Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und

Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 75 (1984)

Heft: 1

Artikel: Identification et estimation semi-quantitative de substances

antimicrobiennes dans les aliments pour animaux = Identification and

semi-quantitative estimation of antimicrobial substances in feed

Autor: Gafner, J.-L. / Jordan, F.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982693

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

J.-L. Gafner et F. Jordan, Station fédérale de recherches sur la production animale, Grangeneuve, Posieux

Identification et estimation semi-quantitative de substances antimicrobiennes dans les aliments pour animaux

Identification and Semi-quantitative Estimation of Antimicrobial Substances in Feed

Introduction

Il n'existe pas de méthode standardisée dans le domaine du contrôle analytique des additifs antimicrobiens non médicamenteux dans les aliments pour animaux. Chaque laboratoire confronté à ce problème utilise ses propres recettes et méthodes, les conditions pouvant considérablement varier d'un pays à l'autre. En Suisse, la Station fédérale de recherches sur la production animale, Grangeneuve, Posieux, est responsable de l'enregistrement, de l'homologation et du contrôle de ces additifs en application de la loi fédérale sur l'agriculture du 3 octobre 1951.

Il existe actuellement dans notre pays 26 substances antimicrobiennes homologuées pour l'alimentation animale. On distingue 9 antibiotiques, 10 anticoccidiens et 7 substances chimiothérapeutiques. 12 substances sur les 26 ont une activité antibiotique aux concentrations d'utilisation. Nous proposons dans un système simplifié une identification relativement rapide par voie microbiologique de ces substances. En outre, tout en excluant la recherche systématique des médicaments dont le contrôle incombe à l'OICM, ce système permet de détecter les traces et l'adjonction éventuelle de substances médicamenteuses. En particulier, notre contrôle analytique inclut la chlortétracycline, interdite comme stimulateur de croissance, mais parfois présente dans les aliments à la suite de contaminations. Le système proposé permet donc de détecter 13 substances.

Dans ce type d'analyses, on fait appel généralement aux principes suivants:

- diffusion d'une substance dans l'agar-agar
- séparation par CCM (Chromatographie sur couche mince)
- bioautographies
- électrophorèse à haute tension, puis révélation par un micro-organisme

- méthodes HPLC
- tests de développement de couleurs.

Nous décrivons une démarche faisant appel aux trois premiers principes énoncés.

Méthode

Les méthodes microbiologiques, peu automatisables, demeurent relativement lourdes et nécessitent un personnel qualifié et spécialisé. Leur application requiert un soin et une minutie particulière (1, 2). Pourtant la sensibilité de l'organisme-test vis-a-vis de l'activité antibiotique de telles substances donne à ces bactéries le rôle de «détecteurs» de choix dans cette détermination.

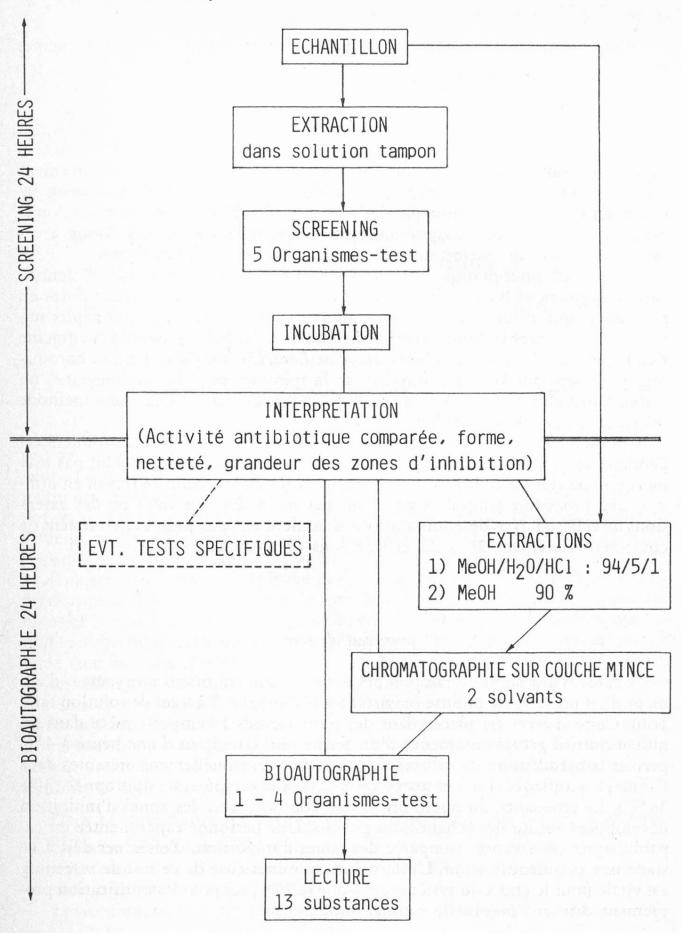
On connaît pour pratiquement toutes les substances des méthodes d'identification. Nous nous bornerons ici à ne citer que celles que nous avons mises en pratique et qui utilisent la chromatographie sur couche mince ou sur papier suivie de bioautographie. Pour l'avoparcine Bucher et Tischler (3); pour la bacitracine Pitton (4); pour la tylosine et la spiramycine Louis (5) complétée par une chromatographie séparant la virginiamycine de la tylosine; pour la salinomycine, un système mis au point par Vertesy (6). Enfin pour les tétracyclines, une méthode officielle parue dans le Bulletin de la CEE (7).

Ces méthodes spécifiques, aussi satisfaisantes qu'elles soient, occasionnent cependant des manipulations et des préparations fastidieuses qui ne sont pas toujours compatibles avec le travail de routine. Nous avons réduit ce travail en utilisant une procédure simplifiée basée sur des méthodes existantes ou des extensions de celles-ci. Nos déterminations se déroulent en deux jours et permettent de contrôler idéalement 20 à 25 échantillons (Tableau 1).

1er jour: test de screening

A l'aide d'une solution tampon pH 6, nous confectionnons une «pâtée» d'aliment dans un verre de montre (environ 5 g d'aliment + 7 à 8 ml de solution tampon). Cette «pâtée» est placée dans des puits creusés à l'emporte-pièce dans un milieu nutritif gélosé ensemencé d'un germe test. Un séjour d'une heure à 4 °C permet la prédiffusion de substances inhibitrices éventuellement présentes dans l'aliment. La plaque ainsi préparée est placée à la température appropriée (30–36 °C). La croissance du micro-organisme contraste avec les zones d'inhibition développées autour des échantillons positifs. Une personne expérimentée est capable, après observation comparée des zones d'inhibition, d'effectuer déjà à ce stade une pré-identification. L'interprétation minutieuse de ce test de screening est vitale pour le choix du système appliqué le 2ème jour pour l'identification proprement dite et l'éventuelle estimation.

Tableau 1. Schéma d'analyse



CCM

On prépare un extrait de l'aliment dans un tube à centrifuger de 50 ml: 10 g d'aliment + 20 ml de solvant approprié sont agités 15 minutes. Après centrifugation, $2 \times 25 \mu l$ de surnageant sont appliqués sur couche mince (Schleicher et Schüll No 394632).

Bioautographie

Après développement dans le solvant correspondant, la CCM est séchée puis appliquée sur la surface d'une gélose nutritive ensemencée du germe-test sensible. Le tableau 2 indique les différentes combinaisons utiles à notre système. La présence de la substance antimicrobienne se traduit par une inhibition de la croissance de l'organisme-test au niveau R_f correspondant.

Estimation semi-quantitative

L'application de la méthode de Bucher et Tischler (3) pour la recherche d'avoparcine donne simultanément sur le même germe-test des zones d'inhibition nettes et régulières pour la furazolidone. La surface de ces zones est directement proportionnelle, dans un domaine donné, à la concentration de cette substance dans l'aliment. Cette observation nous a conduit à l'extension de la même procédure pour l'identification d'autres types d'antibiotiques, en leur adaptant l'organisme-test correspondant. L'introduction d'un second système d'extraction et de CCM nous a permis de couvrir toutes les substances à activité antibiotique pouvant être présentes dans un aliment.

L'estimation semi-quantitative a été rendue possible par la confection d'aliments témoins contenant les substances suspectées dans le domaine de concentration approprié, vérifié par dosage spécifique. La comparaison des surfaces des zones d'inhibition de l'aliment et du témoin permet cette estimation pour un certain nombre de ces substances (tableau 2).

Résultats

Les résultats semi-quantitatifs issus de notre procédure ont été comparés avec les résultats des déterminations quantitatives spécifiques pour les antibiotiques tylosine, virginiamycine et avoparcine. Pour la furazolidone, les comparaisons ont été faites avec la méthode de dosage par HPLC. Les tableaux 3 et 4 exposent ces résultats en détail.

Ces premiers résultats comparatifs permettent, dans la plupart des cas, d'avoir une estimation satisfaisante de la concentration de la substance dans l'aliment. Toutefois, les valeurs de l'estimation ne reposant que sur la lecture de deux zones d'inhibition, elles gardent une valeur très relative par rapport à celle fournie par

Tableau 2. Bioautographies

Substances	Extrac- tion	Chroma- togra- phie	Organismes-test	R _f (approx.)	Lectures
Avoparcine Chlortétracycline Furazolidone Nitrovine (Lasalocid, monensine,	1)	(A)	B. subtilis ATCC 6633	0,1 0,45 0,50 0,75	semi-quant qual. semi-quant qual.
salinomycine)				0,8-0,9	qual.
Avoparcine Spiramycine Bacitracine Chlortétracycline	1	(A)	Corynebacterium xerosis	0,1 0,25 0,40 0.45	semi-quant qual. qual. qual.
Tylosine Virginiamycine	antes da, cas		NCTC 9755	0,50 0,75	semi-quant semi-quant
Spiramycine Tylosine Virginiamycine	1)	(A)	Micrococcus luteus ATCC 9341	0,25 0,50 0,75	qual. semi-quant semi-quant
Flavomycine Nitrovine Furazolidone Monensine Salinomycine Narasine Lasalocide	2	® dév. 15 cm	Staphylococcus aureus ATCC 9144 Bacillus subtilis ATCC 6633	0 0,20 0,40 0,50 0,60 0,70 0,90	qual. qual. semi-quant semi-quant semi-quant semi-quant semi-quant

Solvants a) Extraction

① MeOH/H₂O/HCl conc.: 94/5/1

2 MeOH 90%

b) Chromatographie

Butanol-(1)/MeOH/Acide oxalique 0,8%: 40/10/25 B Acetate d'éthyle/Benzène/Isopropanol : 36/ 4/1

le dosage spécifique. Cette dernière est en effet obtenue après la lecture de 36 zones d'inhibition.

Tableau 3. Comparaison des résultats de l'estimation semi-quantitative et du dosage spécifique (en mg/kg)

Furazol	idone	Tylo	sine	Virginia	mycine	Avopa	arcine
Estimation	Dosage	Estimation	Dosage	Estimation	Dosage	Estimation	Dosage
140	139	40	39	45	38	15	13
50	48	50	48	10	9	20	24
100	83	23	22	8	10	25	31
95	87	42,5	48	18	16	10	13
80	72	40	43	18	15	20	24
70	72	45	58	21	23	15	13
55	57	20	19	40	38	52,5	59
20	18	100	117	45	26	50	54
50	54	15	22	50	44	9	6
55	71	30	25	45	24	10	8
75	87	50	43	32,5	31		
45	47	15	17	40	38	8.0	
70	66	55	67	10	12		
40	28	17	20	30	47		
35	47	15	14	12	9		
50	38	14	19	15	19		
75	63	28	35	10	9		
45	35	42	49				
45	33	40	24				
70	65	20	24				
87,5	85	15	13				
20	18	15	13	3 - 3 - 5			
50	51	15	20	7- 31-8-8-1			
60	73	27,5	24				
90	83	50	41	10 2117 S E4115		100 M 10 M	
40	41	50	43	stress about		Consultation (
60	52	50	65	935Kill 10 E		V 11 /235	
75	74	100	101	principal pal		141 000 SS 2 D	
60	62	18	19	M MED PACE		2012	
42,5	43	15	20	Chair Marin		2 - 3 - 1325	
50	51	50	44			i villa nose	
20	29	25	15			35-1-27-34	
80	79	20	14			Lines Barrie	
50	59	20	20	th solike		ib, teer stri	
50	52	40	36	ly - magin		on skinning	
35 10	37 17	15	15	map., 180		nathan j	

Tableau 4. Différences entre les estimations semi-quantitatives et les dosages

Substance	Moyenne des erreurs relatives	Moyenne des erreurs absolues	Erreurs extrêmes - 41% à + 43%	
Furazolidone (37 échantillons)	12,2%	1,6%		
Tylosine (36 échantillons) 17,5%		- 1,3%	- 32% à + 66%	
Virginiamycine (17 échantillons) 23,3%		+ 11,2%	- 36% à + 87%	
Avoparcine (10 échantillons) 20,5%		- 0,5%	- 26% à + 50%	

Les erreurs d'estimation e ont été calculées en %, selon la formule suivante:

$$e = \left(\frac{E}{D} \cdot 100\right) - 100$$

E = concentration estimée en mg/kg

D = résultat de l'analyse quantitative spécifique en mg/kg

Discussion

Nous ne prétendons pas présenter de nouveauté particulière dans une analytique bien connue mais demeurant assez lourde. Notre intention est de réduire au plus les opérations tout en obtenant le maximum d'informations sur un aliment. Cette simplification est d'abord réalisée au niveau des extractions. Le même extrait utilisé sans délai permet déjà l'identification de tout un spectre d'antibiotiques. L'introduction d'une seconde solution d'extraction simple nous a permis de déceler toutes les substances à activité antibiotique.

Dans le cas où notre procédure permet l'estimation de la concentration, ce résultat ne peut toutefois remplacer un résultat obtenu par dosage spécifique. Il permet pourtant d'avoir une bonne idée de l'ordre de grandeur de cette concentration et peut servir de base pour un dosage spécifique. Dans bien des cas cependant, on peut renoncer à effectuer le dosage si les échantillons apparaissent conformes par cette approche.

Il persiste tout de même plusieurs désavantages dans notre procédure; certaines chromatographies peuvent durer six heures (solvant A). Il arrive aussi que des substances montrent un comportement inconstant, rendant leur identification hasardeuse (spiramycine).

Conclusions

Nous pensons que les méthodes microbiologiques doivent encore garder de leur importance dans ce genre d'analyses. Toutefois, l'association avec des techniques plus sensibles et plus récentes, comme les techniques HPLC, devraient tôt ou tard nous donner une procédure permettant de compléter encore cette recherche en l'étendant aux substances à activité antibiotique faible ou nulle.

Résumé

Une procédure simplifiée pour l'identification et l'estimation semi-quantitative d'additifs non médicamenteux dans les aliments pour animaux est proposée pour le contrôle analytique de routine. Elle permet de vérifier par voie microbiologique 13 substances ayant une activité antibiotique. Des résultats semi-quantitatifs peuvent être obtenus après 48 heures pour 8 substances.

Zusammenfassung

Eine Methodik zur Vereinfachung der Identifizierung und halb-quantitativen Schätzung nicht medikamentöser Zusatzstoffe in Futtermitteln für die Routinekontrollanalyse wird vorgestellt. Durch mikrobiologische Verfahren erlaubt sie, 13 Substanzen mit antibiotischer Aktivität zu prüfen. Halb-quantitative Ergebnisse können für 8 Zusatzstoffe innert 48 Stunden erhalten werden.

Summary

A simplified procedure for the identification and semi-quantitative estimation of non medicated additives in feed is proposed for routine analytical control. It allows checking microbiologically 13 substances bearing antibiotic activity. Semi quantitative results can be obtained after 48 hours for 8 substances.

Bibliographie

- 1. Billon, J. et Tao, S. M.: Recherche des antibiotiques et des résidus de substances à activité antimicrobienne dans les aliments. R. T. V. A. 164, 9-17, 1980.
- 2. Kavanagh, F. and Ragheb, H. S.: Microbiological assays for antibiotics and vitamins: Considerations for assuring accuracy. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 943-950, 1979.
- 3. Bucher, E. und Tischler, J.: Identifizierung von Avoparcin in Mischfuttermitteln mittels Dünnschichtchromatographie. Landwirtsch. Forsch. 34, 166–173, 1981.
- 4. Pitton, J.-S.: Séparation chromatographique de quelques antibiotiques et dosage microbiologique de la néomycine. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève. Thèse No 1390, 1965.

- 5. Louis, R.: Identifizierung der Makrolidantibiotika Oleandomycin, Spiramycin und Tylosin in Mischfutterproben. Schweiz. Landw. Forsch. 11, 359–362, 1972.
- 6. Vertesy, L.: Dünnschichtchromatographischer Vergleich einiger antibiotischer Futtermittelzusätze. Interner Versuchsbericht, Firma Hoechst, Salinomycin-Dossier. (Nicht publiziert!)
- 7. Anonyme: Nachweis und Identifizierung von Antibiotika der Tetracyclingruppe. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 123/18, 29. 5. 1972.

J.-L. Gafner
F. Jordan
Station fédérale de recherches
sur la production animale
Grangeneuve
CH-1725 Posieux