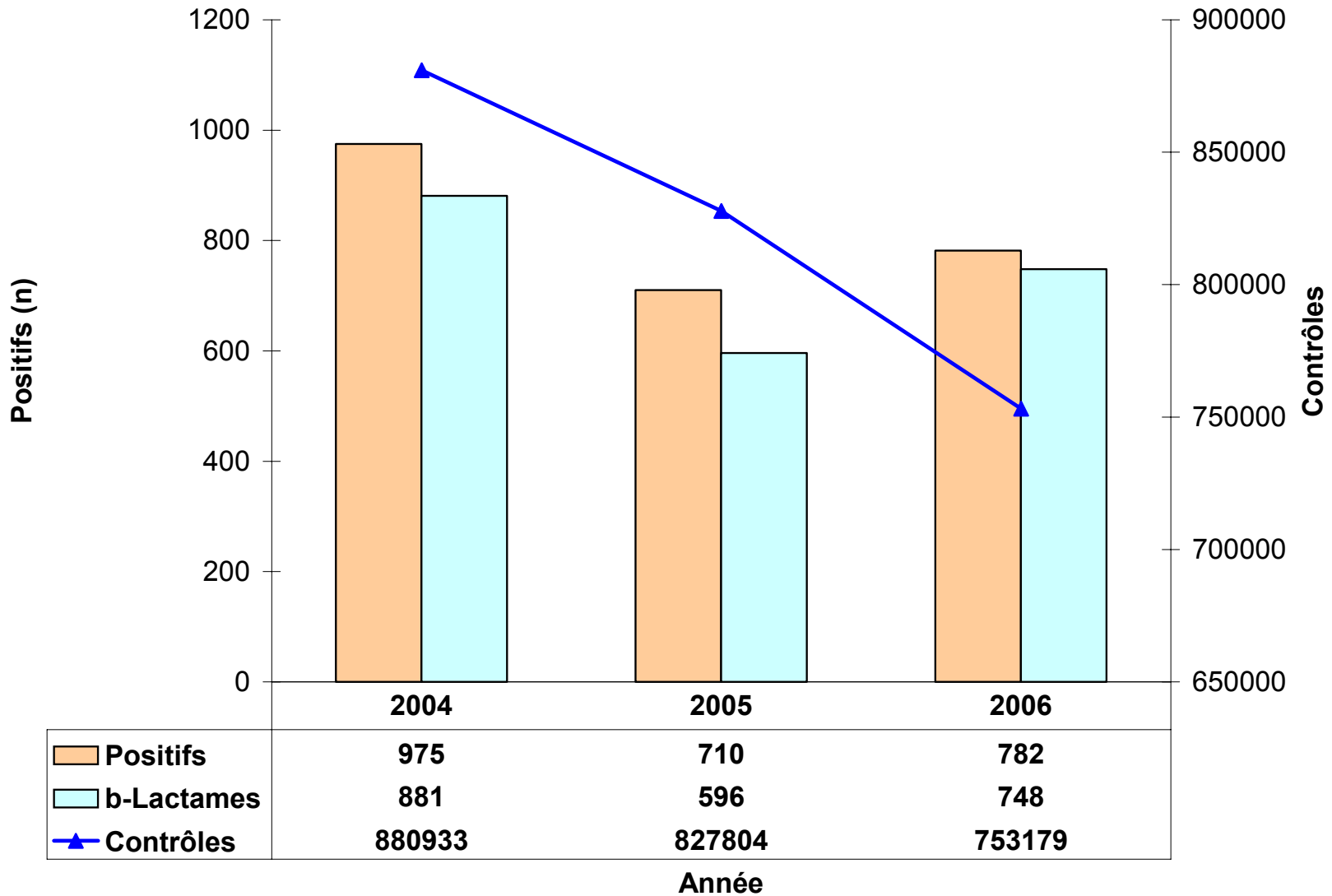
Quelques chiffres – 1



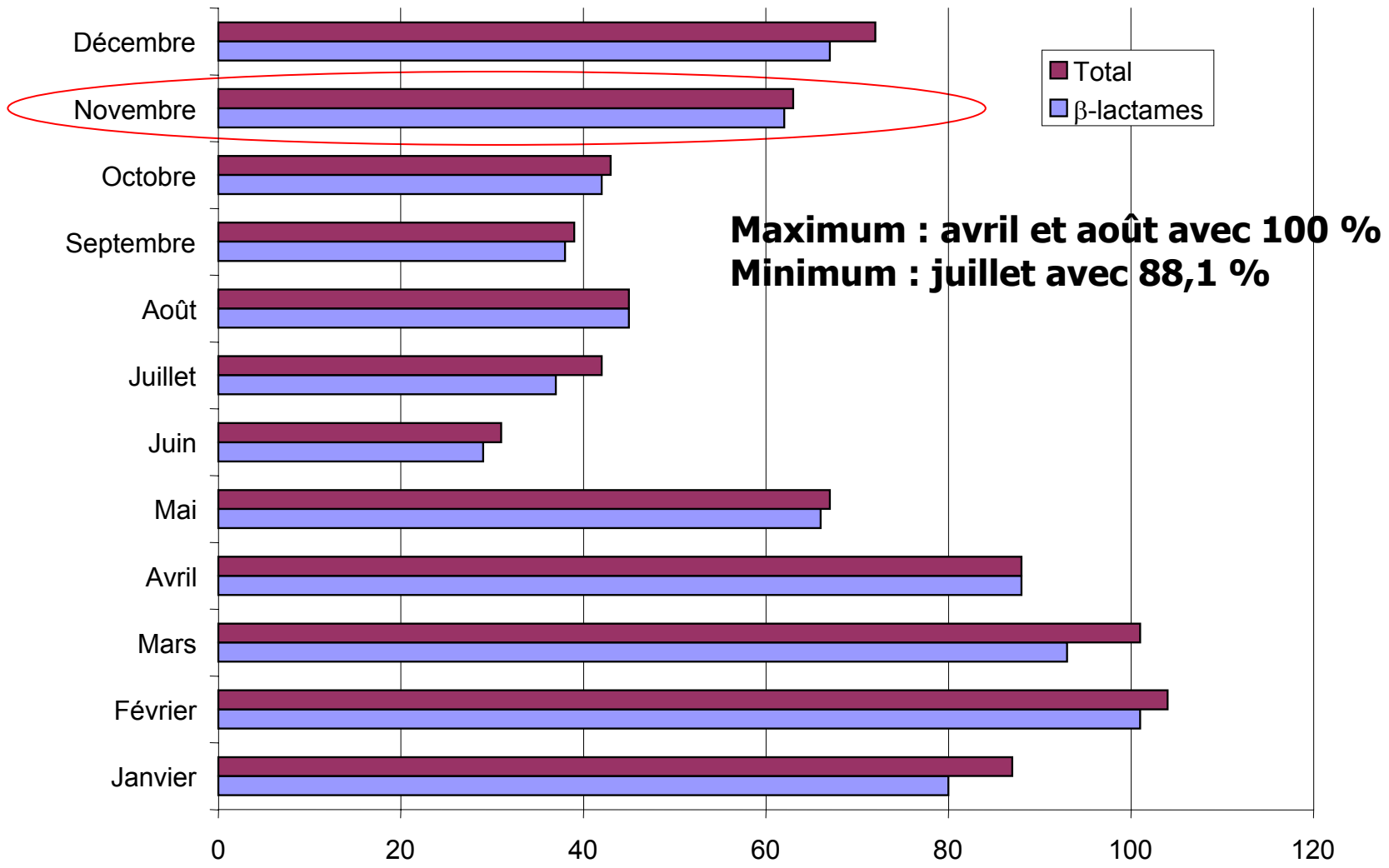
Quelques chiffres – 2



Quelques chiffres – 3



Quelques chiffres – 4



En Novembre 2006 – comité du lait de Battice

contrôle officiel

58215 contrôles officiels

63 résultats positifs soit **0,108 %**

62 positifs avec β -lactames soit **0,107 %** ←
(réponse négative après ajout de pénicillinase)

monitoring tétracyclines

5948 contrôles spécifiques

4 résultats positifs soit **0,067 %** ←

L'application du pourcentage « Tétracyclines » aux échantillons du mois de novembre conduirait à un nombre de non conformités de 100 sur 60.000 échantillons (60 % beta-lactames – 40 % tétracyclines)



Les antibiotiques dans le lait

Conclusions



La filière laitière dispose des outils pour garantir la qualité de son produit aux différents niveaux.

Plus particulièrement à la ferme :

- **Législation**
- **Contrôle officiel uniforme en Belgique**
- **Mise en place d'un monitoring complémentaire**
- **Nécessité de disposer d'outils analytiques précis**
- **Mise à disposition d'outils simples et rapides**

Mais attention :

Le premier filtre conditionne les résultats ultérieurs, notamment en matière de confirmation

