Détection des antibiotiques dans le lait

Identification et dosage par la méthode électrophorétique

par

J. BILLON et Seng Huor TAO*

I. INTRODUCTION

La détection de la présence des antibiotiques dans les laits destinés à la consommation humaine constitue actuellement un des objectifs majeurs des Laboratoires officiels de contrôle.

Les recherches effectuées par les laiteries et les laboratoires interprofessionnels laitiers visent également à éliminer ces laits des ateliers de pasteurisation et à les orienter vers l'utilisation pour l'alimentation animale ou des traitements thermiques élevés assurant la destruction des antibiotiques présents.

L'intérêt de cette action est souligné par un communiqué de Presse de l'O.M.S. du 28 octobre 1977 qui rappelle la résistance croissante des entérobactéries aux antibiotiques et déplore l'utilisation incontrôlée des antibiotiques chez l'homme et chez l'animal qui accélère l'apparition des antibiorésistances réduisant ainsi à néant la raison d'être et l'efficacité de ces médicaments.

La détection des antibiotiques constitue donc un élément essentiel de l'action entreprise pour la protection du consommateur, elle doit être assez sensible pour mettre en évidence les plus faibles quantités d'antibiotiques présentes et aussi fidèle que possible pour éliminer les « faux positifs », c'est-à-dire les laits renfermant les substances inhibitrices naturelles.

Outre la détection il est également très intéressant d'identifier le ou les antibiotiques présents et de les doser éventuellement.

En effet l'identification permet de reconnaître ceux qui sont ordinairement employés en thérapeutique humaine (pénicilline, terramy-

* Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire, 43, rue de Dantzig - 75015 Paris.

cine, chlortétracycline, etc.) et qui risquent d'induire les antibiorésistances les plus dangereuses pour le consommateur.

Le dosage, lorsque les teneurs révélées se montrent particulièrement élevées, permet la saisie pure et simple de ces laits et d'autre part assure aux enquêteurs, à partir de laits de mélange, la possibilité de « remonter à la source » par une étude de dichotomie et de retrouver le ou les fournisseurs responsables qui peuvent alors être sanctionnés conformément aux textes réglementaires.

II. METHODES DE DETECTION DE LA PRESENCE D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Deux méthodes principales sont actuellement utilisées par les différents laboratoires de contrôle :

- La méthode de Galesloot et Hassing basée sur la diffusion des antibiotiques, à partir d'un disque inhibé de lait, sur une gélose ensemencée par *Bacillus stearothermophilus*.

- La méthode dite « Delvo-test » basée également sur l'inhibition du développement de *B. stearothermophilus* se traduisant par l'absence d'acidification révélée par un indicateur coloré dans un milieu gélosé placé en ampoule.

Nous ne décrirons pas le détail de ces techniques largement utilisées et qui assurent en général une détection satisfaisante des antibiotiques usuels, à condition d'assurer au préalable la destruction des substances inhibitrices naturelles, éventuellement présentes dans le lait, en portant l'échantillon à tester à 80° C pendant 5 mn.

Par ailleurs ces méthodes ont été mises au point à une époque où les deux antibiotiques recherchés étaient la pénicilline et accessoirement l'auroémicine.

La limite de détection pour la pénicilline est de 0,01 UI/ml par la méthode de Galesloot et de 0,005 UI/ml par le Delvo-test, pour l'auroémicine de 0,4 µg/ml environ par l'une et l'autre méthode.

Par contre pour le chloramphénicol la limite de sensibilité descend à 10 ou 20 µg/ml par ces deux méthodes et pour les tétracyclines à 0,5 µg/ml. A la fin de l'exposé rassemblant nos travaux on trouvera un tableau qui montre les limites de sensibilité obtenues avec notre technique ; elles sont les suivantes :

— pénicilline	0,0005 UI/ml
— chloramphénicol	2,5 µg/ml
— streptomycine	0,1 µg/ml
— chlortétracycline	0,05 µg/ml
— terramycine	0,05 µg/ml
— néomycine	0,1 µg/ml

Nous voyons donc que la limite de sensibilité a été largement abaissée par l'emploi de la méthode électrophorétique.

Nous allons voir que cette technique permet en outre de classer les principaux antibiotiques utilisés et de les doser.

Les autres techniques de détection ne permettent pas de distinguer les antibiotiques présents (à l'exception de la pénicilline par l'emploi de pénicillase) et en aucun cas de les doser. Ces méthodes permettent tout au plus de voir si on se trouve à la limite de la détection, dans les cas où le résultat apparaît comme faiblement positif. Au-delà la réponse obéit à la loi du « tout ou rien » et il n'y a pas de différence dans l'appréciation des résultats entre un lait titrant 0,01 UI/ml de pénicilline et celui qui en recèle 1 UI/ml.

III. PRINCIPE DE LA METHODE ELECTROPHORETIQUE

Les échantillons de lait sont déposés, à raison de 0,1 ml pour chacun d'eux dans une cupule creusée dans l'épaisseur d'une couche de gélose étalée sur une plaque de verre horizontale, les deux extrémités de la couche de gélose étant reliées par des ponts à une cuve renfermant un électrolyte. Après passage d'un courant électrique approprié, à partir d'électrodes, on obtient une différence de potentiel qui entraîne la migration des antibiotiques. Une deuxième couche de gélose ensemencée avec un micro-organisme-test révèle, après étuvage, la diffusion éventuelle des antibiotiques par l'inhibition de la croissance de ce micro-organisme.

Une recherche positive se traduit donc par la formation de zones claires, la forme de ces zones et le sens de leur migration (vers l'anode ou la cathode ou encore dans les deux sens pour la néomycine) renseignent sur la nature de l'antibiotique. Le diamètre de ces zones d'inhibition, est dans une limite de sensibilité déterminée, proportionnel à la concentration de l'antibiotique présent dans le lait. Ceci est un point essentiel car c'est celui qui permet le dosage.

La migration de l'antibiotique, avant sa révélation permet, en outre, d'assurer l'élimination des substances interférentes qui gênent la révélation et le dosage.

IV. PLAN DES ESSAIS

Afin d'obtenir une limite de détection aussi basse que possible et d'assurer un dosage satisfaisant nous avons étudié l'action de divers paramètres susceptibles d'influencer les résultats obtenus par la méthode électrophorétique selon l'antibiotique présent dans le lait.

Pour ce faire nous avons recherché, pour six antibiotiques actuellement les plus utilisés dans le traitement des mammites, l'influence des différents paramètres ci-après :

a) Milieu gélosé utilisé pour la migration, pH, tampon le mieux approprié.

b) Choix du micro-organisme-test pour la révélation microbienne.

c) Milieu gélosé employé pour la révélation après culture d'un micro-organisme test, pH, tampon le mieux approprié.

d) Influence des températures et des durées d'incubation.

e) Influence des diverses concentrations en antibiotiques.

V. MILIEUX UTILISES POUR LA MIGRATION

V.1. Gélose tamponnée à pH : 8,6

- gélose (Bacto-agar Difco) 10 g
 - tampon Véronal pH : 8,6 (V.1.1.) 1 000 ml
- Stériliser à 120° C pendant 15 mn

V.1.1. Tampon Véronal pH : 8,6 :

- diéthylmalonylurée sodée 5,15 g
 - diéthylmalonylurée acide 0,92 g
 - eau distillée 1 000 ml
- Ajuster à pH : 8,6

V.2. Gélose tamponnée à pH : 5

- gélose (Bacto-agar Difco) 15 g
 - tampon citrate pH : 5 (V.2.1.) 1 000 ml
- Stériliser à 120° C pendant 15 mn

V.2.1. Tampon citrate pH : 5

- acide citrique 2,10 g
 - hydroxyde de soude 1,7 ml
 - eau distillée 1 000 ml
- Ajuster à pH : 5

VI. MICRO-ORGANISMES-TEST

VI.1. *Bacillus cereus* ATCC 6452

VI.1.1. Entretien de la souche

Inoculer *B. cereus* sur gélose (VIII.1.) inclinée en tube, incubé pendant une nuit à + 30° C. Conserver ensuite la culture au réfrigérateur à + 4° C et repiquer tous les 14 j sur gélose inclinée.

VI.2. *Sarcina lutea* ATCC 9634 (*Micrococcus luteus*)

VI.2.1. *Entretien de la souche*

Inoculer *S. lutea* sur gélose (VIII.2.) inclinée en tube, incubé pendant 24 h à 30° C. Conserver ensuite au réfrigérateur à + 4° C et repiquer tous les mois sur gélose inclinée.

VI.3. *Bacillus stearothermophilus*, variété *calidolactis*,

souche C. 953

VI.3.1. *Entretien de la souche*

Inoculer *B. stearothermophilus*, sur gélose (VIII.3.) inclinée en tube, incubé pendant 48 h à + 55° C. Conserver ensuite au réfrigérateur à + 4° C et repiquer tous les 2 ou 3 mois sur gélose inclinée.

VII. MILIEUX DE CULTURE POUR LA REVELATION MICROBIENNE ET PREPARATION DE L'ENSEMENCEMENT

VII.1. *Bacillus cereus*

VII.1.1. *Milieu de culture pour la révélation microbienne*

— bacto antibiotic medium 4 (Difco) ajusté à pH : 9.

Stériliser à 120° C pendant 15 mn.

VII.1.2. *Préparation du milieu nutritif ensemené*

Ensemencer le milieu VII.1.1. fondu puis ramené à + 45° C avec 0,1 p. 100 d'une suspension de *Bacillus cereus* en eau physiologique amenée par dilution à une densité optique de 0,1 à $\lambda = 550$ nanomètres.

VII.2. *Sarcina lutea*

VII.2.1. *Milieu de culture pour la révélation microbienne*

— bacto antibiotic medium 4 (Difco) ajusté à pH : 9.

Stériliser à 120° C pendant 15 mn.

VII.2.2. *Préparation du milieu de culture ensemené*

Ensemencer le milieu nutritif (VII.2.1.) fondu et refroidi à + 45° C avec 0,1 p. 100 d'une suspension de *S. lutea* et eau physiologique amenée par dilution à une densité optique de 1,8 à $\lambda = 550$ nanomètres.

VII.3. *Bacillus stearothermophilus*

VII.3.1. *Milieu de culture pour la révélation microbienne*

— tryptone	5 g
— extrait de levure	2,5 g
— glucose	1 g
— gélose (Bacto agar Difco)	15 g
— eau distillée	1 000 ml

Ajuster à pH : 9

Stériliser à 120° C pendant 20 mn.

VII.3.2. *Préparation du milieu de culture ensemencé*

Ensemencer le milieu nutritif (VII.3.1.) fondu et refroidi à + 55° C avec le milieu liquide (VII.3.2.1.) ensemencé avec une anse de la culture sur gélose inclinée de *B. stearothermophilus*, et incubé 24 h à + 55° C.

Ajouter deux parties de culture liquide à cinq parties de milieu gélosé (VII.3.1.).

VII.3.2.1. *Milieu de culture liquide*

— tryptone	2 g
— Extrait de levure	1 g
— glucose	0,05 g
— eau distillée	100 ml

Ajuster à pH : 7 ($\pm 0,1$).

Stériliser à 120° C pendant 20 mn.

VIII. MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

VIII.1. *Gélose pour l'entretien de B. cereus*

— peptone tryptique	10 g
— extrait de viande	1,5 g
— extrait de levure	3 g
— glucose	1 g
— gélose	15 g
— tampon phosphate pH : 5,5 (VIII.4.)	10 ml
— eau distillée	1 000 ml

Ajuster à pH : 5,8.

Stériliser à 120° C pendant 20 mn.

VIII.2. Gélose pour l'entretien de *S. lutea*

— peptone tryptique	10 g
— extrait de viande	1,5 g
— Extrait de levure	3 g
— glucose	1 g
— gélose	15 g
— eau distillée	1 000 ml

Ajuster à pH : 6,6.

Stériliser à 120° C pendant 20 mn.

VIII.3. Gélose pour l'entretien de *B. stearothermophilus*

— peptone tryptique	5 g
— extrait de viande	1 g
— extrait de levure	2 g
— chlorure de sodium p.a.	5 g
— gélose	15 g
— eau distillée	1 000 ml

pH final : 7,4 ($\pm 0,1$).

Stériliser à 120° C pendant 20 mn.

VIII.4. Tampon phosphate pH : 5,5

— phosphate monopotassique KH_2PO_4	130,86 g
— phosphate disodique Na_2HPO_4 , 2 H_2O	6,94 g
— eau distillée	1 000 ml

IX. APPAREILLAGE

IX.1. Générateur de courant stabilisé, délivrant du courant continu assurant une tension de 150 volts avec un débit de 100 mA environ pour deux plateaux.

IX.2. Cuves à tampon parallélépipédiques de dimensions : 7/60 cm et 4 cm de profondeur.

IX.3. Fil de platine de 55 cm de longueur, monté sur une plaque rigide, pouvant être connecté à l'alimentation.

IX.4. Plaque de verre de dimensions 30 $\times$ 21 cm et 4 mm d'épaisseur accolée à un cadre de matière plastique de section carrée 15/15 mm.

IX.5. Bande de gaze pour ponts de 27 cm de longueur et 10 cm de largeur.

IX.6. Plateau monté sur trois vérins réglables.

IX.7. Emporte-pièce de 12 mm de diamètre, stérile.

X. PREPARATION DES ECHANTILLONS DE LAIT

Pour ces études nous avons utilisé du lait frais, où l'absence d'antibiotique avait été vérifiée au préalable, puis chauffé 5 mn à 80° C, conservé ensuite au réfrigérateur à 0° C ($\pm 1^\circ$ C).

Ce lait a été ensuite additionné de dilutions appropriées des différents antibiotiques, préparées à partir de solutions étalons en eau distillée stérile contenant 200 UI/ml pour la pénicilline et 100 μ g/ml pour les autres antibiotiques testés.

Nous avons ainsi préparé les concentrations suivantes par dilutions successives :

— pénicilline 0,05 UI	0,0005 UI/ml
— streptomycine 0,5 μ g	0,1 μ g/ml
— chloramphénicol 5 μ g	2,5 μ g/ml
— chlortétracycline 0,5 μ g	0,05 μ g/ml
— terramycine 0,5 μ g	0,05 μ g/ml
— néomycine 0,5 μ g	0,05 μ g/ml

A partir des échantillons de lait contenant ces différents antibiotiques aux concentrations indiquées ci-dessus, nous avons recherché la meilleure sensibilité en faisant varier les différents paramètres indiqués plus haut : tampon, pH, milieu gélosé, température et durée d'incubation, espèces microbiennes sensibles.

Dans tous ces essais deux points ont été constants : la quantité de lait placé dans les cupules (0,1 ml) et la quantité de la gélose tamponnée (100 ml).

XI. MODE OPERATOIRE

XI.1. Préparation du plateau pour l'électrophorèse

XI.1.1. *Ponts gélosés*

Au fond d'un plateau de 20 cm sur 30 cm disposer trois épaisseurs de bande de gaze de 27 cm de longueur et de 10 cm de largeur. Recouvrir avec de la gélose tamponnée fondue de façon à obtenir, après solidification de la gélose, des ponts gélosés de 1,5 à 2 mm d'épaisseur.

Selon les antibiotiques recherchés on utilisera la gélose tamponnée à pH : 8,6 (V.1.) ou la gélose tamponnée à pH 5 (V.2).

XI.1.2. *Plateau avec la gélose tamponnée*

Placer la plaque de verre sur le support et assurer une parfaite horizontalité au moyen de trois vérins réglables (IX.6.).

Aux deux extrémités de cette plaque disposer les ponts gélosés (XI.1.1.) de façon à assurer leur pénétration dans les cuves de solu-

tion électrolytique ; pour cela il est nécessaire que le quart environ de la largeur de la bande de gaze gélosée recouvre la bordure de la plaque, le reste plongeant dans le bac jusqu'à toucher le fond. Bien faire adhérer par pressions répétées, la surface de la plaque avec la bande de gaze gélosée.

Verser ensuite 100 ml de gélose tamponnée fondue et ramenée à + 60° C environ, laisser refroidir et figer. Découper à l'aide d'un emporte-pièce (IX.7.) six cupules de 12 mm de diamètre également espacées sur une ligne située à 6 cm de la cathode pour la recherche et le dosage de la pénicilline et de la néomycine et à 3 cm de l'anode pour les autres antibiotiques étudiés ici.

Obturer le fond de la cupule avec une goutte de gélose fondue (afin d'éviter qu'une partie du lait ajoutée ultérieurement ne fuse entre la gélose et la plaque de verre).

Introduire 0,1 ml d'échantillon de lait additionné d'antibiotique aux différentes concentrations.

Laisser évaporer quelques minutes et remplir le vide restant dans les cupules avec quelques gouttes de gélose tamponnée fondue de même composition que celle ayant servi à préparer la plaque.

Placer le plateau sur les cuves remplies de solution tampon.

XI.2. Migration

Appliquer aux électrodes de platine une tension de 150-160 volts de manière à obtenir au niveau de la gélose une différence de potentiel de 100 volts. Laisser migrer pendant 4 h sous une intensité de 40 mA pour un plateau.

XI.3. Révélation microbiologique

Après la migration la plaque est retirée des cuves et placée à nouveau horizontalement sur le support à trois vérins réglables.

Enlever les ponts de gélose et verser 100 ml de milieu de culture gélosé, ensemencé avec l'une des trois espèces microbiennes retenues.

Laisser refroidir et incuber le temps indiqué pour le milieu choisi.

XII. RESULTATS

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 1 qui résume les limites de détection et indique les limites proposées pour le dosage de l'antibiotique dans un échantillon de lait.

Au cours des essais effectués, pour chacun des antibiotiques testés, nous avons essayé les révélations microbiennes avec les trois espèces retenues : *B. cereus*, *S. lutea* et *B. stearothermophilus*, dans

TABLEAU 1

Antibiotique	Micro-organisme	Milieu gélosé tamponné (11-1) et tampon utilisé	Milieu pour la révélation (11-3)	Durée et température d'incubation	Intervalle des concentrations proposé
Pénicilline	<i>B. stearothermophilus</i> <i>S. lutea</i>	Gélose tamponnée pH 8,6 (5-1) Tampon véronal pH 8,6 (5-1-1)	Milieu Galesloot (7-3-1) Milieu pH 9 (7-2-1)	18 h + 55° C 24 h + 30° C	0,05 - 0,0005 UI/ml 0,2 - 0,05 UI/ml
Chloramphénicol	<i>S. lutea</i>	Gélose tamponnée pH 8,6 (5-1) Tampon véronal pH 8,6 (5-1-1)	Milieu pH 9 (7-2-1) (mêmes résultats avec milieu Galesloot (7-3-1))	24 h + 30° C	5 - 2,5 µg/ml
Streptomycine	<i>B. stearothermophilus</i> <i>S. lutea</i>	Gélose pH 8,6 - Tampon 8,6 Gélose pH 8,6 - Tampon 8,6	Milieu Galesloot (7-3-1) Milieu pH 9 (7-2-1)	18 h + 55° C 24 h + 30° C	0,5 - 0,1 µg/ml 0,5 - 0,1 µg/ml
Chlortétracycline	<i>B. cereus</i> <i>S. lutea</i> <i>B. stearothermophilus</i>	Gélose pH 5 (5-2) - Tampon 5 (5-2-1) Gélose pH 5 (5-2) - Tampon 5 (5-2-1) Gélose pH 5 (5-2) - Tampon 5 (5-2-1)	Milieu pH 9 (7-1-1) Milieu pH 8 (7-2-1) Milieu Galesloot (7-3-1)	24 h + 30° C 24 h + 30° C 18 h + 55° C	0,5 - 0,05 µg/ml 0,5 - 0,2 µg/ml 0,5 - 0,2 µg/ml
Terramycine	<i>B. cereus</i> <i>B. stearothermophilus</i>	Gélose pH 5 (5-2) - Tampon 5 (5-2-1) Gélose pH 5 (5-2) - Tampon 5 (5-2-1)	Milieu pH 9 (7-1-1) Milieu Galesloot (7-3-1)	24 h + 30° C 18 h + 55° C	0,5 - 0,05 µg/ml 1 - 0,5 µg/ml
Néomycine	<i>B. stearothermophilus</i> <i>S. lutea</i>	Gélose pH 8,8 (5-1) Tampon 8,6 (5-1-1) Gélose pH 8,8 (5-1) Tampon 8,6 (5-1-1)	Milieu Galesloot (7-3-1) Milieu pH 9 (7-2-1)	18 h + 55° C 24 h + 30° C	0,5 - 0,1 µg/ml 1 - 0,5 µg/ml

leur milieu de culture pour révélation : VII.1.1. pour *B. cereus*, VII.2.1. pour *S. lutea*, et VII.3.1. pour *B. stearothermophilus*. Nous n'avons indiqué dans ce tableau que les espèces microbiennes ayant donné une révélation positive.

Il ressort de ces résultats que :

- *Bacillus cereus* est indiqué pour la recherche et le dosage de la terramycine et de la chlortétracycline.

- *Sarcina lutea* est indiquée pour la recherche et le dosage du chloramphénicol, de la pénicilline, de la streptomycine et de la néomycine.

- *Bacillus stearothermophilus* est indiqué pour la recherche et le dosage de la pénicilline, de la néomycine et de la streptomycine.

Cependant l'ensemble de nos résultats nous indique que selon l'antibiotique à révéler puis à doser il faut choisir :

- *Pénicilline* : *B. stearothermophilus*, tampon véronal pH : 8,6.

- *Chloramphénicol* : *Sarcina lutea*, tampon véronal pH : 8,6.

- *Streptomycine* : *Sarcina lutea* ou *Bacillus stearothermophilus*, tampon véronal pH : 8,6.

- *Chlortétracycline* : *Bacillus cereus*, tampon citrate pH : 5.

- *Terramycine* : *Bacillus cereus*, tampon citrate pH : 5.

- *Néomycine* : *Bacillus stearothermophilus*, tampon véronal pH : 8,6.

Le tableau 2 montre que la sensibilité est augmentée de quatre à dix fois par rapport aux deux méthodes habituelles.

XIII. ASPECT DE LA ZONE D'INHIBITION

Après révélation microbiologique l'aspect de la zone d'inhibition permet d'orienter le diagnostic.

Seule la pénicilline migre vers l'anode.

La néomycine migre dans les deux sens : anode et cathode à partir de la cupule.

Tous les autres antibiotiques testés migrent vers la cathode.

La forme de la zone d'inhibition est caractéristique pour la néomycine qui donne une zone ovale très allongée, de part et d'autre de la cupule. La streptomycine donne également une zone allongée à une certaine distance de la cupule, vers l'anode.

TABLEAU 2

Sensibilité minimale des trois méthodes de détection des antibiotiques

Antibiotique		Delvotest*	Galesloot*	Méthode électrophorétique
Pénicilline	UI/ml	0,005	0,01	0,0005
Chloramphénicol	µg/ml	10	10	2,5
Streptomycine	µg/ml	5	5	0,1
Chlortétracycline	µg/ml	0,5	0,4	0,05
Terramycine	µg/ml	0,4	0,5	0,05
Néomycine	µg/ml	1	20	0,1

* Résultats donnés par le Laboratoire de Technologie Laitière, C.N.R.Z., Jouy-en Josas, novembre 1977.

XIV. DOSAGE DES ANTIBIOTIQUES

Après avoir révélé la présence d'antibiotiques dans un lait et orienté le diagnostic vers un antibiotique donné, il est possible d'effectuer le dosage dans l'échantillon considéré.

Comme nous l'avons indiqué on découpe, à l'aide d'un emporte-pièce stérile de 12 mm de diamètre, six cupules également espacées sur une ligne située à 6 cm de la cathode pour la pénicilline et la néomycine et à 3 cm de l'anode pour les autres antibiotiques.

Dans les cupules 1, 3 et 5 on porte 0,1 ml de l'échantillon de lait, dans les cupules 2, 4 et 6 : 0,1 ml de lait contenant la solution étalon d'antibiotique aux concentrations maximales, intermédiaires et minimales, d'après le tableau 1.

Ainsi on déposera selon l'antibiotique à doser :

- pour la pénicilline 0,05 ; 0,005 et 0,0005 UI/ml
- pour le chloramphénicol 5 ; 3,75 et 2,5 µg/ml
- pour la streptomycine 0,5 ; 0,25 et 0,1 µg/ml
- pour la chlortétracycline 0,5 ; 0,35 et 0,2 µg/ml
- pour la terramycine 0,5 ; 0,1 et 0,05 µg/ml
- pour la néomycine 0,5 ; 0,25 et 0,1 µg/ml

Après migration et révélation microbienne, on mesure le diamètre des zones d'inhibition, pour ce faire on prend deux mesures perpendiculaires pour chaque zone et on fait ensuite la moyenne.

Le diamètre de ces zones est proportionnel, dans la limite des gammes indiquées, à la quantité d'antibiotique présent.

Si le diamètre des zones obtenues à partir de l'échantillon dépasse celui de la plus forte concentration de solution étalon, diluer cet échantillon avec de l'eau distillée stérile et répéter l'opération.

Pour réaliser un dosage il est nécessaire d'opérer sur au moins quatre plaques et de faire la moyenne des résultats obtenus sur vingt-quatre zones.

Evaluation

Pour chaque concentration de la solution étalon (lait + antibiotique), enregistrer les mesures moyennes sur papier semi-logarithmique en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer la droite la mieux appropriée pour la concentration étalon.

Reporter le diamètre moyen des zones obtenues avec l'échantillon de lait (ou les dilutions effectuées avec l'échantillon de lait) et d'après la courbe étalon calculer la concentration de l'antibiotique recherché dans le lait examiné.

Si l'on prépare trois dilutions successives de l'échantillon de lait avec une raison deux (celle qui est toujours utilisée pour les concentrations de solution étalon) on peut alors déterminer, selon la méthode factorielle en trois points, le titre du lait examiné.

Reproductibilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées sur le même échantillon par le même analyste ne doit pas dépasser 20 p. 100 du résultat le plus élevé pour les teneurs inférieures à 20 ppm et 10 p. 100 pour les teneurs supérieures.

XV. CONCLUSION

La méthode proposée permet d'augmenter la sensibilité de la détection des antibiotiques présents dans le lait. Selon le ou les antibiotiques présents, la limite inférieure de détection est abaissée de quatre à dix fois.

Il est possible également, dans une certaine mesure, de déterminer la nature de l'antibiotique, bien que sur ce point, la technique proposée soit encore imparfaite et que la méthode actuellement la plus perfectionnée et la plus fidèle soit l'électrophorèse à haute tension.

Cette méthode nécessite un appareil générateur de courant continu assurant une tension de 0 à 3 000 volts avec un débit de 0 à 250 mA, des plateaux pour migration de 61×27 cm, un système de refroidissement du plateau pendant la migration abaissant la température à -35°C (ceci pour éviter le dessèchement et le craquellement de la gélose sous l'effet du passage du courant de haute tension).

On compare les distances de migration des antibiotiques (rf) par comparaison avec les substances étalon, il est également nécessaire de faire intervenir la sensibilité microbienne.

Cette technique, que nous utilisons, est encore du domaine de la recherche et ne peut être employée par la très grande majorité des laboratoires de contrôle, c'est pourquoi nous avons préféré rapporter une méthode plus facile, ne nécessitant pas des investissements importants.

Enfin, le dosage des antibiotiques est assez facile par la méthode électrophorétique que nous décrivons car celle-ci permet d'éliminer l'interférence de substances naturelles et aussi les graisses qui gênent le dosage, par séparation électrophorétique de l'antibiotique suivie d'une révélation microbiologique.

Nous pensons adapter très prochainement cette méthode à la recherche et au dosage des antibiotiques dans les viandes (et notamment dans le foie) ainsi que dans les œufs.

Summary

The proposed method makes it possible to increase the sensitivity of the detection of antibiotics existing in milk. According to the presence of the antibiotic (or antibiotics), the lower limit of detection is reduced from 4 to 10 times.

To a certain extent it is possible as well to determine the nature of the antibiotic, though the proposed method of investigation is not yet perfect, the best one, up to now, being high-voltage electrophoresis.

This method requires a generator of direct current giving a tension from 0 to 3000 volts and an output from 0 to 250 mA, migration plates of 61 per 27 centimeters, a cooling system of the plate during the migration, lowering the temperature down to -35°C (in order to avoid the drying out and the cracking of the agar-agar due to the passing of the high-voltage current).

Distances of migration of the antibiotics are compared to the standard substances, and it is necessary to take into account the microbial sensibility.

This process, which we are currently employing, is still experimental and cannot be used most control laboratories, and that is

why we have chosen to mention an easier method, which does not require important investments.

Lastly, the correct proportioning of antibiotics is rather easy in the electrophoresis method we describe, for it allows to discard the intrusion of natural substances as well as greases affecting the proportioning, through the electrophoretic separation of the antibiotic, followed by a microbiological revelation.

We think we shall be soon able to adapt this process to the investigation and proportioning of antibiotics in meat (particularly in liver) and eggs.

Reçu pour publication en mars 1979.

Bibliographie

1. C.N.E.R.N.A. (1968). — Instructions pour le paiement par les laiteries du lait cru réfrigéré à basse température suivant sa teneur en germes. *Rev. Lait. Française*, 254, 311-314.
2. C.N.E.R.N.A. (1971). — Instructions pour l'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru en vue de son paiement par les laiteries (lait non réfrigéré). *Rev. Lait. Française*, 283, 23-27.
3. C.N.E.R.N.A. (1971). — Instructions pour la détection des antibiotiques dans les laits livrés par les producteurs. *Rev. Lait. Française*, 290, 587-593.
4. ECKROUTTE (1978). — Antibiotiques et alimentation humaine. *Rev. Méd. Vét.*, 129, 5, 717-740.
5. GALESLOOT (Tr. E.) and HASSING (F.) (1962). — A rapid and sensitive paper disc method for the detection of penicillin in milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 16, 89-95.
6. JACQUET (J.) et STREEG (L.) (1952). — Détermination et titrage des antibiotiques présents dans le lait et les produits laitiers. *C.R. Ac. Agric.*, 38, 609.
7. JACQUET (J.) et RIQUIER (N.) (1968). — Recherche et titrage des antibiotiques dans le lait et les produits laitiers. Observations sur la méthode des disques. *Bull. Ac. Vét.*, 41.
8. JACQUET (F.) et RIQUIER (N.) (1968). — Recherche et titrage des antibiotiques dans le lait et les produits laitiers. II. Utilisation de la méthode des cavités. *Bull. Acad. Vét.*, tome XLI, 6, 237-247.
9. KOECH (B. P.) (1961). — A simple test for the detection of penicillin. *Austr. J. Dairy Technol.*, 16, 19-21.
10. MÉTHODE MICROBIOLOGIQUE DE DÉTERMINATION ET DE TITRAGE DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS (1953). — *Ann. Fals. et Fraudes*, 46, 5.
11. PRÉLÈVEMENT ET ANALYSE DES ÉCHANTILLONS DE LAIT (1971). *Journal Officiel* du 6 janvier.