

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 16 juin 2011

AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à la demande d'avis relatif aux méthodes d'analyses utilisées pour la
détection des antibiotiques ou des sulfamides dans les laits destinés à
l'alimentation humaine**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 10 février 2011 par la Direction Générale de l'Alimentation d'une demande d'avis relatif aux méthodes d'analyses utilisées pour la détection des antibiotiques ou des sulfamides dans les laits destinés à l'alimentation humaine.

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans les avis du 19 Novembre 2009 (Afssa – Saisine n°2009-SA-0154) et du 17 Novembre 2010 (Anses – Saisine n°2010-SA-0201), il a été indiqué que la stratégie actuelle de détection des résidus d'antibiotiques, fondée sur la recherche d'inhibiteurs, devait être revue. Elle met en effet l'accent sur la capacité de détection des bétalactamines, source majeure de problèmes en transformation laitière, et des tétracyclines, mais ne prend pas en compte les usages actuels d'autres familles d'antibiotiques (fluoroquinolones, macrolides notamment) chez les femelles laitières.

La DGAI souhaite faire évoluer en conséquence la stratégie de détection des résidus d'antibiotique dans les laits destinés à l'alimentation humaine, en complétant le dispositif existant pour le mettre en conformité avec le contexte réglementaire actuel. Cette demande est formulée en vue de la révision, fin 2011, de l'accord interprofessionnel national relatif à la présence d'inhibiteurs dans le lait, qui fait l'objet d'une homologation par les pouvoirs publics.

Le CNIEL souhaite pour sa part faire évoluer la méthode de confirmation utilisée pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait. Il a transmis un projet de cahier des charges relatif à la « sélection d'un test de confirmation des résidus d'antibiotiques ou de sulfamides dans le lait à mettre en œuvre suite à un résultat positif à un test de dépistage (cf. document joint CNIEL IG INH 05). Il s'agit en particulier de mettre en cohérence les capacités de détection de la méthode de dépistage avec celles du test de confirmation, et d'apporter des garanties sur le respect des limites maximales de résidus imposées par la réglementation.

L'amélioration des performances du test de confirmation, qui élargit les familles de molécules à cibler, rend nécessaire la réévaluation des méthodes utilisées pour le dépistage, qui conduira à une évolution de la stratégie de détection actuelle.

Par saisine du 10 Février 2011, la Direction Générale de l'alimentation a posé à l'Anses les questions suivantes:

« Le projet d'évolution de la méthode de confirmation proposée par le CNIEL est-il pertinent du point de vue de la réglementation et de la sécurité sanitaire ? »

« Afin de mettre en place une nouvelle stratégie pour la détection des résidus d'antibiotiques, nous souhaitons établir une liste précise des familles d'antibiotiques et des molécules à prendre en considération de façon prioritaire. Pouvez-vous indiquer quelles sont les molécules les plus à risques en termes de santé publique (problématiques liées aux résidus, aux allergies et à l'antibiorésistance) ? »

L'expertise a été menée sur la base des données disponibles au niveau de l'Agence Nationale des Médicaments Vétérinaires » en matière d'utilisation des antibiotiques en production bovine, des documents publics accessibles auprès de l'Agence Européenne du Médicament et des données transmises par le CNIEL sur la stratégie de dépistage des résidus d'inhibiteurs dans le lait et la connaissance acquise par le laboratoire de Fougères en matière de performance des méthodes analytiques.

3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'avis a été élaboré par le directeur du laboratoire de Fougères et les scientifiques de l'unité « Résidus des médicaments vétérinaires » en relation avec l'équipe en charge du suivi des consommations d'antibiotiques de l'Agence Nationale du Médicaments Vétérinaire. La chef de service Assistance et Harmonisation des Laboratoires du CNIEL¹ a été auditionnée le 4 mai sur les modalités d'auto-contrôle des inhibiteurs dans le lait et a transmis les données relatives à l'auto-contrôle et aux méthodes susceptibles d'être sélectionnées comme test de confirmation.

4. ANALYSE ET CONCLUSION

Ces dernières années, le CNIEL a fait évoluer la stratégie d'auto-contrôle en modifiant le test de dépistage utilisé pour l'auto-contrôle des producteurs. Après plusieurs années d'utilisation de tests de dépistage ayant des performances comparables, le CNIEL a choisi en 2010 d'utiliser pour 3 ans le test de dépistage Eclipse 3G® sur la base d'une étude comparative des performances de différents tests inhibiteurs sur le marché. Ce test présente une meilleure capacité de détection des tétracyclines et d'autres antibiotiques. Les premiers résultats obtenus en 2011 montrent des taux nettement plus élevés de positifs en partie explicable par des problèmes de mise en place technique, mais pouvant être également associés à une meilleure sensibilité à la famille des tétracyclines. Le CNIEL propose de remplacer les tests dits de « confirmation » basés sur la recherche d'inhibition de croissance sur gélose de deux germes tests par une combinaison de tests

¹ Centre national interprofessionnel de l'économie laitière

rapides de détection orientés par familles (bétalactamines, tétracyclines, sulfamides, aminoglycosides, etc).

L'évolution proposée est jugée pertinente compte tenu des familles d'antibiotiques les plus fréquemment utilisées en élevage laitier en France. Le risque majeur de contamination laitière est associé à des formulations d'antibiotiques administrées par voie intramammaire et les études de consommation montrent que les familles à rechercher sont celles des bétalactamines, des céphalosporines et des tétracyclines pour lesquelles des tests rapides de détection sont disponibles. D'autres classes d'antibiotiques leur sont associés (polypeptides, aminoglycosides) et peuvent agir en synergie. Dans le cas de ces associations, la détection de la molécule ayant la limite maximale de résidus (LMR) la plus basse semble la meilleure approche en termes d'auto-contrôle.

Des traitements à base de macrolides et de fluoroquinolones sont également à prendre en compte. Peu ou pas de tests rapides sont aujourd'hui disponibles pour ces familles. Une analyse par une méthode physico-chimique des échantillons dépistés positifs, non confirmés par les tests rapides « Bétalactamines » et « Tétracyclines » mais positifs avec le germe test *B. subtilis*, pourrait nous renseigner sur l'implication d'autres familles dans ces résultats et sur la pertinence de développer des tests rapides adaptés.

La liste des familles d'antibiotiques et des molécules mises sur le marché pour le traitement des bovins et plus particulièrement des femelles en lactation a été passée en revue en termes de risques pour la santé publique en résumant les évaluations de l'Agence Européenne du Médicament disponibles sur son site mais nous n'avons pas pris en compte les notions d'antibiotiques critiques pour la médecine telle que définie par les organisations internationales (FAO/WHO/OIE, 2008). Pour la plupart des molécules, la dose journalière admissible est basée sur leur effet antibactérien et le risque de perturbation de la flore intestinale ou de sélection de bactéries résistantes. Quelques molécules ont une dose journalière admissible (DJA) dérivée de leur profil toxicologique. Le risque allergique est pris en compte dans la plupart des analyses toxicologiques. Le niveau de résidus est considéré comme insuffisant pour sensibiliser les consommateurs, mais pourrait parfois atteindre, si la LMR est dépassée, des niveaux de doses déclenchant une réaction allergique (pénicillines).

Une évaluation des consommations des familles d'antibiotiques chez les bovins et plus particulièrement les femelles laitières a été réalisée et permet de déterminer les molécules les plus fréquemment utilisées en France et donc à prendre en compte dans les évaluations de performance de tests pour le contrôle et l'auto-contrôle du troupeau. Le risque de dépassement de la LMR est estimé pour les pommades intramammaires administrées en lactation ou au tarissement par leur pouvoir contaminant, c'est à dire la quantité de lait potentiellement contaminée à la LMR avec un traitement. Pour les autres formulations, nous avons pris le temps d'attente comme estimateur du potentiel de contamination. Mais en absence de données, nous n'avons pas pris en compte les utilisations hors AMM tout en sachant que ces usages existent de manière marginale (Fabre et al, 1996, Cazeau et al, 2009). L'analyse de ces usages en fonction du pouvoir contaminant des différents principes actifs confirme la pertinence de la stratégie proposée par le CNIEL de mettre en place des tests de dépistage rapide bétalactamines, céphalosporines et tétracyclines. Le risque de présence d'autres classes d'antibiotiques semble nettement plus faible au regard des données d'usage et du pouvoir contaminant.

Jusqu'à maintenant, les études de performance des méthodes d'auto-contrôle n'ont pas été réalisées dans le contexte national d'usage des antibiotiques, et des études complémentaires seront donc à réaliser en collaboration avec le CNIEL pour étudier la pertinence de ces tests par rapport à l'éclairage apportée par la réponse à cette saisine et pour évaluer les performances des laboratoires interprofessionnels via les essais interlaboratoires. Les données issues de la surveillance de la consommation des antibiotiques réalisée par l'ANMV montrent que ces usages ont évolué au cours de la précédente décennie et que le changement de stratégie proposé par l'interprofession est pertinent dans un objectif de protection de la santé publique.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

A la question posée : « Le projet d'évolution de la méthode de confirmation proposée par le CNIEL est-il pertinent du point de vue de la réglementation et de la sécurité sanitaire ? »,

- La réponse de l'agence est que cette évolution est pertinente du point de vue de la réglementation et de la sécurité sanitaire.

A la question posée : « Afin de mettre en place une nouvelle stratégie pour la détection des résidus d'antibiotiques, nous souhaitons établir une liste précise des familles d'antibiotiques et des molécules à prendre en considération de façon prioritaire. Pouvez-vous indiquer quelles sont les molécules les plus à risques en termes de santé publique (problématiques liées aux résidus, aux allergies et à l'antibiorésistance) ? »

La réponse de l'agence est que l'analyse des molécules commercialisées montre que les tétracyclines, les bétalactamines et les céphalosporines sont les familles de molécules les plus fréquemment prescrites et constituent les familles les plus à risques en termes de santé publique.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail conclue que l'évolution de l'auto-contrôle proposée par le CNIEL améliore la détection dans le lait des résidus des familles d'antibiotiques les plus à risque et accroît la protection de la santé publique.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail recommande de maintenir l'usage du test dit de confirmation « *Bacillus Subtilis* » pour l'analyse de confirmation des laits détectés avec le test de première intention mais non confirmé par les tests rapides. Il recommande que des études complémentaires sur ces laits soient mises en œuvre en partenariat avec le laboratoire national de référence pour caractériser les molécules présentes et évaluer la pertinence de développement de nouveaux tests.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

P.J. : Annexe à la saisine 2011-SA-0038

MOTS-CLES

Mots clés :

LAIT, AUTO-CONTROLE, RESIDUS, ANTIBIOTIQUES

Annexe

à la réponse de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relativ à la demande d'avis relatif aux méthodes d'analyses utilisées pour la détection des antibiotiques ou des sulfamides dans les laits destinés à l'alimentation humaine

Saisine 2011-SA-0038

EXPOSITION DES VACHES LAITIERES AUX ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques peuvent être administrés chez la vache laitière par voie orale, parentérale et locale (essentiellement intramammaire, intra-utérine) pour le traitement d'infections à germes sensibles.

Les données de surveillance de l'utilisation des antibiotiques réalisée par l'ANMV permettent d'analyser les traitements administrés par voie intramammaire pour les produits utilisés en lactation et au tarissement. Un traitement en lactation équivaut au nombre d'injecteurs prescrits pour le traitement d'un quartier infecté. Un traitement au tarissement équivaut aux 4 injecteurs administrés simultanément dans les 4 quartiers de la mamelle pour le traitement d'un animal.

Les quantités d'antibiotiques prescrits par voie parentérale sont calculées pour l'ensemble du troupeau bovin (vaches laitières, vaches allaitantes, génisses et mâles castrés ou non, veaux). Ces données permettent d'estimer la quantité de poids vif potentiellement traitée. Ils permettent de hiérarchiser les molécules potentiellement utilisables chez des femelles productrices de lait.

TRAITEMENTS INTRAMAMMAIRES EN LACTATION

Les traitements intramammaires en lactation sont les traitements présentant le risque le plus élevé de contamination du lait. En effet, ils sont prescrits pour le traitement des mammites cliniques et sub-cliniques chez des femelles en production. La dose administrée dans un quartier sera éliminée essentiellement par le lait. La décroissance des concentrations après la dernière administration s'effectue selon une courbe d'élimination exponentielle mono ou multiphasique.

L'identification des animaux traités permet d'éviter la collecte du lait contaminé pendant la durée du temps d'attente. Le lait contaminé est collecté dans un pot mis en dérivation. Il est recommandé de traire les animaux traités en fin de troupeau.

Une erreur de collecte, une erreur de manipulation du dispositif de dérivation ou le non respect du temps d'attente peut entraîner la contamination d'un lait de tank.

TRAITEMENTS INTRAMAMMAIRES HORS LACTATION

Les traitements hors lactation sont administrés pour débuter la période sèche et sont destinés à traiter les infections mammaires et à prévenir de nouvelles infections au cours de la période sèche.

L'élimination de l'antibiotique s'effectue pendant la période colostrale. En France, le lait des 7 premiers jours après le vêlage n'est pas destiné à la consommation. Le principe d'un temps d'attente nul, une fois passé la période colostrale suppose le respect d'une période sèche de 4 à 6 semaines selon la formulation d'antibiotiques. En cas de vêlage anticipé, un temps d'attente variant selon les formulations doit être respecté.

AUTRES TRAITEMENTS

Les vaches laitières peuvent être traitées par voie générale ou locale (intra-utérine) pour des infections de l'appareil reproducteur péri-partum. Elles peuvent également être traitées par antibiothérapie pour des affections de l'appareil locomoteur ou des infections respiratoires.

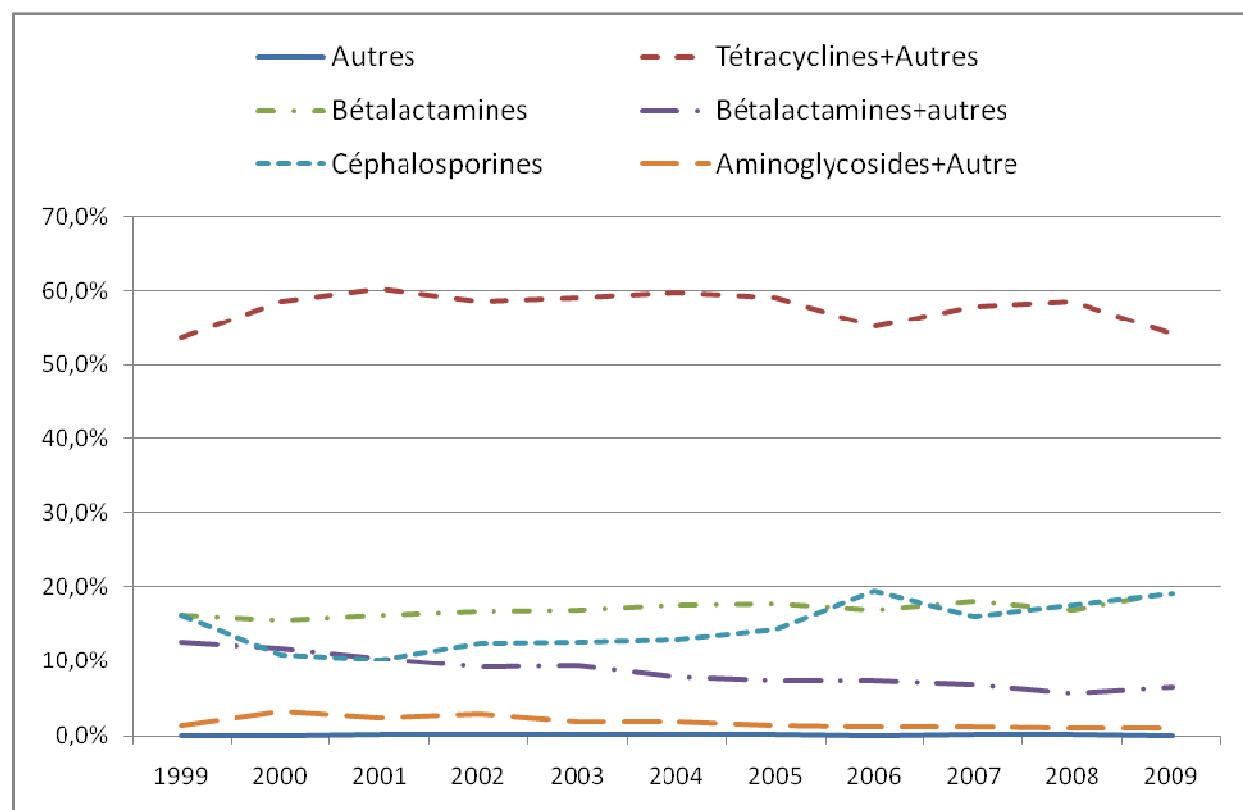
ANALYSE DES CONSOMMATIONS D'ANTIBIOTIQUES

FORMULATIONS INTRAMAMMAIRES ADMINISTREES EN LACTATION.

Seize types de formulation contenant 1 ou plusieurs antibiotiques sont répertoriés dans la base de données de l'ANMV sur l'utilisation des antibiotiques. Sur la base d'un usage de ces médicaments uniquement chez les femelles productrices de lait, on peut estimer le taux d'utilisation par animaux.

Sur la période 1999 à 2009, le nombre de traitements vendus rapportés au nombre de vache laitière et par an est de l'ordre de 0,9 (moyenne = 0,936, min = 0,783, max = 1,009). En 2009, sur près 3 millions de traitements, les traitements les plus prescrits sont à base de tétracyclines suivi de ceux à base de bétalactamines et de céphalosporines. Sur la période 2001-2009, les traitements à base de céphalosporines ont cru régulièrement, essentiellement au détriment de l'utilisation de bétalactamines en association.

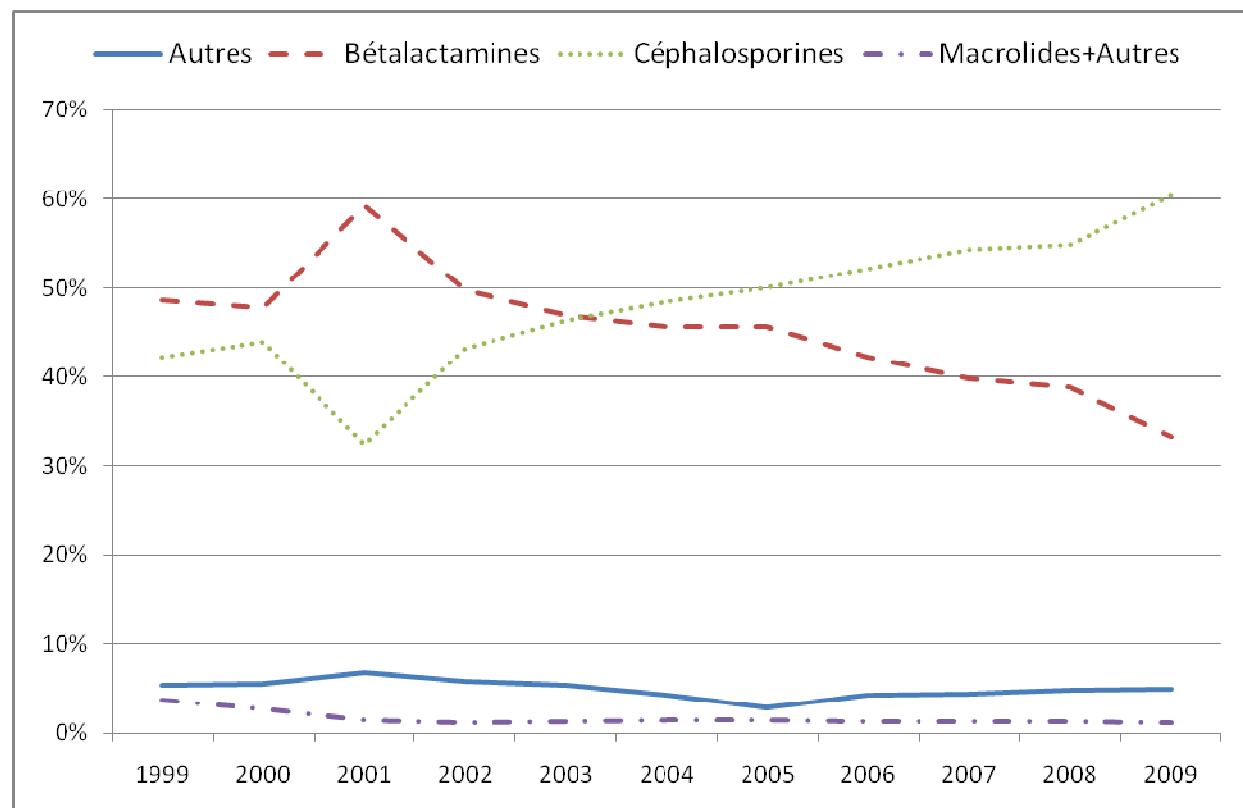
Figure 1 : Proportion des traitements en lactation par classe d'antibiotiques.



FORMULATIONS INTRAMAMMAIRES ADMINISTREES HORS LACTATION

Seize formulations contenant 1 ou plusieurs antibiotiques sont disponibles pour les traitements hors lactation. Sur la base de l'hypothèse d'une utilisation exclusive chez les vaches laitières, on peut estimer la fréquence annuelle d'utilisation par animal. Cette fréquence est de l'ordre de 0,7 (moyenne = 0,69, minimum = 0,62, maximum = 0,81). En 2009, les formulations à base de céphalosporines sont les plus prescrites et représentent près de la moitié des traitements, les bétalactamines prescrites seules ou associées représentent près de 30 % des traitements. Au cours de la période 1999-2009, la part relative des traitements à base de bétalactamines a décrue d'environ 10 % en faveur d'une augmentation de l'utilisation des céphalosporines.

Figure 2 : Proportion des traitements au tarissement par classe d'antibiotiques

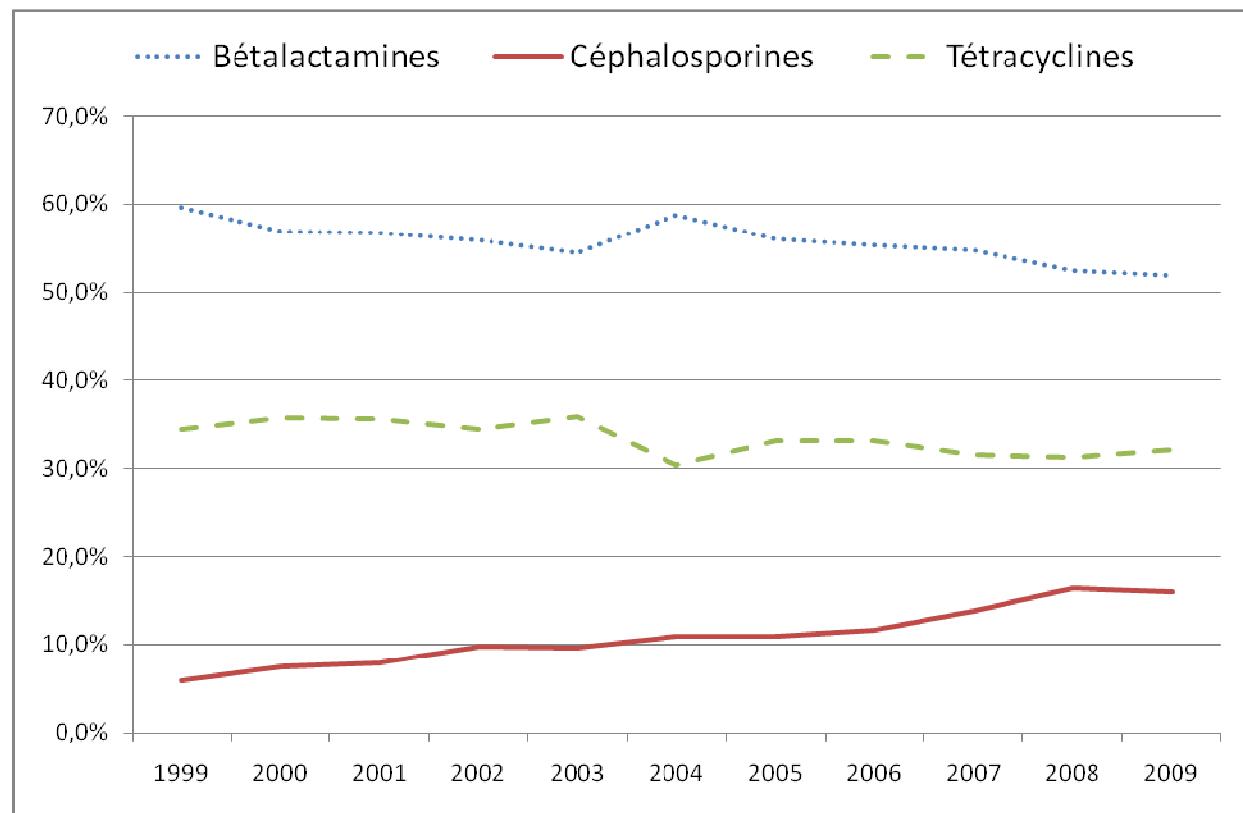


FORMULATIONS ADMINISTREES PAR VOIE INTRA-UTERINE

Les traitements administrés par voie intra-utérine sont à base d'amoxicilline, d'ampicilline associée à la colistine, de pénicilline G associée à la dihydrostreptomycine, de céfapirine ou de chlortétracycline. En 2009, les formulations à base de bétalactamines représentent plus de 50 % des traitements, le recours à des céphalosporines près de 16 % des traitements et les traitements à base de tétracyclines, le reste. Rapporté au nombre de vaches laitières, le taux de traitements par voie intra-utérine est de l'ordre de 0,2 (moyenne=0,23, minimum=0,18, maximum=0,25).

Les temps d'attente dans le lait pour ces formulations sont en général nuls sauf pour une formulation pénicilline G – dihydrostreptomycine qui a un temps d'attente lait de 1 jour. Le risque de contamination du lait à partir de ces traitements est donc proche de zéro.

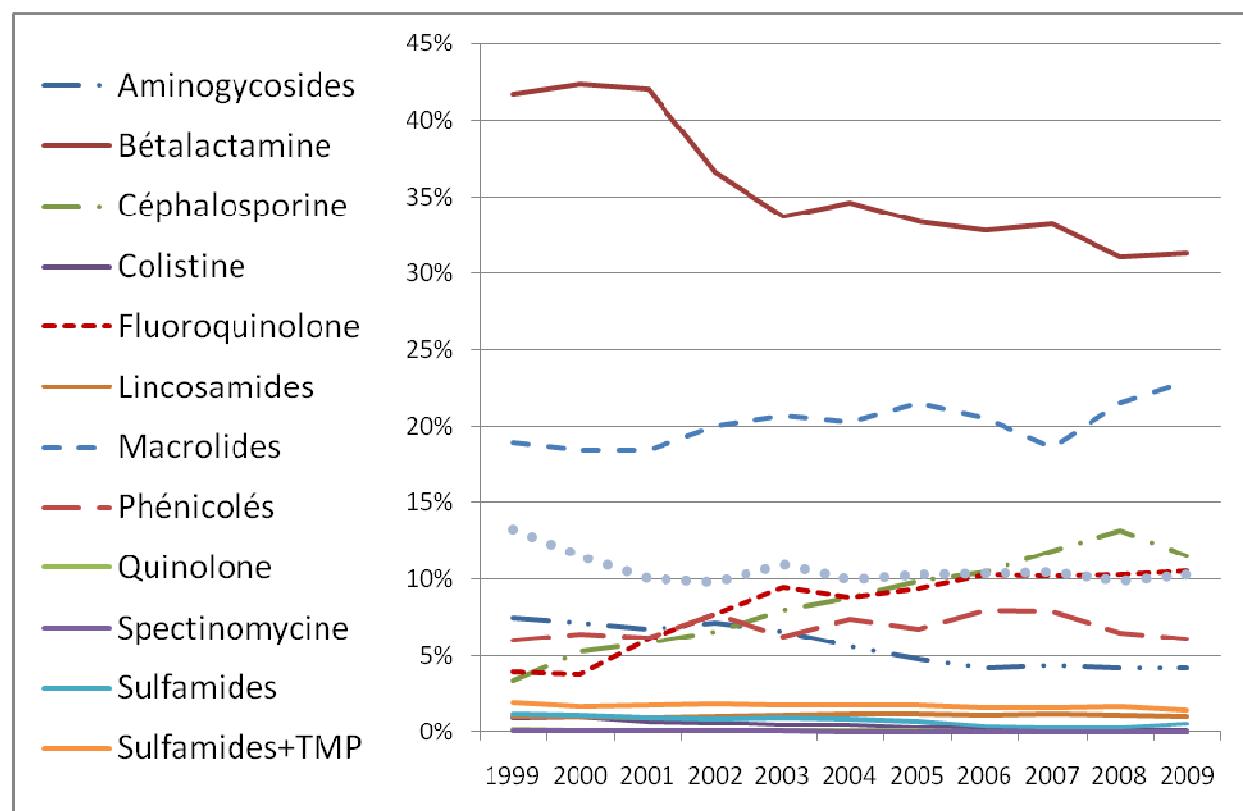
Figure 3 : Proportion des traitements intra-utérins par classe d'antibiotiques



FORMULATIONS ADMINISTREES PAR VOIE PARENTERALE

L'utilisation des antibiotiques par voie parentérale est estimée pour l'ensemble des bovins. Il est difficile d'estimer l'exposition réelle du troupeau laitier à ces formulations d'antibiotiques. L'ANMV détermine un estimateur qui correspond au poids vif potentiellement traité. Il permet d'estimer la part relative d'utilisation des différentes classes d'antibiotiques. Sur la période 1999-2009, on peut observer une réduction de l'utilisation des formulations à base de bétalactamines qui passent d'un pourcentage de poids vif traité de 42 % à 31 %, le pourcentage de poids vif traité est en augmentation pour les céphalosporines de 3 % à 12 % et pour les fluoroquinolones de 4 % à 11 %. Le pourcentage de poids vif traité est stable pour les macrolides autour de 20 %, les tétracyclines de 11 % et les phénicolés de 7 %. Le pourcentage de poids vif traité avec des aminoglycosides s'est réduit de 7 % à 4 % du fait de la réduction de l'utilisation des associations bétalactamines et aminoglycosides.

Figure 4 : Part relative calculée sur le tonnage d'animaux potentiellement traités par classe d'antibiotiques



RISQUES ASSOCIES AUX RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

Le profil de risque des antibiotiques est établi par les experts auprès du Comité permanent du médicament vétérinaire. Les évaluations sont disponibles sous forme de résumés de l'agence européenne du médicament.

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058008d7ad

Les dossiers sont établis selon les règles gouvernant les médicaments dans l'Union Européenne et plus particulièrement le volume 8 pour l'établissement des Limites Maximales des Résidus.

Pour les résidus dans le lait, les principaux risques sont de nature :

- toxicologique en tenant compte du risque allergique.
- bactériologique avec le risque potentiel d'effet sur la flore intestinale
- industriel avec l'inhibition de la croissance des bactéries impliquées dans les processus de fermentation utilisés en transformation laitière.

Ces trois risques sont pris en compte pour la fixation de limites maximales de résidus dans le lait.

La dose journalière admissible toxicologique est basée sur la revue des études pharmacologiques et toxicologiques. Pour chaque étude, une dose sans effet est déterminée. Les études toxicologiques sont passées en revue par les experts pour définir la dose sans effet (DSE) qui est retenue pour calculer la dose journalière admissible. En fonction de la qualité des données fournies, les experts fixent un facteur de sécurité (FS).

$$DJA = \frac{DSE}{FS}$$

La DSE issue d'expérimentation animale est exprimée en mg/kg. La DJA est exprimée en mg/kg ou en mg par personne en prenant un poids de référence par personne de 60 kg.

La dose journalière microbiologique est basée sur la revue des études *in vitro* et *in vivo* fournie pour évaluer l'effet de l'antibiotique sur la flore intestinale. Les modalités d'évaluation sont décrites dans la ligne directrice VICH GL 36. Les principes sont d'évaluer si l'antibiotique est actif vis-à-vis des espèces bactériennes présentes dans le colon, si l'antibiotique sous forme de résidus peut atteindre le colon et s'il est actif dans le colon. Les études ont pour but d'évaluer le potentiel de déséquilibre de la flore barrière et le potentiel de sélection de bactéries résistantes. Une alternative à l'expérimentation animale est basée sur le recours à des données d'études *in vitro* déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour des souches d'espèces bactériennes représentatives de la flore intestinale ou sur la concentration sans effet obtenue dans un modèle de flore cultivée *in vitro*.

La limite maximale de résidus est calculée en tenant compte des modalités d'utilisation des médicaments, des cinétiques tissulaires et dans les productions animales. Elle tient compte également des performances des principaux tests de dépistage pour rechercher les résidus d'antibiotiques et des limites de quantification de la méthode de contrôle de résidu proposée par l'industrie.

Pour la plupart des antibiotiques, la DJA est de nature microbiologique.

PENICILLINES

Les pénicillines ont une faible toxicité et aucun effet tératogène. En relation avec leur utilisation, des phénomènes d'hypersensibilité sont reportés. La quantité d'haptène nécessaire pour sensibiliser un sujet est beaucoup plus élevée que celle pouvant déclencher une réaction allergique chez un sujet préalablement sensibilisé. D'après la littérature, une quantité de 6 µg semble suffisante pour déclencher une réaction allergique chez un sujet sensibilisé. Les pénicillines sont des inhibiteurs de la croissance des bactéries utilisées dans l'industrie laitière. Une concentration de 0,006 µg/g de lait suffit à inhiber ces germes. Pour assurer une sécurité en termes de transformation laitière, une concentration de 0,003 µg/g en pénicilline dans le lait ne devrait pas être dépassée. Les bétalactamines (benzylpénicilline, amoxycilline, ampicilline, cloxacilline, dicloxacilline et oxacilline) ont été parmi les premières molécules évaluées pour une détermination de LMR à partir de données anciennes.

La nafcilline qui fait partie de la même famille que les isoxazolyl pénicilline (oxacilline, cloxacilline et dicloxacilline) a été évaluée plus tardivement et une DJA microbiologique de 264 µg par personne a été proposée.

L'acide clavulanique a une structure proche de celle des pénicillines et est utilisée en association avec l'amoxycilline comme inhibiteur des bétalactamases. La substance a été évaluée et une DJA toxicologique de 3 mg par personne a été fixée sur la base de la dose sans effet observée dans les études de reproduction chez le rat et la souris. L'acide clavulanique n'a pas d'effet sur les bactéries les plus couramment utilisées dans l'industrie laitière.

Les limites maximales de résidus en µg/kg dans le lait sont :

Benzyl pénicilline	4
Ampicilline	4
Amoxicilline	4
Oxacilline	30
Cloxacilline	30
Dicloxacilline	30
Pénéthamate (résidu marqueur Benzyl pénicilline)	4
Nafcilline	30
Acide clavulanique	200

CÉPHALOSPORINES

Le céfacétrile est une céphalosporine de premières générations. Les études de toxicologie ont été conduites mais une DJA toxicologique n'a pas été déterminée du fait de sa faible toxicité systémique et de sa faible biodisponibilité orale. Le risque allergique a été considéré comme négligeable du fait de la faible biodisponibilité orale. La DJA microbiologique a été fixée à 210 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*.

La céfalexine est une céphalosporine de premières générations. Les études de toxicologie ont été conduites et le risque immunologique a été considéré comme faible. En général, les réactions anaphylactiques dues aux céphalosporines sont rares et l'hypersensibilité croisée avec les pénicillines est inférieure à 5 % chez les sujets allergiques aux pénicillines. La DJA microbiologique a été fixée à 3300 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*.

Le céfalonium est une céphalosporine de premières générations. Les études de toxicologie ont été conduites et le risque immunologique a été considéré comme faible. La DJA microbiologique a été fixée à 920 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*. Elle est plus faible que la DJA toxicologique établie à 1200 µg/personne. Les bactéries utilisées dans l'industrie laitière sont sensibles au céfalonium avec une concentration sans effet fixée à 0,02 µg/ml.

La céfapirine est une céphalosporine de premières générations. Les études de toxicologie ont été conduites et le risque immunologique a été considéré comme faible. La DJA microbiologique a été fixée à 153 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*. Elle est plus faible que la DJA toxicologique établie à 6000 µg/personne.

La céfazoline est une céphalosporine de premières générations. Les études de toxicologie ont été conduites et le risque immunologique a été considéré comme faible. La DJA microbiologique a été fixée à 600 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*. Elle est plus faible que la DJA toxicologique établie à 6000 µg/personne. La céfazoline n'a pas d'effet significatif sur les bactéries utilisées dans l'industrie laitière.

La céfopérazone est une céphalosporine de dernières générations, utilisée sous forme de pommades intramammaire. Les études de toxicologie ont été conduites et le risque immunologique a été considéré comme équivalent à ceux d'autres bétalactamines. La DJA microbiologique a été fixée à 170 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*. Elle est plus faible que la DJA toxicologique établie à 45000 µg/personne. La céfopérazone n'a pas d'effet significatif sur les bactéries utilisées dans l'industrie laitière à une concentration inférieure à 50 µg/L.

Le céfquinome est une céphalosporine de dernières générations, utilisé pour le traitement des infections respiratoires et les mammites chez les bovins. Les études de toxicologie ont été conduites et une immunotoxicité n'a pas été mise en évidence. La DJA microbiologique a été fixée à 225 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*. Le céfquinome n'a pas d'effet significatif sur les bactéries utilisées dans l'industrie laitière à une concentration inférieure à 20 µg/L.

Le ceftiofur est une céphalosporine de dernières générations qui peut être administré aux bovins y compris en lactation pour le traitement des infections respiratoires. Le ceftiofur est rapidement métabolisé en desfuroylceftiofur et en acide furoïque. Les études de toxicologie ont été conduites. Bien que le desfuroylceftiofur soit immunotoxique, les résidus de ceftiofur sont considérés comme ne présentant pas un risque pour les personnes allergiques aux bétalactamines. La DJA toxicologique a été fixée à 18000 µg par personne. La DJA microbiologique a été fixée à 1200 µg par personne sur la base des études de sensibilité *in vitro*. Les résidus de traitement ne sont pas détectables par les méthodes de dépistage disponibles mais sont inférieures à la LMR après la dernière administration.

Céfacétile*	125
Céfalexine	100
Céfalonium	20
Céfapirine (somme de céfapirine et de désacetyl céfapirine)	60
Céfazoline	50
Céfopérazone	50
Cefquinome	20
Ceftiofur (somme de tous les résidus ayant la structure bétalactame exprimé comme desfuroyl ceftiofur)	100

*Non commercialisée en France

DIAMINOPYRIMIDINES

Les dérivés de la diaminopyrimidine sont des inhibiteurs de la dihydrofolate reductase qui agissent en synergie avec les sulfamides. Le baquiloprim et le triméthoprim peuvent être administrés par voie orale aux bovins et par voie intraveineuse ou intramusculaire aux vaches laitières. Sur la base des études de toxicologie et de mutagenèse, des DJA de 600 µg/personne et de 750 µg/personne ont été proposées respectivement pour le baquiloprim et le triméthoprim. Sur la base des études de CMI, les DJA microbiologiques calculées sont respectivement de 336 µg et 252 µg par personne. Compte tenu de la nature des résidus (composé parental et métabolites), la DJA toxicologique a été retenue pour le baquiloprim et la DJA microbiologique pour le triméthoprim. Le baquiloprim est actif sur les bactéries acidificatrices de l'industrie laitière à partir de 0,1 µg/ml.

Les LMR sont les suivantes :

	µg/kg
Baquiloprim*	30
Triméthoprim	50

*Non commercialisé en France avec une autorisation Vache laitière

SULFAMIDES

Les sulfamides sont une famille importante de médicaments du fait de leurs propriétés antibactériennes et anti-protozoaires. Elles sont fréquemment administrées associées aux diaminopyrimidines du fait de leur action synergique. Le groupe des sulfamides contient de nombreuses substances pour lesquelles des données toxicologiques obtenues par des méthodes modernes ne sont pas disponibles. Des effets potentiels allergiques

Annexe – Réponse à la saisine 2011-SA-0038

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Page 9

pourraient exister pour les personnes prédisposées. Cependant, la plupart des états-membre et des pays tiers ont adopté des tolérances à 100 µg/kg sur la base des études anciennes et cette tolérance est considérée comme suffisante. Dans le cas de la sulfaméthazine, des études additionnelles ont été fournies et le 34^{ème} JECFA a établi une LMR à 100 µg/kg pour la sulfaméthazine dans le muscle.

	µg/kg
Sulfamides	100

TÉTRACYCLINES

Les tétracyclines (chlortétracycline, tétracycline) ont été évaluées par similarité avec l'oxytétracycline. La DJA microbiologique a été évalué à 3 µg/kg soit 180 µg par personne par le JECFA pour l'oxytétracycline (WHO TRS 888, 1999).

La doxycycline n'est pas autorisée chez les femelles laitières. L'activité antibiotique de la doxycycline a été comparée avec celle de l'oxytétracycline et a été jugée comparable. La DJA microbiologique de 3 µg/kg a été retenue. Aucune LMR n'a été fixée pour le lait.

	µg/kg
Chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline	100
Doxycycline	Non autorisée pour les vaches en lactation.

MACROLIDES

L'érythromycine est utilisée pour le traitement des mammites cliniques et subcliniques et des infections à germes sensibles. Elle possède une activité immunostimulante mais les données épidémiologiques chez l'homme montrent que les réactions d'hypersensibilité sont rares. La DJA microbiologique de 300 µg par personne a été calculée sur la base des études *in vitro*. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées par l'industrie laitière est de 40 µg/L.

La spiramycine est un macrolide utilisé pour le traitement d'infections à germes sensibles. Elle a été évaluée par le JECFA en 1994. Une DJA microbiologique de 3 mg par personne a été établie.

La tylosine est un mélange de plusieurs molécules dont la principale est la tylosine A qui possède la majorité de l'activité antibactérienne. La tylosine peut entraîner une sensibilisation après injection chez le cobaye et des dermatites de contact sont reportées pour les personnes manipulant des aliments en contenant. Une DJA toxicologique de 500 µg/kg et une DJA microbiologique de 363 µg par personne ont été calculées. Une concentration sans effet de 0.075 µg/ml a été fixée pour les bactéries utilisées dans l'industrie laitière.

La tilmicosine est un macrolide synthétisé à partir de la tylosine. Elle est autorisée pour le traitement des pneumonies chez le veau et pour la prévention des mammites par injection intramammaire au tarissement. La DJA microbiologique est de 240 µg pour une personne. Elle est considérée comme n'ayant pas d'effet sur les germes de transformation laitière à des concentrations inférieures à 1 µg/ml.

La tildipirosine est autorisée pour le traitement et la prévention des infections respiratoires chez les bovins et le porc. Elle n'est pas autorisée chez les femelles laitières. La DJA toxicologique a été établie à 6 mg par personne et la DJA microbiologique a 7,5 mg par personne.

La tulathromycine est un macrolide semi-synthétique autorisé chez les bovins mais non autorisé pour les femelles en lactation. La DJA toxicologique est de 3 mg par personne et sa DJA microbiologique est de 660 µg par personne.

La gamithromycine est un macrolide semi-synthétique autorisé chez les bovins mais non autorisée pour les femelles en lactation. La DJA toxicologique est de 0,6 mg par personne et sa DJA microbiologique est de 740 µg par personne.

	µg/kg
Erythromycine *	40
Spiramycine	200
Tildipirosine	Non autorisée pour les vaches en lactation
Tilmicosine*	50
Tylosine	50
Tulathromycine	Non autorisée pour les vaches en lactation.
Gamithromycine	Non autorisée pour les vaches en lactation.

*Produits commercialisés avec recommandations de ne pas administrer aux vaches en lactation.

QUINOLONES ET FLUOROQUINOLONES

La danofloxacine est une fluroquinolone administrée par voie orale chez la volaille et par voie parentérale chez les bovins pour le traitement d'infections respiratoires et intestinales. La DJA toxicologique a été fixée à 1440 µg par personne et la DJA microbiologique est de 36 mg par personne. La danofloxacine a une concentration sans effet sur les bactéries lactiques de 400 µg/L.

La difloxacine est une fluoroquinolone administrée par voie orale chez la volaille, par voie parentérale chez le porc et le veau pour le traitement des infections respiratoires. Elle n'est pas autorisée chez la femelle en lactation. La DJA toxicologique est de 600 µg par personne et la DJA microbiologique de 2400 µg par personne.

L'enrofloxacine est une fluoroquinolone administrée par voie orale ou parentérale pour le traitement d'infections à germes sensibles. La DJA toxicologique a été révisée à 30 µg/kg (1800 µg par personne) et la DJA microbiologique a été calculée à 372 µg par personne. Les effets inhibiteurs sur les fermentations lactiques sont faibles.

La fluméquine est un antibiotique synthétique appartenant à la seconde génération des quinolones et peut être administrée par voie orale ou parentérale. La DJA toxicologique est de 30 µg/kg (1800 µg par personne). La DJA microbiologique a été fixée à 495 µg par personne. La fluméquine n'a pas d'effet sur les bactéries utilisées par l'industrie laitière.

La marbofloxacine est une fluoroquinolone administrée par voie orale ou parentérale au bovin y compris en lactation pour le traitement des infections respiratoires. La DJA toxicologique est de 40 µg/kg (2400 µg par personne) et la DJA microbiologique est calculée à 268 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries lactiques est de 1,6 µg/ml.

	µg/kg
Danofloxacine	30
Difloxacine	Non autorisée pour les bovins
Enrofloxacine (somme d'enrofloxacine et de ciprofloxacine)	100
Fluméquine	50
Marbofloxacine	75

COLISTINE

La colisitine est un antibiotique peptidique appartenant à la classe des polymyxines. Elle est utilisée pour la prévention et le traitement des infections à germes sensibles chez le lapin, le porc, la volaille, les bovins, les ovins et caprins y compris les femelles laitières. Elle peut être administrée par voie orale, parentérale et intramammaire. La DJA toxicologique est établie à 62,5 µg/kg (3750 µg par personne) et la DJA microbiologique est calculée à 300 µg par personne. L'activité sur les bactéries utilisées par l'industrie laitière est faible.

	µg/kg
Colistine	50

AMINOGLYCOSIDES

La streptomycine et la dihydrostreptomycine ont été évaluées ensemble du fait de la similarité de leurs profils pharmacocinétiques et toxicologiques et de leurs activités biologiques. Elles sont administrées le plus souvent en association avec une bétalactamine. La DJA toxicologique a été calculée à 1500 µg par personne et la DJA microbiologique a été calculée à 4800 µg par personne.

L'apramycine est un aminoglycoside utilisé chez le veau par voie orale. Il n'est pas autorisé pour les femelles laitières. La DJA toxicologique est de 0,25 mg/kg et la DJA microbiologique est calculée à 2400 µg par personne.

La néomycine est un aminoglycoside constitué de 3 composants A, B et C. Le composé B est le composant majeur des préparations commerciales de néomycine. La framycétine (aussi dénommée soframycine) est aussi constituée du composé B. La néomycine peut être administrée par orale, parentérale ou intramammaire. La DJA toxicologique a été établie à 60 µg/kg (3600 µg par personne) et la DJA microbiologique a été calculée à 9600 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées par l'industrie laitière est de 2 µg/ml.

La kanamycine est un aminoglycoside constitué de 3 composants A, B et C dont le principal est le composé A. Elle est administrée par voie parentérale pour le traitement d'infections à germes sensibles. La DJA microbiologique a été calculée à 480 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées par l'industrie laitière est de 1 µg/ml.

La paromomycine est un aminoglycoside utilisé par voie orale ou injectable. Il n'est pas autorisé chez les femelles laitières. La DJA toxicologique est de 2 mg par personne et la DJA bactériologique a été calculée à 1500 µg par personne.

La spectinomycine est un antibiotique aminocyclitol administré par voie orale ou parentérale. La DJA toxicologique est de 0,25 mg/kg (15000 µg par personne) et la DJA microbiologique a été calculée à 2400 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries utilisée dans l'industrie laitière a été estimée à 388 µg/kg.

La gentamicine est un mélange de plusieurs composants dont les principaux sont la gentamicine C1, la gentamicine C1a, la gentamicine C2 et la gentamicine C2a. Elle est administrée par voie orale ou par voie parentérale pour le traitement d'infections à germes sensibles. La DJA toxicologique est de 100 µg/kg (6 mg par personne) et la DJA microbiologique est calculée à 240 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées par l'industrie laitière est de 0,1 µg/ml.

	µg/kg
Apramycine	Non autorisée chez les femelles en lactation
Gentamicine	100
Kanamycine	150
Néomycine	1500

Streptomycine, dihydrostreptomycine	200
Paromomycine	Non autorisée chez les femelles en lactation
Spectinomycine	200

PHÉNICOLÉS

Le florfénicol est utilisé par voie orale ou parentérale pour le traitement des infections à germes sensibles. Son utilisation n'est pas autorisée pour les femelles en lactation. La DJA toxicologique est de 600 µg par personne et la DJA microbiologique est de 180 µg par personne.

Le thiampénicol est utilisé par voie orale, parentérale ou par voie intramammaire pour le traitement des infections à germes sensibles. Une DJA toxicologique de 2,7 mg par personne a été établie et une DJA microbiologique de 150 µg par personne a été calculée. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées dans l'industrie laitière est de 1 µg/ml.

	µg/kg
Florfénicol	Ne pas administrer aux femelles productrices de lait.
Thiampénicol	50

Le chloramphénicol fait partie de la liste des substances interdites chez les animaux producteurs de denrées alimentaires.

AUTRES ANTIBIOTIQUES

La rifaximine est un antibiotique de la famille des ansamycines. En médecine vétérinaire, elle peut être utilisée pour la prévention et le traitement des mammites par administration intramammaire et pour le traitement des métrites post-partum par administration intra-utérine. La DJA microbiologique a été calculée à 60 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées en industrie laitière est de 0,098 µg/ml.

La pirlimycine est un antibiotique de la famille des lincosamides. Elle est utilisée pour le traitement d'infections mammaires sous forme d'injections intramammaires. La DJA toxicologique est de 6 mg par personne et la DJA microbiologique a été calculée à 360 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées en industrie laitière est de 0,130 µg/ml.

La lincomycine est un antibiotique de la famille des lincosamides. Elle est utilisée sous forme orale pour le traitement d'infections chez le porc et la volaille. Une formulation intramammaire pour le traitement des mammites est également commercialisée. La DJA toxicologique est de 300 µg/ kg (18 mg par personne) et la DJA microbiologique a été calculée à 600 µg par personne. La concentration sans effet sur les bactéries utilisées en industrie laitière est de 0,160 µg/ml.

La novobiocine est un antibiotique utilisé comme traitement intramammaire des mammites en lactation ou au tarissement seule ou associée à d'autres antibiotiques. La DJA toxicologique est de 1,2 mg par personne et la DJA bactériologique est de 75 µg par personne. La concentration sans effet sur les productions laitières est de 0.39 µg/ml.

La bacitracine est un antibiotique peptidique. En association avec de la tétracycline et de la néomycine, elle est administrée sous forme de pommade intramammaire pour le traitement des mammites. La DJA toxicologique est de 3,3 mg par personne et la DJA bactériologique est de 234 µg par personne. La concentration sans effet sur les productions laitières est de 0.54 µg/ml.

	µg/kg
Rifaximine	60
Pirlimycine	100
Novobiocine	50
Lincomycine	150
Bacitracine	150

PRINCIPALES CAUSES DE CONTAMINATION

Dans une enquête (Fabre et al, 1996) portant sur plus de 1000 élevages pénalisés pour des problèmes d'inhibiteurs, les traitements de mammite clinique sont incriminés dans 64 % des cas. Plusieurs erreurs sont identifiées seules ou associées. Il s'agit des accidents de traite (traite par erreur d'un animal traité) (56%), la mauvaise utilisation des produits de traitement (non-respect des doses et/ou des délais d'attente) (38 %), l'utilisation de produits inadaptés (produit prévu par voie intramusculaire par voie intramammaire, produit de traitement au tarissement pour traiter une mammite clinique) (12%). Les autres cas concernent la mauvaise utilisation de produits par voie parentérale (non respect des doses ou des délais d'attente) (9%), mauvais rinçage des griffes suite à la traite d'un animal en traitement (8%) ou l'utilisation de bidons de taille insuffisante pour la traite en dérivation des animaux en traitement (le lait contaminé part dans le tank) (6 %).

Dans le cas où les traitements au tarissement sont incriminés (16 % des cas), l'accident le plus courant est la traite accidentelle d'une vache tarie (66 %). Le non respect d'un délai d'attente de 6 jours correspondant à la période colostrale après une période sèche normale est incriminé dans 11 % des cas. Le non respect d'un délai d'attente de 14 jours lors d'une période sèche raccourcie (inférieure à 4 à 5 semaines) est incriminé dans 30 % des cas.

Le traitement relatif à la pathologie de l'appareil locomoteur et aux troubles de la reproduction sont respectivement responsables de 51 % et 38 % des cas liés à des pathologies autres que mammaires.

ESTIMATION DU POUVOIR DE CONTAMINATION DU LAIT

Théoriquement, la concentration maximale dans le lait après administration intramammaire est égale à la dose administrée par quartier divisée par le volume de lait produit par quartier. Les cinétiques des concentrations d'antibiotiques dans le lait suivent un ensemble de pics et de courbes de décroissance exponentielle qui sont fonction du nombre d'administration du produit, de sa formulation galénique et des propriétés des molécules antibiotiques, et de l'animal, de sa production laitière et de l'état d'inflammation de la mamelle. Dans le cadre du dossier d'AMM, les temps d'attente dans le lait sont déterminés sur des animaux sains à différents niveaux de production. Le risque de contamination du lait par des résidus d'antibiotiques est fonction du temps d'attente. Plus celui-ci est long, plus le risque de contamination du lait de tank est grand.

Le pouvoir contaminant d'un traitement antibiotique à une concentration supérieure à la LMR peut être calculé sur la base de la formule suivante :

Qlait maximale contaminée = Dose maximale /LMR. La dose maximale est basée sur un traitement des 4 quartiers et l'élimination complète du produit lors de la traite suivante.

Pour les médicaments administrés par voie parentérale ou par voie intra-utérine, seule une fraction de la dose administrée est éliminée par le lait. La cinétique des résidus dans le lait est fonction de la dose, de la production laitière, du degré d'inflammation de la mamelle (pH du lait) et de la formulation du médicament. L'estimation du pouvoir contaminant est donc fonction de nombreux facteurs. Mais, le risque d'exposition est essentiellement fonction de la durée du traitement augmenté du temps d'attente du produit.

CALCUL DU RISQUE POTENTIEL DE CONTAMINATION POUR LES POMMADRES INTRAMAMMAIRES

Les compositions des différentes formulations permettent de calculer le risque potentiel de contamination du lait.

Le volume potentiellement contaminé le plus élevé est calculé pour les formulations à base de pénicilline G qui contiennent 570 mg de pénicilline G. Potentiellement, une seringue peut contaminer à la concentration de la LMR (4 µg/ml), un volume de 142 500 litres de lait. Le second niveau de contamination est avec des formulations à base d'amoxicilline ou d'ampicilline dosées à 200 mg par injecteur. Une seringue peut contaminer à la concentration de la LMR (4 µg/ml), un volume de 50 000 litres de lait. Les pouvoirs contaminant sont de quelques milliers litres de lait pour les produits à base de cloxacilline et de céphalosporines. Le volume pouvant être contaminé par la tétracycline est de 2000 litres de lait et les volumes sont inférieurs à 1000 litres pour les aminoglycosides et la pirlimycine.

ESTIMATION QUALITATIVE DU RISQUE DE DEPASSEMENT DE LA LIMITE MAXIMALE DE RESIDUS

Le niveau de risque de dépassement de la LMR peut être estimé pour les pommades intra-mammaires en combinant leur pouvoir contaminant avec leur fréquence d'utilisation.

Tableau 1 : Evaluation du risque de contamination pour les pommades intramammaire en lactation

	Part relative des traitements			
Pouvoir contaminant	<5%	5-10 %	10-20 %	>20 %
≥50 000 L	Ampicilline Pénicilline G		Amoxicilline	
10 000 L-50 000 L				
1 000 L -10 000 L	Céfazoline Céfalexine Céfopérazone Lincomycine	Cloxacilline	Cefquinome	Tétracycline
<1000 L	Colistine Kanamycine Gentamicine Pirlimycine		Acide clavulanique	Bacitracine Néomycine

Tableau 2 : Evaluation du risque de contamination pour les pommades intramammaires au tarissement

		Part relative des traitements			
Pouvoir contaminant		<5%	5-10 %	10-20 %	>20 %
≥50 000 L	Ampicilline Pénicilline G				Céphalonium
10 000 L-50 000 L	Céfazoline		Cefquinome		
1 000 L -10 000 L	Nafcilline Céfazoline Céfalexine Dihydrostreptomycine Spiramycine		Néomycine Rifaximine		Cloxacilline

Les molécules ayant le plus fort pouvoir contaminant et présentant le plus grand risque pour l'industrie laitière et pour les consommateurs en terme de dépassement de LMR sont l'amoxicilline et le céphalonium pour leur utilisation sous forme de pommades intramammaires en lactation ou au tarissement. Du fait de leur fréquence d'utilisation et de leur pouvoir contaminant, la tétracycline, le cefquinome et la cloxacilline ont un risque élevé d'être retrouvés sous forme de résidus. D'autres molécules sont fréquemment utilisées mais leurs LMR sont plus élevées et leurs posologies génèrent un risque moindre de présence au delà des LMR (bacitracine, néomycine). Leur présence sera associée de plus à la présence de molécules ayant une LMR comparativement plus faible (tétracycline). Des molécules utilisées au tarissement peuvent être potentiellement à risque (rifaximine). Inversement, des molécules peu fréquemment utilisées ont un fort pouvoir contaminant (ampicilline, pénicilline G).

Formulations injectables

Pour les bétalactamines, les temps d'attente après la dernière administration vont de 2 à 8 traites selon les formulations. Le ceftiofur peut être administré aux vaches laitières avec un temps d'attente nul tandis que la formulation injectable de cefquinome ne peut pas être utilisée sur les femelles en lactation. Parmi les macrolides, seule la spiramycine et la tylosine sont présentes sous forme de formulations pouvant être administrées aux

vaches laitières avec des temps d'attente respectifs de 14 traites et de 6 traites. Les fluoroquinolones peuvent être administrées par voie générale avec des temps d'attente pour le lait variant entre 4 et 8 traites selon les formulations. Les traitements à base de sulfamides associés ou non au triméthoprime ont des temps d'attente pour le lait de 10 à 12 traites. Pour l'oxytétracycline, le temps d'attente pour le lait varie de 8 à 12 traites selon la posologie et la formulation.

Le risque de non respect du temps d'attente et donc de mise sur le marché de lait ayant des concentrations supérieures à la LMR suite à un traitement par voie générale est d'autant plus élevé que la durée du traitement et le temps d'attente lait sont longs.

Il est plus difficile d'estimer le risque de contamination du lait du fait de l'usage des antibiotiques par voie générale. Une étude menée par le CNIEL et l'Institut de l'élevage sur un panel de 25 élevages laitiers a montré que la moitié des traitements injectables répertoriés en élevage étaient à base de bétalactamines seuls ou associés à des aminoglycosides. Les traitements à base de macrolides représentaient 10 % des traitements.

Dans une étude menée par l'Afssa (Cazeau et al, 2008) sur les prescriptions vétérinaires dans la filière bovine (n=2233) recueillies au cours d'une enquête postale, les pénicillines représentaient 45 % des prescriptions, les aminoglycosides 36,8 %, les fluoroquinolones 24,2 %, les céphalosporines 18,6 %, les tétracyclines 13,8 %, les polypeptides 10,7 %, les macrolides 6,2 %, les sulfamides 6 % et les phénicolés 4,1 %. L'étude ne précise pas les répartitions par voie d'administration. Il est mentionné que pour les infections liées à la mamelle, les vétérinaires prescrivent en premier choix des fluoroquinolones, les pénicillines et les céphalosporines venant en deuxième ou troisième choix. Les fluoroquinolones représentent également le premier choix de prescription dans le cas d'infections digestives et respiratoires.

Les données en matière d'utilisation des formulations injectables sur les femelles productrices de lait sont aujourd'hui trop fragmentaires pour évaluer les fréquences de traitement par familles d'antibiotiques. Cependant la famille des fluoroquinolones semble plus couramment utilisée que la famille des macrolides ou des sulfamides.

MODALITÉS DE L'AUTO-CONTRÔLE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT.

ANALYSE À LA PRODUCTION

L'auto-contrôle en matière de résidus d'antibiotiques dans le lait se fait dans un cadre national mis en place par l'interprofession laitière et dans le cadre du décret n°97-1319 du 30 Décembre 1997 relatif aux modalités de paiement du lait de vache en fonction de sa composition et de sa qualité. Dans ce cadre, le lait de chaque exploitation laitière est analysé au minimum 2 fois par mois et de façon inopinée.

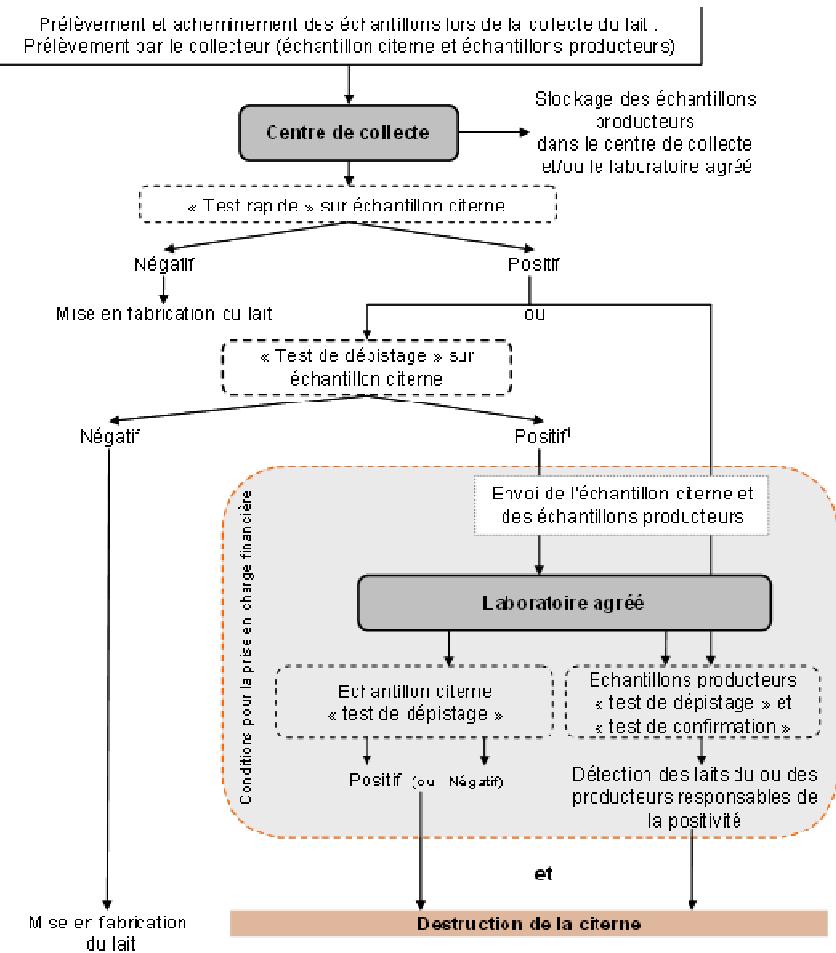
La filière s'est organisée pour effectuer de manière systématique un prélèvement de tank à lait par l'entreprise de collecte à chaque enlèvement de lait pour la très grande majorité des producteurs (plus de 90 %). Ces échantillons réfrigérés à +4°C sont conservés par les laiteries ou transmis au laboratoire interprofessionnel laitier. Ce dispositif a pour objectif de pouvoir assurer une traçabilité remontante en cas de besoin (cf. auto-contrôle transformateur). Ces prélèvements servent à l'analyse inopinée à la fréquence définie par les accords régionaux qui sont aujourd'hui en moyenne de 3 analyses par mois et par éleveur. L'auto-contrôle consiste en la réalisation d'un test de dépistage, et en cas de positivité du test de dépistage, de la réalisation de tests dits de « confirmation ».

AUTO-CONTROLE PAR LE TRANSFORMATEUR

Le transformateur contrôle la qualité de sa matière première avant mise en fabrication du lait.

Sur chaque citerne de collecte, un échantillon est prélevé pour analyse de composition et de qualité. Les transformateurs réalisent leurs analyses dans leurs laboratoires. Ils peuvent aussi faire analyser leurs échantillons de citernes par les laboratoires interprofessionnels laitiers.

Depuis 2008, par accord interprofessionnel national homologué relatif à la présence d'inhibiteurs dans le lait de vache, le dépistage des citernes est devenu obligatoire et suit le schéma suivant.



RÔLE DES LABORATOIRES INTERPROFESSIONNELS

Les laboratoires interprofessionnels laitiers analysent le lait fourni par les producteurs aux entreprises de transformation. Le lait est analysé sur différents critères. Les résultats d'analyses sont pris en compte pour la facturation du lait. Celui-ci sera payé en fonction de sa composition et de qualité hygiénique et sanitaire, par l'entreprise au producteur. Parmi ces critères, il y a la flore totale du lait, la recherche **d'inhibiteurs**, les taux de protéines et de matière grasse, etc.

Seize laboratoires en France métropolitaine réalisent ainsi ces analyses pour les 75 000 producteurs de lait. Pour chacun des critères, les méthodes et protocoles d'analyses sont contrôlés et harmonisés pour tous les laboratoires (par le Service des laboratoires au CNIEL).

METHODES DE RECHERCHE DES INHIBITEURS:

- « test rapide » : premier test réalisé sur l'échantillon citerne avant le dépotage de la citerne. Ce test est réalisé sous la responsabilité du collecteur. Parmi les tests disponibles sur le marché, le test rapide est choisi de manière à satisfaire au mieux les exigences réglementaires en matière de résidus d'antibiotiques. Les tests les plus fréquemment utilisés recherchent les résidus de bétalactamines. Des tests rapides sont également utilisés pour la recherche des tétracyclines et des sulfamides. Le choix des tests rapides est de la responsabilité du collecteur.

- « test de dépistage » : test réalisé selon la méthode décrite dans l'Avis relatif aux méthodes d'analyses agréées pour une utilisation dans le cadre du paiement du lait de vache et de chèvre en fonction de sa composition et de sa qualité du Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche publié au JORF le 1er août 2008. Le test de dépistage est utilisé pour les auto-contrôles inopinés réalisés sur les échantillons producteurs (prélèvements de tank). En cas d'auto-contrôle positif sur un lait de citerne, ce test de dépistage est utilisé pour vérifier la positivité de la citerne et analyser les échantillons de lait des producteurs.
- « test de confirmation » : ensemble de deux tests réalisés en laboratoire agréé sur les échantillons producteurs après un test de dépistage positif pour la confirmation de la positivité de l'échantillon producteur selon la méthode décrite dans l'Avis relatif aux méthodes d'analyses agréées pour une utilisation dans le cadre du paiement du lait.

RÉSULTATS DES AUTO-CONTRÔLES

AUTO-CONTRÔLE COLLECTE

Le nombre d'analyses d'auto-contrôles des citernes par les entreprises de collecte n'est pas connu au niveau national.

En revanche, le CNIEL établit, chaque année, un bilan des auto-contrôles positifs qui ont donné lieu à une demande de prise en charge dans le cadre de l'accord national.

Tableau 3: Bilan par le CNIEL des auto-contrôles de citerne positifs

	2010	2009	2008
Nombre de demandes de prises en charge (citernes positives)	407	460	378
Nombre de demandes acceptées	401	446	368
Nombre de producteurs responsables	412	455	377
Volume de lait détruit correspondant	6 418 196 L	6 779 928 L	5 596 999 L

Les nombre de demandes acceptées par rapport au nombre de demandes de prises en charge correspond à la concordance entre un test rapide avec le test de dépistage qui est de 97,6 %.

Ces volumes sont à rapporter au volume de lait produit par an, de l'ordre de 22 milliards de litres, et au nombre d'exploitations laitières. Ce volume de destruction de lait avant mise en production représente environ 0,03 % du lait produit et concerne environ 0,5 % des producteurs.

Les volumes de livraison par exploitation sont estimés être de l'ordre en moyenne de 3000 litres par exploitation variant de 200 litres à 15 000 litres. Les volumes de citernes sont de l'ordre de 25 000 litres allant de 1000 litres à 35 000 litres. Le nombre de vaches en moyenne par exploitation est de 46.

AUTO-CONTRÔLE DES PRODUCTEURS

Le nombre d'analyses inhibiteurs réalisées par les laboratoires interprofessionnels laitiers, principalement sur laits de troupeaux dans le cadre du paiement du lait, est suivi par le CNIEL via une enquête annuelle auprès des laboratoires.

Tableau 4 : Nombre annuel d'analyses d'auto-contrôle des producteurs réalisées par les laboratoires interprofessionnels laitiers. Données CNIEL

	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001
Nombre de producteurs	78292	82002	87903	93629	97507	103021	107485	110731	116004
Nombre d'analyses inhibiteurs	2871564	3108757	3088415	4082501	4184746	4466549	4737799	4859156	4347170

En moyenne, le nombre d'analyses annuelles par producteurs est de l'ordre de 40 par an soit un petit peu plus que 3 analyses par mois.

Les tests dits de dépistage ont évolué au cours du temps ainsi que les deux méthodes dites de « confirmation » sur gélose (*B. stearothermophilus* et *B. subtilis*) qui ont fait l'objet de révision.

Avant 2002	test de laboratoire utilisation <i>Streptococcus thermophilus</i> (JO 1983)
2002/2003/2004	Delvotest MCS
2005/2006/2007	CMT (Fournisseur Copan)
2008/2009/2010	CMT (Fournisseur DSM)
2011	Eclipse

Chaque année, au printemps, le CNIEL collecte auprès des laboratoires les résultats de l'année précédente (Tableau 5).

Les résultats donnant lieu à pénalisation correspondent à des échantillons positifs pour le test de dépistage et au moins des deux méthodes dites de confirmation. Le taux oscille entre 0,10 % et 0,18 %. Le changement de test

de dépistage en 2002 a été suivi d'une augmentation du nombre de tests positifs suivie d'un retour au taux de 0,10 %. Au cours des années, le taux de confirmation est passé de 66 % en 2001 à 41 % en 2009 ce qui met en évidence une évolution de la concordance entre les deux niveaux de tests qui peuvent s'expliquer soit par l'évolution des tests commerciaux choisis, soit par des évolutions en termes de résidus.

Tableau 5 : Analyse comparée des résultats du test de dépistage avec les tests dits de confirmation. Données CNIEL 2001-2009.

	Nombre d'analyses inhibiteurs	Nombre de positifs ou douteux	% de positifs au dépistage	Echantillons confirmés	% Positifs confirmés	Nombre de « confirmations » positives		
						B. stearo.	B. subtilis	B. subtilis
2001	4 347 170	8 037	0,18	5 296	0,12	5097	715	119
2002	4 859 156	13 913	0,29	8 813	0,18	7 977	900	828
2003	4 737 799	13 550	0,29	7 749	0,16	7 192	1 117	557
2004	4 466 549	11 250	0,25	5 934	0,13	5 710	686	224
2005	4 184 746	11 273	0,27	5 527	0,13	5 457	452	70
2006	4 082 501	9 483	0,23	4 920	0,12	4 629	409	78
2007	3 088 415	7 245	0,23	3 567	0,12	3 532	381	35
2008	3 108 757	8 048	0,24	3 394	0,10	3 346	401	48
2009	2 871 564	7 607	0,24	3 090	0,10	2 961	408	100

Sur le premier trimestre 2011, les laboratoires interprofessionnels laitiers ont mis en place le nouveau test Eclipse 3G avec une augmentation très importante du taux de dépistés positifs tandis que le taux d'échantillons confirmés était également augmenté (Tableau 6). Selon le CNIEL, cette augmentation serait en partie due à des problèmes de calage technique du nouveau test, l'évolution rapide du taux est en faveur d'une amélioration de la prise en main du test. Une partie de ces cas détectés positifs pourrait être également associée à la présence de substances pour lesquels le nouveau test est plus sensible que les précédents (Tétracycline). Le CNIEL souhaite donc faire évoluer les tests de confirmation pour augmenter le taux de confirmation notamment pour les tétracyclines.

Tableau 6 : Résultats 2011 associés au passage au test Eclipse 3G® en dépistage. Données CNIEL

	Nb d'analyses	Producteurs Positifs E3G	Producteurs confirmés	Taux de dépistés positifs	Taux de confirmés
TOTAL JANVIER	108317	2372	153	2,19%	0,14%
TOTAL FEVRIER	223759	4287	332	1,92%	0,15%
TOTAL MARS	228328	2911	274	1,27%	0,12%

PERFORMANCE DES TESTS

TEST DE DEPISTAGE

Depuis le 1^{er} Janvier 2011, le CNIEL a choisi d'avoir recours au test Eclipse 3G®, fabriqué et commercialisé par Zeu-Inmunotech (Espagne).

Principe :

Le test Eclipse 3G est basé sur une inhibition de la croissance bactérienne. Chaque puits de microplaques contient de la gélose Agar ensemencée avec des spores de *Bacillus Stearothermophilus* et un indicateur de pH. Lorsque la plaque est incubée à 65°C, les bactéries croissent et la production d'acide augmente, ce qui change le pH du milieu. Les variations de pH se caractérisent par un changement de couleur de l'indicateur coloré du bleu au jaune. Quand les échantillons contiennent un inhibiteur à une concentration supérieure au seuil de détection, les microorganismes ne se développent pas et aucun changement de couleur n'est observé. La lecture peut être visuelle ou réalisée avec un lecteur de microplaques. La positivité des échantillons inconnus est déterminée par comparaison avec un témoin négatif de lait.

Les sensibilités annoncées par le fournisseur pour le test Eclipse 3G® sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Limites de détection pour le test Eclipse 3G® annoncées par le fabricant.

	LD (µg/L)		LD (µg/L)
Bétalactamines		Macrolides	
Pénicilline G	3	Erythromycine	400-800
Ampicilline	4	Tylosine	80-100
Amoxicilline	4	Spiramycine	>400
Oxacilline	25	Aminoglycosides	
Cloxacilline	35	Streptomycine	2000
Céphalosporines		Gentamicine	400
Ceftiofur	100	Néomycine	1500
Cephapirine	8	Kanamycine	>2000
Cefalexine	75	Lincosamides	
Cefalonium	20	Lincomycine	150-300
Tétracyclines		Sulfamides	
Tétracycline	100	Sulfadiazine	100
Oxytétracycline	100	Sulfaméthazine	150
Doxycycline*	100	Sulfaméthoxypyridazine	100
Macrolides		Sulfanilamide	600
Erythromycine	400-800	Sulfaméthoxazole	100
Tylosine	80-100	Sulfathiazole	100
Spiramycine	>400		

TEST DE CONFIRMATION

La méthode de « confirmation » par diffusion en gélose (2 boites - CNIEL INHC 03), actuellement utilisée pour la « confirmation » des échantillons dépistés positifs avec le test Eclipse 3G® a été développée et validée à l'Anses Fougères à partir de la méthode à 3 boites de l'arrêté du 2 septembre 1983. Ces tests étaient ceux préconisés au niveau du contrôle de la qualité du lait.

Principe :

Les microorganismes test suivants sont utilisés : *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus subtilis*.

Ce test est basé sur le principe suivant :

- Un micro-organisme sensible aux substances anti-bactériennes est ensemencé à l'intérieur d'un milieu gélosé, coulé en boite de Pétri. Pour la méthode de diffusion réalisée avec *Bacillus subtilis*, l'addition de triméthoprime permet la détection des sulfamides dans le lait grâce à la synergie triméthoprime-sulfamides.
- Des disques de papier contenant une substance antibactérienne comme témoins et des disques préalablement plongés dans les échantillons de lait à analyser sont placés sur la surface du milieu inoculé, et sont ensuite incubés à une température optimale pour la croissance du microorganisme test.
- Le temps d'incubation de la boite *Bacillus stearothermophilus* est de $2h45 \pm 15$ minutes et celui de *Bacillus subtilis* est d'au moins 16 heures.

Après diffusion, la présence de substance antibactérienne peut produire une zone d'inhibition autour de l'échantillon en inhibant la croissance bactérienne du microorganisme test.

Sont considérés comme contenant des résidus de substances à activité antibiotique, les échantillons trouvés positifs par l'une au moins des 2 techniques de diffusion en gélose. De plus, chaque boîte présente une sensibilité particulière aux différentes familles d'antibiotiques, ce qui permet de donner les orientations suivantes :

- Positif *Bacillus stearothermophilus* > Bétalactamines, céphalosporines ou tétracyclines
- Positif *Bacillus subtilis* > Aminosides, quinolones, macrolides

Performances :

La méthode des 2 Boîtes est une méthode ancienne développée dans le cadre du contrôle des inhibiteurs. Elle a été évaluée récemment pour apprécier les performances de détection en fonction des LMR suivant la réglementation européenne (décision CE/2002/657). Le taux de faux-positifs obtenu après analyse de 100 échantillons de lait de vache et de 40 échantillons de chèvre, ainsi que 40 échantillons de lait de brebis a été de 0 % sur la boîte *Bacillus subtilis* et de 0 % sur la boîte *Bacillus stearothermophilus* sur le lait de vache uniquement. Un taux de faux-positif de 10 % a été trouvé pour les laits de chèvre et de brebis sur la boîte *Bacillus stearothermophilus*, mais cette caractéristique a été prise en compte dans le protocole de la méthode par la définition d'un seuil de positivité spécifique à ces laits, sur les boîtes ensemencées avec *Bacillus stearothermophilus*.

Les capacités de détection (CC β) déterminées lors de cette validation sont présentées dans le tableau suivant, pour les 2 boîtes, par comparaison avec les Limites Maximales de Résidus (LMR).

	Antibiotiques	LMR Lait (μ g/l)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
PENICILLINES	Benzylpénicilline	4		6
	Cloxacilline	30		60
CEPHALOSPORINES	Cefalonium	20		Entre 20 et 30
	Cefapirine	60		<30
	Cefazoline	50		Entre 25 et 50
MACROLIDES	Spiramycine	200	Entre 500 et 600	
TETRACYCLINES	CTC	100		300
AMINOSIDES	Gentamicine	100	Entre 60 et 100	
	Néomycine	1500	Entre 350 et 500	
	DHS	200	400	
QUINOLONES	Enrofloxacine	100	Entre 75 et 100	
LINCOSAMIDES	Pirlimycine	100	150	
DIVERS	Bacitracine	100		Entre 500 et 600

Les performances des laboratoires inter-professionnels laitiers sont évaluées annuellement par 4 chaînes d'essais inter-laboratoires permettant de compléter les données de performance issues de la validation par des données de performance issues de la pratique.

TESTS RAPIDES :

Le CNIEL souhaite faire évoluer la méthode de confirmation de la méthode 2 boîtes actuellement utilisée vers des tests rapides du commerce.

Des dossiers de validation nous ont été envoyés par le CNIEL pour 3 kits rapides applicables à la détection des résidus de béta-lactamines (pénicillines et céphalosporines) et de tétracyclines dans le lait :

- Betastar® Combo (Neogen, USA) ;
- Twinsensor® (Unisensor, Belgique) ;
- Charm ROSA® BLTET (Charm, USA).

De plus, un dossier de validation nous a été envoyé pour un test orienté vers la détection des sulfamides dans le lait :

- Charm ROSA® SULF (Charm, USA).

Principe :

Les tests rapides sont des tests basés sur la compétition vis-à-vis de la liaison à un récepteur et se présentent sous forme de bandelettes. Quand un antibiotique spécifique est présent dans l'échantillon de lait, il se lie aux récepteurs pour former un complexe stable non-actif. Sous cette forme, le récepteur n'est plus en mesure de se lier à la première ligne de capture (ligne Test) imprimée sur la bandelette. Au contraire, quand l'échantillon ne contient pas d'antibiotique spécifique, le récepteur reste libre et peut se lier à la ligne Test. Après quelques minutes, les lignes apparaissent sur la bandelette, la ligne test capture le récepteur actif restant et la ligne contrôle (CTRL) l'excès de réactif.

Dans le cas des 3 kits béta-lactamines-tétracyclines présentés dans ce document, 3 bandes sont présentes sur la bandelette : 1 bande contrôle, 1 bande béta-lactamines et une bande tétracyclines.

La durée de l'essai en fonction du test est d'environ 5 à 6 minutes. La lecture peut être visuelle ou automatique. Les 3 tests du commerce proposent un lecteur de bandelettes spécifique (Accuscan reader III (Neogen), Readsensor (Unisensor), ROSA reader (Charm)).

Performances :

Les dossiers de validation ont fait l'objet d'une étude par des laboratoires indépendants afin de déterminer si ces validations avaient été réalisées en accord avec la réglementation européenne (décision CE/2002/657) et de comparer les performances de ces différents tests rapides.

En conclusion, les 3 kits ont été validés suivant la décision européenne CE/2002/657.

Le tableau suivant présente les capacités de détection (CC β) des 3 différents kits capables de confirmer beta-lactamines et tétracyclines, par comparaison avec les Limites maximales de Résidus (LMR) dans le lait.

Tableau 8 : Capacité de détection des kits de détection rapide.

	Substance	LMR ($\mu\text{g/l}$)	Betastar® Combo		Twinsensor®		Charm ROSA®	
			Nb +/Nb sup	CC β ($\mu\text{g/l}$)	Nb +/Nb sup	CC β ($\mu\text{g/l}$)	Nb +/Nb sup	CC β ($\mu\text{g/l}$)
Pénicillines	Pénicilline G	4	59/60	4	20/20	2	30/30	2
	Ampicilline	4	58/60	4	20/20	3	30/30	4
	Amoxicilline	4	60/60	4	20/20	4	30/30	4
	Oxacilline	30	20/20	5	20/20	14	ND	ND
	Cloxacilline	30	20/20	5	20/20	6	29/30	30
	Dicloxacilline	30	20/20	6	20/20	6	Pas de chiffre	≤ cloxacilline
	Nafcilline	30	19/20	12	20/20	50	ND	ND
	Penethamate	4	20/20	80	ND	ND	ND	ND
Céphalosporines	Ceftiofur	100	58/60	90	20/20	10	ND	ND
	Desfuroyl ceftiofur	100	20/20	1000		ND	30/30	15
	Cefquinome	20	20/20	8	20/20	30	30/30	16
	Cefazoline	50	40/40	40	20/20 ²	18	29/30	15
	Cephapirine	60	19/20	9	20/20	6	30/30	6
	Desacetyl cephapirine	60	20/20	3	ND	ND	ND	ND
	Cefacetrile	125	20/20	40	20/20	35	29/30	11
	Cefoperazone	50	19/20	8	20/20	3	29/30	4
	Cefalexine	100	20/20	700	10/10	2000	29/30	20
	Cefalonium	20	20/20	5	18/20	>4	30/30	4
Tétracyclines	Tétracycline	100	58/60	100	20/20	40	30/30	30
	Oxytétracycline	100	60/60	100	20/20	30	30/30	75
	Chlortétracycline	100	20/20	35	20/20	25	28/30	>100
	Doxycycline*	---	59/60	14	20/20	14	ND	ND

(> LMR)

(< LMR)

ND : Non déterminé.

Nb +/ Nb sup = Nombre de résultats positifs / nombre d'échantillons de lait supplémentés analysés.

*Ne pas utiliser chez les vaches laitières.

Les 3 tests (Betastar® Combo; Twinsensor® ; Charm ROSA® BLTET) sont globalement conformes pour la détection des bêta-lactamines et des tétracyclines dans le lait de vache. Nous n'avons pas encore de données chèvre et brebis pour le test Charm ROSA® BLTET. Les 2 autres tests sont validés pour ces 2 espèces.

Le tableau suivant met en évidence pour chaque test les molécules qui présentent un problème, soit parce que le seuil de détection est trop élevé par rapport à la LMR, soit parce qu'il est beaucoup trop bas par rapport à la LMR.

	Betastar® Combo	Twinsensor®	Charm ROSA® BLTET
Détection > LMR	Desfuroyl ceftiofur (10*LMR), cefalexine (7*LMR) Penethamate (20*LMR)	Nafcilline (1.7*LMR), Cefquinome (1.5*LMR) et Cefalexine (20*LMR)	
Sensibilité << LMR	Les 3 oxacillines et nafcilline CTC	Les 3 oxacillines Toutes les tétracyclines	Oxacillines Céphalosporines Tétracycline

ND : pas de données de validation.

ADEQUATION DU TEST DE TEST DE DEPISTAGE ECLIPSE® AVEC LES TESTS DE « CONFIRMATION » :

Le tableau 9 présente une synthèse des capacités de détection (CC β) des 3 kits pour les bétalactamines et les tétracyclines, plus celles du test Eclipse® et de la méthode 2 Boites (boite *Bacillus stearothermophilus*).

Cette comparaison permet de relativiser les capacités de détection trop basses des tests pour certains antibiotiques. En effet, si le test Eclipse 3G® détecte au niveau de la LMR, les échantillons dépistés positifs ne seront pas « confirmés » en dessous de la LMR.

Les tests rapides sont plus sensibles que la méthode 2 Boites pour les bétalactamines et céphalosporines suivantes : oxacilline, dicloxacilline, cloxacilline, nafcilline, ceftiofur, cefquinome, cefazoline, cephapirine, cefoperazone et cefalonium. Le remplacement par un test rapide améliorera le taux de confirmation de laits contenant des résidus de céphalosporines.

En tenant compte de la limite de détection du test Eclipse 3G®, des laits contenant des concentrations sous la LMR pourront être confirmé par un test rapide pour les antibiotiques suivants : l'oxacilline (1/3 LMR), le ceftiofur (0.6 LMR) (avec le Twinsensor®), la cefazoline (0.4 LMR avec Twinsensor® et Charm®), la cephapirine (0.15 LMR), la cefalexine (0.6 LMR avec le Charm®), l'oxytétracycline (0.5 LMR avec le Twinsensor®).

Pour les tétracyclines, la méthode 2 boites présente des sensibilités entre 2.5 et 3 fois la LMR, alors que les tests rapides détectent les tétracyclines entre 0.3 et 1 fois la LMR. Pour la famille des tétracyclines, l'utilisation des tests rapides améliorera le taux de confirmation de la présence des résidus par rapport à la méthode actuelle.

Le tableau 10 compare les LMR avec les performances du test Eclipse 3G® et de la méthode des deux boîtes pour les aminoglycosides, les macrolides, les quinolones, les sulfamides et diverses molécules. Le test Eclipse permet de détecter la présence de ces molécules avec des performances variables.

L'utilisation de la boîte *B. subtilis* permet de confirmer la présence d'aminoglycosides, de macrolides, de quinolones et autres. Les performances relatives des deux méthodes sont à évaluer plus en détail pour des molécules d'usage relativement courant afin d'affiner les données disponibles. Les données d'auto-contrôles issues des années précédentes montrent que la détection de substances inhibitrices de *B. subtilis* est peu fréquente. Une analyse de ces positifs par des méthodes analytiques physico-chimiques permettrait de définir la nature des résidus responsables de ces résultats. En cas de mise en évidence de résidus particuliers, la pertinence de mise au point de méthodes plus sélectives et plus rapides pourraient être envisagée.

Conclusions :

L'utilisation d'un test rapide béta-lactamines et tétracyclines apportera une amélioration par rapport aux seuils de détection de la boîte *Bacillus stearothermophilus* de la méthode 2 Boîtes actuelle. Nous recommandons donc de remplacer la boîte *Bacillus stearothermophilus* par un de ces tests rapides béta-lactamines et tétracyclines. Une étude comparée de ces tests en situation terrain sera à réaliser avec l'interprofession.

Dans la mesure où ces tests rapides ne permettent pas de détecter les familles suivantes : macrolides, fluoroquinolones et aminoglycosides (alors que le test Eclipse® peut les détecter), nous recommandons de conserver la boîte *Bacillus subtilis* de la méthode 2 Boîtes. Le test Eclipse® et la boîte *Bacillus subtilis* ont des sensibilités globalement équivalentes pour ces 3 familles de molécules. Une étude complémentaire d'identification des résidus présents serait à réaliser pour améliorer notre connaissance des molécules présentes et orienter de futurs développements analytiques.

La stratégie recommandée est la suivante : après un résultat positif en Eclipse®, utiliser d'abord le test rapide béta-lactamines et tétracyclines. **Si le résultat est positif avec le test rapide, la mise en place la boîte *Bacillus subtilis* n'est pas nécessaire.** Si le résultat du test rapide est négatif, la boîte *Bacillus subtilis* est à mettre en place.

Tableau 9 : Bilan des capacités de détection pour les béta-lactamines et tétracyclines :

Groupe	Substance	LMR ($\mu\text{g/kg}$)	Sensibilité des tests ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
			Eclipse	Méthode 2 boîtes		Betastar® Combo	Twinsensor®	Charm ROSA® BLTET
				<i>B stearothermophilus</i>	Validation			
				Validation	CC	Validation	Validation	Validation
Pénicillines	Pénicilline G	4	2-3	6	4-5	4	2	2
	Ampicilline	4	3	ND	6	4	3	4
	Amoxicilline	4	3	ND	6	4	4	4
	Oxacilline	30	10	ND	30	5	14	ND
	Cloxacilline	30	30	60	50	5	6	30
	Dicloxacilline	30	ND	ND	30	6	6	≤ cloxacilline
	Nafcilline	30	ND	ND	20	12	50	ND
	Penethamate	4	ND	ND	ND	80	ND	ND
Céphalosporines	Ceftiofur	100	60	ND	≥150	90	10	ND
	Desfuroyl ceftiofur	100	ND	ND	ND	1000	ND	15 (métabolites)
	Cefquinome	20	≤200***	ND	300	8	30	16
	Cefazoline	50	20	25	30	40	18	15
	Cephapirine	60	8	15-30	20	9	6	6
	Desacetyl cephapirine	60	ND	ND	ND	3	ND	ND
	Cefacetrile	125	ND	ND	ND	40	35	11
	Cefoperazone	50	ND	ND	100	8	3	4
	Cefalexine	100	60	ND	100	700	2000	20
	Cefalonium	20	20/10***	20-30	20	5	4	4
Tétracyclines	Tétracycline	100	100	ND	250-300	100	40	20
	Oxytétracycline	100	50	ND	250-300	100	30	75
	Chlortétracycline	100	ND	300	300	35	25	100
	Doxycycline*	---	100	ND	≤200	14	14	ND

(> LMR)

(< LMR)

ND : Non déterminé.

***Résultats Fougères ; CC Données des chaines CNIEL.

Tableau 10 : Bilan des capacités de détection pour les autres familles d'antibiotiques – Comparaison Eclipse – Tests dits de confirmation.

Groupe	Substance	LMR ($\mu\text{g/kg}$)	Sensibilité des tests ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
			Eclipse® (/CC)		Méthode 2 boites		
		Données fournisseur	Résultats Fougères*** ou CC* ou **	CC β validation	CC* ou **	CC β validation	CC*
Aminoglycosides	Gentamicine	100	400	100*	≤ 100	100*	
	DHS	200	ND	>400*	400	$\leq 400^*$	
	Néomycine	1500	1500	500-750***	≤ 500	$\leq 500^*$	
	Streptomycine	200	2000	ND	ND		
	Kanamycine	150	>2000	ND	ND		
Macrolides	Spiramycine	200	>400	600*	≤ 600	$\leq 600^{**}$	
	Erythromycine	40	400-800	ND	ND		
	Tylosine	50	80-100	>50***	ND		
Quinolones	Enrofloxacine	100	ND	>100*	≤ 100	$\leq 100^*$	
	Marbofloxacine	75	ND	>150***	ND		
Sulfamides	Sulfadoxine	100	ND	100***	>>100	ND	
Divers	Bacitracine	150	ND	600*	ND	600	600*
	Pirlimycine	100	ND	ND	≤ 150	$\leq 100^{**}$	
	Lincomycine	150	150-300	>150*	ND		
	Rifaximine	60	ND	60***	ND		

*Résultats Fougères et résultats LIALs (Essais Inter-Laboratoires) ; **Résultats Fougères (résultats LIAL en attente) ; ***Résultats Fougères.

(V) CC β de la validation Fougères. ND : Non déterminé.

Références

Cazeau G, Botrel MA, Chazel M, Sala C, Calavas D. Enquêtes sur l'utilisation des antibiotiques par les vétérinaires en élevage bovin. Rapport d'analyse statistique. Afssa Lyon, 2009.

FAO/WHO/OIE. 2008. Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007. FAO, Rome, Italy, and WHO, Geneva, Switzerland.

Fabre JM, Moretain JP, Ascher F, Brouillet P, Berthelot X. Les principales causes d'inhibiteurs dans le lait. Résultats d'une enquête dans un millier d'élevage français. Bulletin des GTV, 1996, 3, 27-31.

Notice to applicants and guidelines. Veterinary Medicinal Product. Establishment of maximum residue limits (LMRs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. The rules governing medicinal products in the European Union. Vol 8, October 2005. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-8/pdf/vol8_10-2005_en.pdf

Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: General Approach to Testing. VICH GL33 (Safety: General Approach) - For implementation in February 2010 - Final Revision 2 at step 9. http://www.vichsec.org/en/GL33_st7-Rev2.doc

Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: General approach to establish a microbiological ADI. VICH GL36 (Safety: General Approach) May 2004 - Implemented in May 2005 http://www.vichsec.org/pdf/05_2004/GL36_st7_F_rev.pdf