

Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments

RÉFÉRENCE : ANSES/LMV/90/01- Version 08

Janvier 2022

Méthode de détection des résidus à activité antibiotique dans le muscle – Méthode des quatre boîtes

Laboratoire de Fougères

**Laboratoire national de référence Résidus
de médicaments vétérinaires et colorants
dans les denrées alimentaires d'origine
animale et aliments pour animaux**

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
8	Mineures	Janvier 2022	Remplacement du milieu test agar pH 6 par deux milieux équivalents. Modifications du mode de préparation et de la durée de conservation de certaines solutions mères Ajout d'une autre appellation pour <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341. Préparation de l'inoculum pour les essais <i>Micrococcus luteus</i> : 2 ^e option introduite.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de Fougères

Laboratoire National de Référence « Résidus Médicaments Vétérinaires »

Adresse : 10B rue Claude Bourgelat – CS 40608 – 35306 FOUGERES Cedex

Contacts : lnr-rmv@anses.fr

La présente méthode a été optimisée, caractérisée et validée par l'unité des Résidus et Contaminants du laboratoire de Fougères.

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	9
5.1 Conseils généraux	9
5.2 Réactifs	9
6. Appareillage et matériels	12
7 Échantillons	13
7.1 Bacillus subtilis	13
7.2 Micrococcus luteus	15
8 Mode opératoire	17
8.1 Traitement des échantillons	17
8.2 Technique de diffusion	17
9 Résultats	18
9.1 Bacillus subtilis à pH 6	18
9.2 Bacillus subtilis à pH 8	18
9.3 Micrococcus luteus à pH 7,4	18
9.4 Micrococcus luteus à pH 8	19
9.5 Conclusion	19
10 Caractéristiques de performance de la méthode	19
10.1 Sélectivité et taux de faux-positifs	19
10.2 Détermination de la capacité de détection et du taux de faux-négatifs	19
10.3 Applicabilité de la méthode	20
10.4 Robustesse de la méthode	20



11	Annexe	22
12	Bibliographie	24

Introduction

La présente méthode a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité.

Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et de volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras. Elle ne doit pas être appliquée aux reins.

Les performances de cette méthode, et la nature des résidus d'antibiotiques détectés sont décrites dans le chapitre 8.



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité.

Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et de volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras. Elle ne doit pas être appliquée aux reins.

Les performances de cette méthode et la nature des résidus d'antibiotiques détectés sont décrites dans le chapitre 8.

2. Documents de référence

-

3. Termes, sigles et définitions

-

4. Principe de la méthode

La détection des résidus de substances à activité antibiotique nécessite l'application d'une technique de diffusion en gélose qui comporte :

- l'ensemencement, par un microorganisme sensible aux substances à activité antibiotique, d'un milieu nutritif solide coulé en boîte de Pétri.
- le dépôt, à la surface du milieu ensemencé, d'une rondelle de muscle congelé, suivi d'une incubation à la température optimale de développement du microorganisme-test.

Les substances à activité antibiotique éventuellement présentes inhibent la croissance du microorganisme-test : il en résulte la formation d'une zone d'inhibition autour de l'échantillon.

Cette méthode requiert l'utilisation des deux espèces suivantes : *Bacillus subtilis* cultivé à deux pH différents (6 et 8) et *Micrococcus luteus* cultivé également à deux pH différents (7,4 et 8).

Pour la méthode de diffusion réalisée avec *Micrococcus luteus* à pH 7,4, l'addition de triméthoprime permet la détection des sulfamides dans le muscle grâce à la synergie triméthoprime-sulfamides.

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1 Conseils généraux

Au cours de l'application de cette méthode, sauf indications différentes, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou de l'eau de qualité équivalente.

Pour favoriser la régularité des résultats, il est recommandé d'utiliser pour la préparation des milieux de culture et des diluants, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés.

Les mesures de pH doivent être effectuées au pH-mètre à température ambiante (environ 20°C) ou après correction de la température pour les milieux gélosés (environ 45°C).

Sauf recommandations écrites, les milieux, diluants et différentes solutions non préparés extemporanément doivent être conservés au réfrigérateur, pendant six mois au maximum.

Lorsque l'examen ne peut être effectué le jour même, les échantillons à tester doivent être conservés à une température égale ou inférieure à -18°C.

5.2 Réactifs

5.2.1. Eau physiologique :

Composition :

Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
Eau	1000 ml

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

5.2.2. Gélose tryptone soja (GTS) :

Composition :

Peptone pancréatique de caséine	15 g
Peptone papaïnique de soja	5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Agar-agar	15 g
Eau	1000 ml

pH = 7,3 ± 0,2 à 20°C.
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

5.2.3. Bouillon de culture pour la congélation des souches :

Composition :

Peptone trypsique de caséine 5 g
Extrait de viande de bœuf 3 g
Eau qsp 1000 ml
pH = 6,8 ± 0,2 à 20°C.
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 mn.

5.2.4. Milieu de Finley et Fields :

Composition :

Gélose nutritive 15 g
Glucose 5 g
Sulfate de manganèse (MnSO₄H₂O) 0,03 g
Eau 1000 ml
pH = 7,0 ± 0,2 à 20°C.
Répartir, à raison de 250 ml dans des boîtes de Roux (4.20).
Après stérilisation, laisser refroidir les boîtes en position horizontale.
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

5.2.5. Testagar à pH 6 :

En remplacement du milieu déshydraté MERCK, référence 10663, deux milieux peuvent être utilisés :

- Utiliser le milieu déshydraté MERCK Testagar à pH 8, référence 10664. Il faut ajuster son pH à 6.0 avant stérilisation, en ajoutant environ 20 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 1N pour 1 litre de milieu préparé.
- Utiliser le milieu liquide prêt à l'emploi Testagar à pH 6 (VWR (AVANTOR)), référence AX021189.

5.2.6. Diagnostic Sensitive Test (DST) à pH 7,4 :

Utiliser le milieu déshydraté OXOID, référence CM0261.

5.2.7. Testagar à pH 8 :

Utiliser le milieu déshydraté MERCK, référence 10664.

5.2.8. Solution de triméthoprime (TMP) :

Dissoudre une quantité de TMP (SIGMA référence T 7883 ou qualité équivalente) correspondant à 50 000 µg de matière active (effectuer une pesée de 50 mg environ, à calculer à chaque changement de lot de fabrication) dans 250 ml de méthanol, et ajuster à 500 ml avec de l'eau dans une fiole jaugée.

La concentration de cette solution est de 100 µg de TMP par ml. Elle est conservée à au moins -18°C et peut être utilisée pendant 3 mois au maximum.

5.2.9. Solutions témoins :

Ces solutions témoins, contenant un antibiotique ou un sulfamide de référence, permettent de vérifier que les conditions opératoires sont régulièrement respectées.

5.2.9.1. Solution témoin contenant de la pénicilline :

Dissoudre une quantité de pénicilline G sodique (SIGMA référence PEN-NA ou qualité équivalente) correspondant à 50.000 U.I. (quantité voisine de 30 mg, à calculer à chaque changement de lot de fabrication) dans 25 ml d'eau, et ajuster à 50 ml avec du méthanol dans une fiole jaugée. La concentration de cette solution est de 1000 U.I. de pénicilline par ml. Elle est conservée à au moins -18°C et peut être utilisée pendant 7 mois au maximum.

Le jour de l'essai, préparer une dilution au 1/5000 de la solution-mère dans de l'eau, en effectuant deux dilutions successives, l'une au 1/100, l'autre au 1/50. La concentration de la solution finale est de 0,2 U.I. de pénicilline par ml.

5.2.9.2. Solution témoin contenant de la dihydrostreptomycine (DHS) :

Dissoudre une quantité de DHS sulfate (SIGMA référence D 7253 ou qualité équivalente) correspondant à 50.000 µg de matière active (quantité voisine de 64 mg, à calculer à chaque changement de lot de fabrication) dans 25 ml d'eau, et ajuster à 50 ml avec du méthanol dans une fiole jaugée. La concentration de cette solution est de 1000 µg de DHS active par ml. Elle est conservée à au moins -18°C et peut être utilisée pendant 10 mois au maximum.

Le jour de l'essai, préparer une dilution au 1/200 de la solution-mère dans de l'eau. La concentration de la solution finale est de 5 µg de DHS active par ml.

5.2.9.3. Solution témoin contenant de la sulfadimérazine :

Dissoudre une quantité de sulfadimérazine (SIGMA référence S 6256 ou qualité équivalente, dénomination américaine : sulfaméthazine) correspondant à 50.000 µg de matière active (quantité voisine de 50 mg, à calculer à chaque changement de lot de fabrication) dans du méthanol et ajuster à 50 ml dans une fiole jaugée. La concentration de cette solution est de 1000 µg de sulfadimérazine active par ml. Elle est conservée à au moins -18°C et peut être utilisée pendant 1 an au maximum.

Le jour de l'essai, préparer une dilution au 1/250 de la solution-mère dans de l'eau, en effectuant deux dilutions successives, l'une au 1/10, l'autre au 1/25. La concentration de la solution finale est de 4 µg de sulfadimérazine active par ml.

5.2.9.4. Solution témoin contenant de l'érythromycine :

Dissoudre une quantité d'érythromycine (SIGMA référence E 6376 ou qualité équivalente) correspondant à 50.000 µg de matière active (quantité voisine de 54 mg, à calculer à chaque changement de lot de fabrication), dans 50 ml de méthanol dans une fiole jaugée. La concentration de cette solution est de 1000 µg d'érythromycine par ml. Elle est conservée au réfrigérateur et peut être utilisée pendant 3 mois au maximum.

Le jour de l'essai, préparer une dilution au 1/4000 de la solution-mère en effectuant deux dilutions successives, l'une au 1/200, l'autre au 1/20. La concentration de la solution finale est de 0,25 µg d'érythromycine active par ml.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

- 6.1. Etuves à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ et à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 6.2. Congélateur dont la température doit être inférieure ou égale à -18°C .
- 6.3. Réfrigérateur dont la température doit être égale à $2-8^\circ\text{C}$.
- 6.4. Centrifugeuse réfrigérée permettant d'opérer à une vitesse d'environ 5000 g.
- 6.5. Bain d'eau réglable jusqu'à 100°C .
- 6.6. Agitateur électrique pour tubes à essais.
- 6.7. Balance de précision analytique.
- 6.8. Spectrophotomètre UV-visible.
- 6.9. pH-mètre ayant une précision de réglage de 0,1 unité à 20°C .
- 6.10. Pipette automatique réglable de 10 à 100 µl.
- 6.11. Emporte-pièce d'un diamètre de 8 mm (type perce-bouchons PROLABO référence 08.146.063).
- 6.12. Affiloir (pour affûtage emporte-pièce, OSI référence A 7301000).
- 6.13. Manche à bistouri et lames interchangeables.
- 6.14. Anse bouclée en nickel-chrome ou pipettes Pasteur.
- 6.15. Pincettes à bouts pointus.
- 6.16. Plateaux en acier inoxydable.
- 6.17. Disques de papier filtre d'un diamètre de 6 mm (PRAT DUMAS référence PRATA006242).

- 6.18. Boîtes de Pétri en matière plastique d'un diamètre de 90 mm, à fond parfaitement plat.
- 6.19. Flacons en verre borosilicaté à col à vis de 125 à 500 ml, et bouchons adaptés.
- 6.20. Boîtes de Roux de capacité 1000 ml.
- 6.21. Bêchers en verre borosilicaté gradués à 1000 ml.
- 6.22. Fioles jaugées en verre borosilicaté de 20 à 500 ml.
- 6.23. Eprouvettes graduées en verre borosilicaté de 10, 25 et 50 ml.
- 6.24. Tubes à essai en verre borosilicaté de 16x160 mm avec et sans col à vis, et bouchons adaptés.
- 6.25. Tubes à centrifuger stériles de contenance 60 ml minimum, et bouchons adaptés.
- 6.26. Pipettes stériles et non stériles de 10 ml et 5 ml graduées en 0,1 ml.
- 6.27. Pipettes stériles et non stériles de 2 ml et 1 ml graduées en 0,01 ml.
- 6.28. Billes de verre stériles d'un diamètre d'environ 3 mm.
- 6.29. Microtubes operculés en matière plastique de contenance 1,5 ml (type EPPENDORF).
- 6.30. Microscope.

7 Échantillons

7.1 **Bacillus subtilis**

Organisme-test : *Bacillus subtilis* B.G.A.

- commercialisé par MERCK sous la forme d'ampoules de suspension contenant de 8.10^6 à 5.10^7 spores par ml (référence 10649). Cette suspension est utilisable en l'état après dénombrement des spores.
- commercialisé par l'Institut Pasteur sous forme lyophilisée (CIP 107063) : dans ce cas, des lots de suspension de spores pourront être préparés en suivant le protocole ci-après.

7.1.1. Préparation du lot de semence longue conservation (SLC) :

La quantité du lot de SLC à préparer est fonction de la fréquence d'utilisation de *Bacillus subtilis* sur deux années.

Réhydrater une culture lyophilisée avec 2 ml d'eau physiologique.

A partir de cette suspension, ensemer en stries deux boîtes de GTS* (5.2.2) pour isolement et confirmation d'identification.

Incuber à 30°C pendant 16 à 18 heures.

A partir de quelques colonies prélevées sur une des boîtes, ensemer un ou plusieurs tubes de bouillon de culture pour la congélation des souches (5.2.3).

Incuber à 30°C pendant 3 à 6 heures.

Répartir la culture (qui est en phase exponentielle de croissance) par fractions de 0,5 à 1 ml dans des microtubes operculés (6.29).

Conserver à -18°C pendant deux ans au maximum.

7.1.2. Préparation de la suspension de spores (SE) :

La quantité de SE à préparer est fonction de la fréquence d'utilisation de *Bacillus subtilis* sur un an.

A partir d'un lot de SLC (7.1.1), effectuer 3 repiquages successifs sur pentes de GTS* pour remise en activité de la souche. En parallèle, ensemercer en stries deux boîtes de GTS* pour isolement et confirmation d'identification.

Effectuer les incubations à 30°C pendant au moins 16 heures.

A partir d'une culture datant de moins de 24 heures et à l'aide d'une dizaine de billes de verre et de 2 ml d'eau physiologique (5.2.1), récolter la culture sous forme d'une suspension.

Répartir cette suspension à la surface du milieu de sporulation (5.2.4).

Incuber à 30°C pendant quatre jours, en surveillant l'avancement de la sporulation par observation d'une anse de la culture au microscope. Si nécessaire, prolonger l'incubation.

A l'issue de cette incubation, récolter les spores obtenues avec des billes de verre et 50 ml d'eau physiologique.

Centrifuger cette suspension de spores 15 minutes à 4400 g. Eliminer le surnageant, répéter le lavage deux autres fois.

Reprendre le culot avec environ 50 ml d'eau physiologique.

7.1.3. Numération des suspensions de spores :

Chaque lot de suspension de spores doit faire l'objet d'une numération afin d'en déterminer la concentration.

Après dilutions décimales dans de l'eau physiologique, ensemercer des boîtes contenant de 12 à 15 ml de GTS*. Incuber au moins 18 heures à 30°C avant comptage des colonies.

Cette suspension de spores aliquotées (SE) peut être conservée au réfrigérateur pendant 1 an au maximum.

** Le milieu GTS peut être remplacé indifféremment par du milieu Testagar pH 6 (5.2.5) ou par du milieu Testagar pH 8 (5.2.7).*

7.1.4. Préparation des boîtes de Pétri :

7.1.4.1. Gélose à pH 6 :

Ensemencer le milieu gélosé (5.2.5), maintenu en surfusion, avec la suspension de spores (7.1 ou 7.1.2) préalablement diluée de façon à obtenir une concentration d'environ $5 \cdot 10^4$ spores par ml de milieu.

Répartir le milieu ensemercé dans des boîtes de Pétri à raison de 5 ml par boîte.

Laisser refroidir le milieu sur une surface froide et horizontale.

Les boîtes ainsi préparées peuvent être utilisées dans un délai de 3 jours au maximum à condition de les refroidir immédiatement après la préparation et de les conserver au réfrigérateur.

7.1.4.2. Gélose à pH 8 :

Ensemencer le milieu gélosé (5.2.7), maintenu en surfusion, avec la suspension de spores (7.1 ou 7.1.2) préalablement diluée, de façon à obtenir une concentration d'environ $5 \cdot 10^4$ spores par ml de milieu.

Répartir le milieuensemencé dans des boîtes de Pétri à raison de 5 ml par boîte.

Laisser refroidir le milieu sur une surface froide et horizontale.

Les boîtes ainsi préparées peuvent être utilisées dans un délai de 3 jours au maximum à condition de les refroidir immédiatement après la préparation et de les conserver au réfrigérateur.

7.2 **Micrococcus luteus**

Organisme-test : *Micrococcus luteus* ATCC 9341, également appelé *Kocuria rhizophila* ou *kocuria varians* souche disponible à l'Institut Pasteur, sous forme lyophilisée (CIP 53.45).

7.2.1. Préparation du lot de semence longue conservation (SLC) :

La quantité du lot de SLC à préparer est fonction de la fréquence d'utilisation de *Micrococcus luteus* sur 18 mois.

Réhydrater une culture lyophilisée avec 2 ml d'eau physiologique.

A partir de cette suspension, ensemencer en stries deux boîtes de GTS*, pour isolement et confirmation d'identification.

Incuber à 37°C pendant au moins 24 heures.

Puis procéder comme au 7.1.1, mais en effectuant les incubations à 37°C.

Conserver à -18°C pendant 18 mois au maximum.

7.2.2 Préparation du lot de semence d'essai (SE) :

La quantité du lot de SE à préparer est fonction de la fréquence d'utilisation de *Micrococcus luteus* sur un mois.

A partir d'un lot de SLC (7.2.1), ensemencer en stries des pentes de GTS*.

Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

Effectuer de la même façon deux autres repiquages.

Stocker les troisièmes pentes au réfrigérateur pendant un mois au maximum.

7.2.3 Préparation de l'inoculum pour les essais :

La veille de l'essai, et à partir de la pente de SE. (7.2.2), ensemencer une pente de GTS*.

15 / 24 Incuber de 16 à 18 heures à 37°C.

Le jour de l'essai, à l'aide de quelques billes de verre et de 2 ml d'eau physiologique, mettre la culture en suspension en respectant l'intégrité de la surface de la gélose.

Prélever une fraction (<100µl) de la suspension et la disperser dans un tube d'eau physiologique (environ 4ml), puis agiter quelques secondes.

Ajuster l'absorbance de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm ± 20 nm en diluant éventuellement avec de l'eau physiologique, de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,40 et 0,45 ou effectuer une numération correspondant à une concentration de 1 à 3 10⁸ germes/ml.

** Le milieu GTS peut être remplacé indifféremment par du milieu DST (3.2.6) ou par du milieu Testagar pH 8 (5.2.7).*

7.2.4. Préparation des boîtes de Pétri :

7.2.4.1. Gélose à pH 7,4 :

Ensemencer le milieu gélosé (5.2.6), maintenu en surfusion, avec la suspension de germes (7.2.3.) préalablement diluée, de façon à obtenir une concentration d'environ 1 à 3 10⁵ germes par ml de milieu.

Ajouter la solution de TMP (5.2.8) dans ce milieu gélosé à raison de 0,5 % (v/v).

Répartir le milieuensemencé dans des boîtes de Pétri, à raison de 5 ml par boîte.

Laisser refroidir le milieu sur une surface froide et horizontale.

Les boîtes ainsi préparées peuvent être utilisées dans un délai de 2 jours au maximum, à condition de les refroidir immédiatement après la préparation et de les conserver au réfrigérateur.

7.2.4.2. Gélose à pH 8 :

Ensemencer le milieu gélosé (5.2.7), maintenu en surfusion, avec la suspension de germes (7.2.3) préalablement diluée, de façon à obtenir une concentration d'environ 1 à 3 10⁵ germes par ml de milieu.

Répartir le milieuensemencé dans des boîtes de Pétri, à raison de 5 ml par boîte.

Laisser refroidir le milieu sur une surface froide et horizontale.

Les boîtes ainsi préparées peuvent être utilisées dans un délai de 3 jours au maximum, à condition de les refroidir immédiatement après la préparation et de les conserver au réfrigérateur.

8 Mode opératoire

Les quatre méthodes de diffusion en gélose avec *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* sont applicables exclusivement aux muscles d'animaux de boucherie et de volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras. Les échantillons devront être prélevés aussi aseptiquement que possible, et transportés, de préférence congelés, au laboratoire dans les meilleurs délais. Ce dernier point est de la plus haute importance pour les échantillons de foies de palmipèdes gras.

8.1 Traitement des échantillons

Quelques minutes avant l'essai, sortir les échantillons du congélateur.

Prélever sur chaque échantillon une "carotte" cylindrique de 8 mm de diamètre et de 2 cm de long environ, à l'aide d'un emporte-pièce (6.11).

Tout en poussant le cylindre de muscle hors de l'emporte-pièce, découper à l'aide d'un bistouri huit rondelles de viande de 2 mm d'épaisseur.

Placer deux rondelles en positions diamétralement opposées sur chacune des quatre boîtes d'essai (7.1.4.1, 7.1.4.2, 7.2.4.1 et 7.2.4.2), en utilisant des pinces.

Il est ainsi possible de déposer dans chacune de ces boîtes jusqu'à six rondelles, correspondant à trois échantillons à analyser, toutes ces rondelles devant se situer sur un cercle à environ 1 cm de la périphérie de la boîte.

8.2 Technique de diffusion

8.2.1. *Bacillus subtilis* à pH 6 :

Déposer au centre de la boîte (7.1.4.1) un disque de papier filtre à l'aide de pinces.

Déposer sur le disque 10 µl de la solution témoin contenant de la pénicilline (5.2.9.1).

Placer les boîtes ainsi préparées dans une étuve à 30°C, pendant au moins 18 heures.

A l'issue de l'incubation, le disque imprégné de la solution témoin (0,002 U.I. de pénicilline), doit présenter une zone d'inhibition, dont la taille de la zone annulaire doit être de 6 ± 1 mm (la zone annulaire est la distance comprise entre le bord du disque et la limite externe de la zone d'inhibition).

8.2.2. *Bacillus subtilis* à pH 8 :

Déposer au centre de la boîte (7.1.4.2) un disque de papier filtre à l'aide de pinces.

Déposer sur le disque 10 µl de la solution témoin contenant de la DHS (5.2.9.2).

Placer les boîtes ainsi préparées dans une étuve à 30°C pendant au moins 18 heures.

A l'issue de l'incubation, le disque imprégné de solution témoin (0,05 µg de DHS) doit présenter une zone d'inhibition, dont la taille de la zone annulaire doit être de 5 ± 1 mm.

8.2.3. *Micrococcus luteus* à pH 7,4 :

Déposer au centre de la boîte (5.2.4.1) un disque de papier filtre à l'aide de pinces.

Déposer sur le disque 10 µl de la solution témoin contenant de la sulfadimérazine (5.2.9.3).

Placer les boîtes ainsi préparées dans une étuve à 37°C pendant au moins 24 heures.

A l'issue de l'incubation, le disque imprégné de solution témoin (0,04 µg de sulfadimérazine) doit présenter une zone d'inhibition, dont la taille de la zone annulaire doit être de 6 ± 1 mm.

8.2.4. *Micrococcus luteus* à pH 8 :

Déposer au centre de la boîte (5.2.4.2) un disque de papier filtre à l'aide de pinces.

Déposer sur le disque 10 µl de la solution témoin contenant de l'érythromycine (5.2.9.4).

Placer les boîtes ainsi préparées dans une étuve à 37°C pendant au moins 24 heures.

A l'issue de l'incubation, le disque imprégné de solution témoin (0,0025 µg d'érythromycine) doit présenter une zone d'inhibition, dont la taille de la zone annulaire doit être de 4 ± 1 mm.

9 Résultats

Pour chacune des quatre boîtes, sont considérés comme positifs, les échantillons de viande donnant des zones d'inhibition dont la taille de la zone annulaire est au moins égale à 2 mm.

Il faut recommencer l'essai chaque fois que le résultat semble douteux (pour un même échantillon une rondelle étant positive et l'autre négative, colonies éparses dans la zone d'inhibition, contaminations, etc...).

Si le second résultat n'est pas considéré comme positif, le résultat douteux doit être considéré comme négatif.

9.1 *Bacillus subtilis* à pH 6

Cette technique permet de détecter plus sélectivement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des béta-lactamines ou des tétracyclines.

9.2 *Bacillus subtilis* à pH 8

Cette technique permet de détecter plus sélectivement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des fluoroquinolones et des aminosides.

9.3 *Micrococcus luteus* à pH 7,4

Cette technique permet de détecter plus sélectivement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des sulfamides et des béta-lactamines.

9.4 **Micrococcus luteus à pH 8**

Cette technique permet de détecter plus sélectivement les résidus de substances à activité antibiotique de la famille des bêta-lactamines et des macrolides.

9.5 **Conclusion**

Sont considérés comme contenant des résidus de substances à activité antibiotique, les échantillons trouvés positifs par l'une au moins des quatre techniques de diffusion en gélose.

10 **Caractéristiques de performance de la méthode**

Suivant la décision CE/2002/657 (2002), les caractéristiques de performance de cette méthode ont été déterminées lors d'une validation en accord avec les recommandations du guide de validations des méthodes de dépistage proposé par les laboratoires communautaires de référence (Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines) : ont été étudiés la sélectivité et le taux de faux-positifs, la capacité de détection (CC β) et le taux de faux-négatifs, l'applicabilité de la méthode et sa robustesse.

10.1 **Sélectivité et taux de faux-positifs**

La sélectivité de la méthode a été évaluée sur 39 lots de muscle de bovin, 5 lots de muscle de porc, 5 lots de muscle d'ovin, 5 lots de muscle de volaille et 10 lots de foie de canard gras. Le taux de faux-positifs a été estimé à 0 % sur les boîtesensemencées avec *Bacillus subtilis* à pH 8 (BS8) et *Micrococcus luteus* à pH 7,4 (ML7,4), quelque soit la matrice. Pour les boîtesensemencées avec *Bacillus subtilis* à pH 6 (BS6), le taux de faux-positifs est égal à 0 %, sauf pour le muscle de bovin, pour lequel il s'élève à 2,6 %. Ce taux de faux-positifs est égal à 6,9 % pour le muscle de bovin sur les boîtesensemencées avec *Micrococcus luteus* à pH 8 (ML8), mais il est égal à 0 % pour les autres matrices sur ces mêmes boîtes.

10.2 **Détermination de la capacité de détection et du taux de faux-négatifs**

Pour chaque antibiotique testé, la capacité de détection a été déterminée en analysant 60 échantillons de muscle de bovin supplémentés à une concentration prédéfinie. Cette étude a permis également de confirmer la spécificité de chacune des quatre boîtes. Les CC β obtenus pour chaque molécule testée, ainsi que les boîtes "cibles" sont présentés dans le tableau 1 (page 20).

Cette méthode de dépistage est capable de détecter les résidus de pénicilline G, d'amoxicilline, d'oxacilline, de céphalexine et de chlortétracycline à une concentration inférieure ou égale à la LMR. Pour les résidus de cloxacilline, d'oxytétracycline, d'érythromycine, d'enrofloxacin et de fluméquine, le CC β est compris entre 1,5 et 3 fois leur LMR. Les molécules pour lesquelles cette méthode est très peu sensible n'ont pas été testées

(lincomycine, thiamphénicol, triméthoprime et colistine), sauf la DHS dont le CC β a été estimé supérieur à 20 fois sa LMR.

Aux CC β définis, le taux de faux-négatifs est faible : il est égal à 0 % pour 9 antibactériens, à 1,7 % pour la fluméquine, à 3,3 % pour l'OTC et à 5 % pour la cloxacilline.

10.3 Applicabilité de la méthode

L'applicabilité de la méthode a été démontrée en vérifiant les CC β obtenus avec du muscle de porc, d'ovin et de volaille et avec du foie de palmipèdes gras pour la pénicilline G à 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BS6), pour l'enrofloxacin à 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BS8), pour l'amoxicilline à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ML7,4) et l'érythromycine à 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ML8), sur 5 lots de muscle de porc, 5 lots de muscle d'ovin, 5 lots de muscle de volaille et 10 lots de foie de canard gras. L'écart accepté a été de 1 mm (équivalent à l'écart accepté pour les témoins positifs). L'étude a montré que cette méthode est applicable aux matrices citées ci-dessus.

10.4 Robustesse de la méthode

Lors des études de la sélectivité, de la capacité de détection et de l'applicabilité, la variabilité entre les techniciens a été estimée, ainsi que la répétabilité de la méthode. Ensuite, une étude de robustesse basée sur la construction d'un plan expérimental, comme décrit dans la décision CE/2002/657 (2002), a été réalisée et a permis de tester des facteurs expérimentaux différents de ceux testés pendant la première phase de la validation (épaisseur de l'échantillon, quantité de gélose / boîte et durée de pré-incubation ou non), permettant ainsi de conclure à la robustesse de la méthode, sous réserve d'appliquer le protocole tel qu'il est défini.

Tableau 1: Détermination des capacités de détection ou CC β

Famille	Antibactérien	[C] testée en $\mu\text{g}/\text{kg}$	LMR en $\mu\text{g}/\text{kg}$	Résultats qualitatifs (60 dépôts)	ZI* moy. \pm écart-type en mm	CC β en $\mu\text{g}/\text{kg}$	CC β / LMR	Boîte "cible"	Capacité de la méthode 4B à détecter les résidus d'antibiotiques / LMRs
Céphalosporines	Céfalonium	100	-	60 +	3,5 \pm 0,6	< 100	-	BS6	-
	Céphalexine	200	200	60 +	4,7 \pm 0,7	< 200	< LMR	ML 7,4	Satisfaisant
Pénicillines	Pénicilline G	40	50	+19 + / 1-	5,0 \pm 0,9	40*	< 4/5 LMR	BS6	Satisfaisant
	Cloxacilline	750	300	57 + / 3-	2,7 \pm 0,9	600	2,5 LMR	BS6	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
	Oxacilline	300	300	60 +	5,5 \pm 0,7	< 300	< LMR	ML 7,4	Satisfaisant
	Amoxicilline	50	50	60 +	5,5 \pm 0,9	< 50	< LMR	ML 7,4	Satisfaisant
Tétracyclines	OTC	250*	100	17 + / 3-	3,3 \pm 1,0	>250*	2,5 LMR	BS6	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
	CTC	50	100	60 +	4,3 \pm 0,6	< 50	< 1/2 LMR	BS6	Satisfaisant
Aminosides	DHS	10 000	500	20 -/ 20 dépôts	-	> 10 000	> 20 LMR	BS8	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
Sulfamides	Sulfadiméthoxine	750	100	53 + / 7-	-	> 750	> 7,5 LMR	ML 7,4	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
	Sulfadiazine	600	100	52 + / 8-	-	> 600	> 6 LMR	ML 7,4	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
Quinolones et Fluoroquinolones	Fluméquine	500	200 et 400	59 + / 1-	3,0 \pm 0,6	500	1,5 LMR à 2,5 LMR	BS6	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
	Enrofloxacin	250	100 (enro + cipro)	60 +	4,3 \pm 0,9	< 250	< 2,5 LMR	BS8	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
Macrolides	Tylosine	1000	100	60 +	4,3 \pm 0,7	< 1000	< 10 LMR	ML 7,4	Insatisfaisant : risque de faux négatifs
	Erythromycine	600	200	60 +	4,8 \pm 1,2	< 600	< 3 LMR	ML 8	Insatisfaisant : risque de faux négatifs

* ZI moy. : Largeur moyenne des zones d'inhibition.

* Capacités de détection CC β réévaluées en 2021 sur le testagar pH 6 et les 2 milieux de remplacement pour la boîte Bs6.

11 Annexe

Fiche de paillasse

Méthode des quatre boîtes - 1

Matériel :

- Boîtes de Pétri de **90 mm de Ø**.
- Disques de papier filtre de **6 mm de Ø**.

Germes test :

- ***Bacillus subtilis* BGA** : suspension à environ **5.10⁶ spores/ml**.
- ***Micrococcus luteus* (*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341** :

Avant l'essai, préparer une suspension de culture fraîche dont l'absorbance à 620 nm est comprise entre **0,40 et 0,45**, équivalent à 1 à 3 10⁸ germes/ml.

Réactifs :

- **Testagar pH 6**
- **DST**
- **Testagar pH 8**
- Triméthoprimine : solution à 100 µg/ml
- Témoins positifs :
 - Pénicilline G : solution à 0,2 UI/ml
 - Sulfadimérazine : solution à 4 µg/ml
 - DHS : solution à 5 µg/ml
 - Erythromycine : solution à 0,25 µg/ml

Principe :

- Après ensemencement, répartir la gélose à raison de **5 ml/boîte**. Prévoir au moins une boîte supplémentaire pour le lendemain.
- Laisser refroidir sur une surface horizontale. Stocker au réfrigérateur avant utilisation. Ces boîtes peuvent être utilisées dans un délai de 3 jours maximum (exceptée DST : 2 jours).
- Déposer des rondelles de muscle ou de foie gras de 2 mm d'épaisseur et de 8 mm de Ø, à raison de 2 par échantillon, en positions diamétralement opposées. On peut ainsi tester **3 échantillons/boîte**.
- Déposer les témoins positifs à raison de **10 µl/disque** de papier filtre, placés au centre des boîtes.
- Après incubation, les témoins positifs doivent présenter un anneau d'inhibition dont la largeur doit être de 4, 5 ou 6 ± 1 mm. Les échantillons seront considérés comme positifs si cet anneau d'inhibition a une largeur **≥ à 2 mm**.

Fiche de paillasse

Méthode des quatre boîtes - 2

BS6 : *Bacillus subtilis* – Testagar pH 6

- Ensemencer le milieu avec **1 %** de la suspension de spores (5.10^4 spores/ml de gélose).
- Déposer les rondelles de viande et le témoin positif **pénicilline G**.
- Incuber à **30°C** pendant au moins **18 heures**.
- Après incubation, les témoins positifs doivent présenter une zone d'inhibition de **6 ± 1 mm**.

BS 8 : *Bacillus subtilis* – Testagar pH 8

- Ensemencer le milieu avec **1 %** de la suspension de spores (5.10^4 spores/ml de gélose).
- Déposer les rondelles de viande et le témoin positif **dihydrostreptomycine**.
- Incuber à **30°C** pendant au moins **18 heures**.
- Après incubation, les témoins positifs doivent présenter une zone d'inhibition de **5 ± 1 mm**.

ML 7,4 : *Micrococcus luteus* (*Kocuria rhizophila*) – DST pH 7,4

- Ensemencer le milieu avec **1 %** de la suspension de germes préalablement diluée au 1/10 (1 à 3.10^5 germes/ml de gélose) et **0,50 %** de la solution de triméthoprime.
- Déposer les rondelles de viande et le témoin positif **sulfadimérazine**.
- Incuber à **37°C** pendant au moins **24 heures**.
- Après incubation, les témoins positifs doivent présenter une zone d'inhibition de **6 ± 1 mm**.

ML 8 : *Micrococcus luteus* (*Kocuria rhizophila*) – Testagar pH 8

- Ensemencer le milieu avec **1 %** de la suspension de germes préalablement diluée au 1/10 (1 à 3.10^5 germes/ml de gélose).
- Déposer les rondelles de viande et le témoin positif **érythromycine**.
- Incuber à **37°C** pendant au moins **24 heures**.
- Après incubation, les témoins positifs doivent présenter une zone d'inhibition de **4 ± 1 mm**.

12 Bibliographie

-