

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 12 juillet 2012

AVIS

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

relatif aux méthodes d'analyse utilisées pour la détection des antibiotiques et 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.

L'Anses a été saisie le 13 Janvier 2012 par Direction Générale de l'Alimentation pour rendre un avis relatif à la validation des méthodes d'analyse utilisées pour la détection d'antibiotiques dans les laits destinés à l'alimentation humaine.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément à l'article L 1313-1 du code de la santé publique et en complément de la saisine du 10 février 2011 (référence 2011-SA-0038), la direction générale de l'alimentation consulte l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail sur la validation des méthodes d'analyse utilisées pour la détection des résidus d'antibiotiques dans les laits destinés à l'alimentation humaine (tests rapide de dépistage et méthode de confirmation) mis en œuvre dans le cadre de l'auto-contrôle par les laboratoires interprofessionnels d'analyse laitière.

Dans l'avis du 16 juin 2011, il est indiqué que les familles de molécules les plus fréquemment prescrites au niveau des élevages laitiers et les plus à risque en termes de santé publique sont les tétracyclines, les bétalactamines et les céphalosporines.

Dans le cadre du projet d'évolution de la méthode de confirmation proposée par le CNIEL et suite à la présentation de la saisine n°2011-SA-0038 lors de la commission scientifique et technique qui s'est tenue à la DGAL en octobre 2011, il apparaît nécessaire d'améliorer les performances des tests utilisés en dépistage et en confirmation afin de détecter les molécules des familles de macrolides, de quinolones et d'aminoglycosides également utilisées en élevage laitier.

Dans la mesure où il n'est pas possible de développer un test capable de détecter toutes les molécules des familles concernées, le développement d'un nouveau test rapide de confirmation selon cahier des charges « CNIEL IG INH 05 » ne pourra se faire que si les molécules à cibler prioritairement sont connues de façon préalable.

Il apparaît donc opportun de conduire un travail complémentaire sur les échantillons positifs au test Eclipse 3G ou à la boîte *Bacillus subtilis*, afin de pouvoir identifier les molécules à l'origine de la positivité.

En conséquence pour mieux appréhender les molécules à cibler et optimiser le choix des méthodes de détection des résidus d'antibiotiques pour les laits destinés à la consommation humaines, les questions suivantes ont été posées :

- Une liste des molécules d'antibiotiques devant prioritairement être détectées par les méthodes de dépistage et de confirmation peut-elle être établie par l'ANSES et portée à la connaissance de l'administration ?
- L'agence peut-elle valider les tests de dépistage rapides à préconiser et en particulier le test Eclipse 3G actuellement utilisé ? D'autres tests rapides disponibles sur le marché s'avéreraient-ils plus pertinents pour détecter en première intention (dépistage) les principales molécules utilisées en élevage laitier ?
- L'agence peut-elle valider une ou plusieurs méthode(s) de confirmation, sur la base du cahier des charges CNIEL IG INH 05 et d'une liste de molécules à cibler en priorité : test(s) rapide(s) dont le CHARM ROSA BLTET actuellement utilisé associé(s) ou non à une boîte *Bacillus subtilis* ou tout autre méthode qui permettrait de détecter les molécules identifiées.

Des éléments de réponse pour le 30 Juin 2012 étaient attendus.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Afin de répondre à ces questions, l'appui scientifique et technique du laboratoire de Fougères a consisté dans :

- 1) La consultation de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire pour la liste des molécules présentes dans les médicaments vétérinaires ayant une AMM pour les bovins.
- 2) L'organisation d'études de validation durant le premier semestre 2012 pour les méthodes Eclipse 3G et CHARM ROSA BLTET.
- 3) La collecte auprès de laboratoires d'analyse interprofessionnel laitier (LIAL) d'échantillons de laits « positifs » au test Eclipse 3G confirmés ou non par le test CHARM ROSA BLTET. Ces laits ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour identifier les composés présents afin de les comparer aux résultats des deux tests.
- 4) L'analyse des résultats des études de validation et des résultats expérimentaux sur les laits collectés.

L'expertise n'a pas fait l'objet d'une évaluation collective et se base sur l'expérience et les compétences du laboratoire national de référence en matière de résidus d'antibiotiques.

3. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Les molécules les plus à risques d'être présentes dans le lait de vache sont les tétracyclines (tétracycline, oxytétracycline), les bétalactamines (céphalonium, amoxicilline, pénicilline G, céphapirine, cloxacilline) et les aminosides (dihydrostreptomycine, néomycine).

Les deux tests mis en place par l'interprofession laitière ont été évalués en appliquant le protocole (Manuel CNIEL) appliqué par les LIAL qui précise le protocole des fabricant afin de réduire le taux de faux positifs : le test Eclipse 3G et le test CHARM ROSA ont été validés par le Laboratoire de Fougères, et les performances attendues sont conformes à un contrôle du respect des limites maximales de résidus (LMR), exceptées pour la cefquinome pour laquelle le test Eclipse 3G a une capacité de détection au-delà de la LMR. Pour les autres molécules pouvant être confirmées par le test *Bacillus subtilis*, l'étude comparative montre que le test Eclipse 3G a de meilleures capacités de détection que le test *Bacillus subtilis* qui ne peut confirmer que des concentrations au delà de la LMR excepté pour la néomycine.

Afin de s'assurer de la pertinence de la stratégie d'autocontrôle mise en place par l'interprofession laitière, une série de 120 échantillons de lait positifs E3G, positifs ou négatifs au test CHARM ROSA, ont été analysés par le LNR pour identifier les molécules pouvant être présentes, et estimer leur fréquence d'occurrence et leurs niveaux de confirmation. Cette étude a montré que sur 120 échantillons positifs E3G dont la moitié était positif CHARM ROSA, 45 (37,5 %) ne contenaient pas de molécules détectables par les méthodes CL-SM/SM ciblées. Le test CHARM ROSA confirme la présence des résidus de bétalactamines et de tétracyclines avec un taux de réponse très satisfaisant à partir de $\frac{1}{4}$ à $\frac{1}{2}$ LMR des molécules observées dans l'étude et a un faible taux de faux positifs. Cette combinaison de tests a donc une capacité de détection et de « confirmation » globalement inférieure à la LMR pour les deux grandes classes de molécules ayant la plus forte probabilité d'être présentes dans le lait. Des résidus de cefquinome n'ont pas été observés malgré un usage de cette molécule aussi fréquent que pour les autres bétalactamines observées. La limite de détection élevée du test E3G peut expliquer ce résultat. D'autres molécules ont été observées à l'état de traces ou à des concentrations inférieures à la LMR dans une part importante des échantillons analysés. La positivité du test Eclipse 3G ne peut pas toujours être expliquée par les traces observées. Des investigations complémentaires sont à mener pour rechercher par des approches expérimentales l'origine de cette positivité.

La campagne d'analyse n'a pas porté sur des échantillons négatifs en E3G et ne permet pas d'évaluer le taux de faux négatifs associés à cette combinaison de tests pour certaines molécules. La campagne d'analyse n'a porté que sur une saison de production et sur des laits de vaches. Des campagnes comparables pourraient être programmées pour d'autres saisons de production et d'autres espèces productrices de lait après accord sur leur classement en terme de priorité et d'accord sur les modalités de réalisation.

Les résultats des études de validation réalisées au cours de ce semestre, et de la campagne d'analyse sont cohérents. Le risque de présence d'autres molécules à des concentrations supérieures à la LMR semblent faible à l'issue de cette première étude. Mais l'étude expérimentale ne permettait d'évaluer le taux de faux négatif.

La mise en évidence de traces de gamithromycine sur plusieurs échantillons a fait l'objet d'un signalement à l'ANMV dans le cadre de la pharmacovigilance. Cette molécule ne dispose pas de LMR pour le lait et n'est pas à administrer à des femelles laitières. Elle peut être toutefois administrée à des femelles en gestation, non productrices de lait, sous certaines conditions de respect d'un délai d'attente.

A ce stade du travail, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

- La stratégie d'auto-contrôle mise en place par l'interprofession laitière permet de réduire le risque d'utilisation de lait présentant le plus de risques de dépassement de LMR pour les

molécules les plus couramment utilisées. La combinaison des deux tests est efficiente pour les bétalactamines (exceptée pour la cefquinome) et les tétracyclines.

- Le risque d'occurrence d'autres molécules jugées prioritaires à des concentrations supérieures à la LMR est jugé faible sur la base de ces premiers résultats excepté pour la cefquinome.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments recommande :

- des études complémentaires sur des laits négatifs pour vérifier l'absence d'autres molécules au-delà de la LMR et évaluer les taux de faux négatifs des tests.
- des études complémentaires sur des laits positifs collectés pour étudier une éventuelle saisonnalité ou les résidus présents dans le lait d'autres espèces (ovin, caprin).

L'Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments rappelle l'interdiction d'utiliser chez des femelles en lactation des médicaments non autorisées chez ces animaux.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Antibiotiques, résidus, lait, LMR, méthodes de dépistage.

ANNEXE(s)

Rapport confidentiel du laboratoire de Fougères.