

Recherche des résidus d'antibiotiques dans la viande : De nouvelles méthodes pour de nouveaux besoins

Des innovations en matière de recherche des résidus d'antibiotiques dans la viande font leur apparition en France : nouvelle méthode de dépistage lancée en France après plusieurs autres pays (Premi®Test), évolution des techniques d'identification et de quantification (avec la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie de masse, dite LC-MS développé par l'AFSSA).

Pour les vétérinaires, la recherche des antibiotiques dans le lait est une action simple et bien connue (les fameux « inhibiteurs »). Mais les recherches sur la viande restent moins systématiques et plus méconnues... sauf par quelques médias qui braquent les projecteurs sur cette présence éventuelle de résidus dans les denrées.

Des tests « inhibiteurs »

Comment rechercher, de manière simple, dans un morceau de viande, la présence d'un antibiotique parmi les dizaines de molécules différentes ? Telle est la question initiale que se posent les laboratoires de contrôle mais aussi les filières soucieuses de donner des garanties aux consommateurs ou d'agir en amont.

Alors que les technologies d'analyses en pathologie infectieuse ont évolué de manière spectaculaire au cours des dernières décennies (PCR, anticorps monoclonaux...), force est de constater que le dépistage des antibiotiques repose sur une solution finalement très simple : utiliser une ou plusieurs bactéries particulièrement sensibles à beaucoup d'antibiotiques comme révélateur de contaminations.

Ainsi la méthode dite des « 4 boîtes », utilisée pour le contrôle officiel, repose sur l'utilisation de 4 boîtes de Pétri sur lesquelles sont déposés des disques de la viande à tester (voir tableau). Ces boîtes contiennent différents milieux de culture, sontensemencées avec différentes bactéries sensibles à des familles d'antibiotique différents. La présence d'antibiotique dans la viande se traduit, après 24 heures de culture, par une zone d'inhibition autour du disque de viande. Si le diamètre d'inhibition est supérieur à 2 mm, le morceau de viande est considéré comme positif.

Depuis quelques mois, la société DSM propose Premi®Test : un test de recherche des antibiotiques en 4 heures sur du jus de viande (extrait par pressage d'un morceau de viande). Ce jus est déposé dans des tubes contenant une gélose au sein de laquelle se trouvent des spores de *Bacillus stearothermophilus*, le même bacille que celui utilisé pour la recherche des inhibiteurs dans le lait par Delvotest® développé par la même société. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus, le tube est incubé pendant 3 heures à 64°C. En l'absence d'antibiotiques, les spores germent et se développent — entraînant acidification du milieu et changement de couleur — alors qu'elles sont inhibées dans le cas contraire.

Le défi : un seul test pour un maximum d'antibiotiques

Contrairement à la majorité des tests de diagnostic, un test de recherche des résidus d'antibiotiques doit détecter non pas un seul antibiotique ou une famille, mais bien un ensemble de molécules très différentes. Ce test doit être capable de rechercher chaque antibiotique à une concentration aussi proche que possible de sa Limite Maximale de Résidus (LMR). Pour faire un parallèle avec d'autres domaines, un test de recherche d'antibiotiques

est l'équivalent d'un test capable de rechercher toutes les bactéries pathogènes d'un échantillon mais, en plus, de dire pour chacune si le seuil admissible a été ou non dépassé. On comprend la difficulté de l'exercice. Dans le jargon des laboratoires, il doit être peu spécifique — il n'identifie pas les substances — mais assez sensible à des seuils de sensibilité en relation avec les LMR.

Pour répondre à cette difficulté deux axes de travail sont possibles. Le premier consiste à utiliser plusieurs souches bactériennes, avec différents milieux, de manière à ce que chaque couple «bactérie - milieu» soit «spécialisé» vis-à-vis d'un certain nombre de molécules. C'est l'option prise par la méthode des 4 boîtes.

Le second axe consiste à rechercher une souche bactérienne particulière sensible à tous les antibiotiques voire une grande majorité et pour chacun d'eux à un seuil proche de la LMR. C'est le choix fait dans le cas de Premi@Test : pour la plupart des molécules utilisées en production animale les seuils de détection se situent à des niveaux assez proches des LMR.

Un enjeu majeur pour les filières viande

Alors que pour la filière lait la question du respect des LMR a été abordée comme un prolongement naturel de la question des résidus inhibiteurs (molécules capables d'inhiber les ferments lactiques ... et donc la fabrication), dans les filières viandes la nécessité de s'assurer de l'absence de résidus «au niveau des LMR» constitue un enjeu nouveau.

En outre, en une vingtaine d'années, les progrès des méthodes analytiques pointus (la spectrophotométrie de masse notamment) ont nécessité de réévaluer les seuils d'acceptabilité. Par le passé, la notion de «zéro-résidu antibiotique» dans la viande était adaptée à des méthodes moins sensibles (la méthode des quatre boîtes) que les nouvelles méthodes actuelles (LC-MS-MS). Aujourd'hui, le concept des LMR basé sur une analyse des risques toxicologiques et microbiologiques des résidus nécessitent de dépister des viandes dont le dépassement des LMR est confirmé, et de ne pas sanctionner celles dont les résidus seraient en quantités bien inférieures aux LMR et sans risque pour la santé.

Aujourd'hui de nombreuses filières veulent démontrer que les mesures de prévention mises en œuvre en amont (cahier d'élevage, bonne utilisation des médicaments...) se traduisent de manière effective par l'absence de résidus à des teneurs supérieures à ces LMR. C'est dans cette optique que certaines entreprises, aussi bien en Espagne qu'aux Pays Bas, ont décidé de mettre en place des contrôles réguliers des lots (porcs et volailles). Dans d'autres pays, ce sont les contrôles officiels qui sont renforcés (plus de 100 000 analyses réalisées annuellement au Royaume-Uni, plus de 200 000 en Allemagne).

L'utilisation régulière des tests de recherche d'antibiotiques constitue à l'évidence un moyen de se différencier en donnant plus de garanties aux clients transformateurs et distributeurs grâce à un plan de contrôle renforcé. Toutefois, la plupart des méthodes utilisées jusqu'à maintenant en Europe ont été conçues avant même la définition des LMR : il est donc nécessaire de vérifier régulièrement qu'elles sont corrélées avec la liste des LMR qui s'allonge ou se modifie de mois en mois.

Les essais réalisés en France

De nombreux essais ont été réalisés à l'étranger et plus récemment en France pour évaluer la pertinence de nouveaux tests de détection comme Premi@Test. Les résultats français confirment les résultats étrangers en montrant que Premi@Test présente une sensibilité proche des LMR pour la plupart des molécules et plutôt en dessous de celles-ci pour certaines Bétalactamines. Des essais réalisés sur des animaux en fin de délai d'attente sont en phase

avec les temps d'attente recommandées et montrent que dans l'immense majorité des cas les animaux sont négatifs lorsque l'éleveur respecte les délais d'attente. Enfin, des essais réalisés à l'étranger démontrent que Premi®Test est plutôt plus sensible que les tests officiels utilisés dans ces pays.

Identifier les molécules en cause

L'idéal pour un test de recherche des antibiotiques, serait, bien entendu d'être capable d'identifier la molécule en cause et de quantifier celle-ci pour savoir si la LMR est dépassée. C'est sur ce projet que s'est concentré l'AFSSA. Celui-ci devrait déboucher à terme sur la possibilité, grâce à des méthodes de type LC-MS, de retrouver une molécule présente dans la « banque de données » de l'analyseur qui, dès à présent en compte plus de 50. Le coût estimatif d'une telle méthode (environ 150 €) ne devrait pas permettre une systématisation de son emploi, du moins à court terme. Des méthodes de ce type seront vraisemblablement couplées dans le futur à des méthodes de dépistage (ou de « screening ») telles les méthodes microbiologiques des 4 boîtes ou le Premi®Test. Celles-ci permettront de « filtrer » les échantillons positifs qui seront analysés, dans un second temps, avec une technique plus lourde pour préciser la molécule et le niveau de contamination.

Et pour les vétérinaires

Pour les vétérinaires de terrain, l'arrivée de nouveaux tests de recherche des antibiotiques dans la viande ne modifie pas fondamentalement l'approche des problèmes. La priorité reste le respect des LMR et donc en amont, le respect de la prescription des doses et des délais d'attente.

L'évolution des méthodes peut simplement conduire, comme c'est le cas pour le lait, à une pression plus forte sur les éleveurs pour le respect des prescriptions. L'utilisation de tests peut aussi être envisagée dans des cas de figure particuliers. Par exemple, pour s'assurer que des prélèvements sur lesquels ont été demandés des recherches de germes pathogènes ne proviennent pas d'animaux « sous traitement » ou encore que les viandes sont bien négatives à l'issue de délais fixés par le vétérinaire (dans des indications particulières où par exemple la dose doit être doublée ou triplée par rapport à celle figurant dans l'AMM).

Une méthode simple et peu coûteuse de recherche de tous les antibiotiques dans la viande, tel est le cahier des charges que peut se fixer tout concepteur de test. Alors que plus de 6 millions d'analyses sont réalisées chaque année sur le lait, seulement quelques milliers d'échantillons de viande sont testés à ce jour. Les exemples venus de l'étrangers, alliés à la volonté des filières viandes de prouver la qualité de leur travail et à la nécessité de répondre aux attentes des filières, devraient conduire prochainement à une évolution forte des méthodes et des plans d'analyse, tant au niveau privé que public.

Tableau 1 : Présentation de la méthode des 4 boîtes utilisée pour le contrôle officiel

Boîte	1	2	3	4
Souche	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Micrococcus luteus
PH	6	7,4	8	8
Observations		Ajout Trimethoprim		
Molécules « cibles » (1)	Bétalactames + Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bétalactames + Macrolides

(1) La boîte considérée est « plus sensible » aux antibiotiques énumérés

Légende Quatre boîtes sont nécessaire pour rechercher parmi un large « spectre » de familles différentes d'antibiotique

Tableau 2 : Sensibilité du Premi®Test à différents antibiotiques

Seuils de détection du Premi®Test (microgrammes / kilo)	Volaille, porcs, bovins	LMR viande (muscles)
Tétracyclines : oxytétracycline, chlortétracycline, doxycycline.	100	100
Pénicillines A : amoxicilline, ampicilline	5	50
Céphalosporines : ceftiofur	100	100 (pc, bov)
Cefquinome	75	50 (pc, bov)
Aminosides : DHS	1500	500 (pc, bov)
Néomycine	300	500
Gentamicine	100	50
Macrolides : Tylosine,	50	100
Erythromycine	100	200
Lincomycine	100	100
Spiramycine	1000	200 (bv, vol) 250 (pc)
Sulfadiazine	75	100
Quinolones : enrofloxacin	> 600	100
Fluméquine	> 100	200 (bv, pc), 400 (vol)
Phénicolés : Florfénicol	100	100 (vol) 200 (bov) 300 (pc)
Bacitracine	500	150 (lapins)

Légende : Les résultats n'indiquent pas de différence de sensibilité notable entre l'origine des viandes : bovins, porcins, volailles.