RÉSUMÉ

de la thèse de doctorat intitulée

OPTIMISATION DES MÉTHODES D'ÉVALUATION RAPIDE DE CERTAINS INHIBITEURS DU LAIT COLLECTÉ

préparée par **Drd. Docteur médecin vétérinaire Pop (Popa) Mihaela**
sous la direction scientifique de Mme **Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu**

Mots-clés: lait, inhibiteurs, substances antibactériennes, antibiotiques, tests rapides, inhibiteurs, Delvotest SP NT 100, radio-immuno-analyse, test ELISA.

La thèse de doctorat, hors la table de matières, le résumé, l'introduction et la bibliographie, comprend deux parties principales distinctes (*Étude bibliographique* et *Recherches propres*).

La première partie, **PARTIE I, ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**, comprend deux chapitres, à savoir:

Le premier chapitre, **CHAPITRE I – LE LAIT, COMPOSANT DE BASE DE L'ALIMENTATION HUMAINE** décrit les aspects essentiels de l'importance du lait dans la diète humaine équilibrée et les principales caractéristiques du lait, étant structuré en sous-chapitre ci-après : *Alimentation et santé, Importance du lait, Caractéristiques organoleptiques du lait* (Apparence et consistance du lait, Couleur du lait, Goût du lait, Odeur du lait), *Caractéristiques physico-chimiques du lait, Compositions chimique du lait* (Eau, Lipides, Glucides, Protéines, Substances minérales, Vitamines, Ensimes), *Paramètres de qualité pour que le lait cru soit accepté dans les unités de traitement et/ou transformation, Gestion de l'assurance de la qualité du lait.*

Le deuxième chapitre, **CHAPITRE II – LES SUBSTANCES INHIBITRICES DU LAIT** présente des aspects sur les principales substances inhibitrices qui peuvent être présentes dans le lait et les aspects négatifs des résidus de substances antibactériennes du lait sur la santé humaine et le traitement industriel du lait, étant structuré en sous-chapitres suivants : *Généralités sur la présence des substances inhibitrices dans le lait, Classification des substances antibactériennes, Champ d'action, Mécanismes d'action, Pharmacocinétique, Sécurité des aliments et xénobiotiques chimiques, Conséquences de la présence des substances inhibitrices dans le lait sur le consommateur* (Effets négatifs des résidus

d'antibiotiques sur l'homme, Implications d'ordre technologique, Limites maximales admises des résidus d'antibiotiques dans le lait).

La deuxième partie, **PARTIE II, RECHERCHES PROPRES**, comprend trois chapitres, à savoir *Matériaux et méthodes de travail, Résultats et discussions, Conclusions et recommandations*.

Les trois principaux buts de cette thèse de doctorat ont été représentés par :

- le suivi de la présence ou de l'absence des résidus de certaines substances antibactériennes (principalement des antibiotiques) dans le lait cru à travers de tests rapides basés sur des méthodes microbiologiques (tests qualitatifs microbiens);
- l'identification des groupes d'antibiotiques et sulfamides dont les résidus ont été identifiés dans les échantillons positifs, en utilisant la radio-immuno-analyse (le test semi-quantitatif Charm II basé sur des récepteurs microbiens);
- la quantification des résidus de substances antibactériennes (à travers la méthode immuno-enzymatique ELISA) et comparaison des valeurs obtenues avec les limites maximales admises par la législation nationale et européenne en vigueur.

CHAPITRE III – MATÉRIAUX ET MÉTHODES DE TRAVAIL

Pour le déroulement des études, on a prit des échantillons de lait cru de cinq centres de collecte et deux fermes de bovines situés aux alentours de la ville de Bucarest (département d'Ilfov) qui fournissent constamment du lait cru pour la consommation des personnes de Bucarest et du lait comme matière première aux unités de transformation. Les échantillons destinés à la détermination des résidus de substances inhibitrices du lait ont été pris en respectant certaines règles de prise, étiquetage, conditionnement, transport et temps de traitement des échantillons.

Les recherches ont été effectuées pendant 6 années, à partir de l'année 2008 jusqu'en 2013, sur un nombre de 2214 échantillons de lait cru collecté de cinq centre de collecte et deux fermes situés aux alentours de la ville de Bucarest, comme il suit : 421 échantillons en 2008, 378 échantillons en 2009, 397 échantillons en 2010, 227 échantillons en 2011, 404 échantillons en 2012 et 387 échantillons en 2013.

Afin de déterminer les résidus des substances inhibitrices des échantillons de lait cru on a déroulé une succession d'étapes de travail, à savoir :

1. Le test qualitatif microbien

On a utilisé le screening (le suivi) des substances inhibitrices présentes dans le lait cru. Étant un test qualitatif, celui-ci ne donne des informations précises ni sur la substance inhibitrice concernée, ni sur la quantité retrouvée dans l'échantillon, mais il présente des avantages majeurs : détecte les échantillon positifs, peut éliminer les échantillons négatifs, est

relativement bon marché, ne nécessite pas un appareillage coûteux, peut être appliqué à la fois dans des conditions de terrain et de laboratoire et les résultats sont fournis en 3 heures environ. Ce test a permis d'identifier la présence de la plupart des substances antibactériennes utilisées dans la thérapie vétérinaire et ayant un grand risque de contamination du lait.

Le test utilisé durant cette étude (Delvotest SP NT 100) a permis l'identification de la présence dans les échantillons de lait cru analysé des substances antibactériennes ci-dessus : pénicilline G, cloxacilline, dicloxacilline, oxacilline, nafcilline, ampicilline, amoxicilline, céfapirine, céphalonium, céphalexine, cephacetrile, céfopérazone, ceftiofur, tétracycline, oxytétracycline, clortétracycline, tylosine, érythromycine, lincomycine, spiramycine, gentamicine, neomicine, dihydrostreptomycine, kanamycine, chloramphénicol, sulfaméthazine, sulfadiméthoxine, sulfathiazole, sulfadiazine, dapsonne, triméthoprime, étant considéré à présent le test de ce type le plus performant.

2. Le Test semi-quantitatif Charm II basé sur des récepteurs microbiens

Ce test a été utilisé pour les échantillons qui ont réagi positivement au test qualitatif microbien et il est basé sur la liaison irréversible des groupements fonctionnels des substances antibactériennes de l'échantillon aux sites récepteurs des bactéries testées. Le test implique également l'utilisation des substances antibactériennes radio-activement marquées ^{14}C ou ^3H qui sont en compétition avec les inhibiteurs de l'échantillon.

3. Le test quantitatif immuno-enzymatique

Le test ELISA a été utilisé comme méthode quantitative afin de déterminer les résidus de substances antibactériennes du lait. La méthode immuno-enzymatique est basée sur la réaction antigène-anticorps et les résultats obtenus peuvent être quantifiés aux fins de l'appréciation quantitative des résidus de substances inhibitrices des échantillons de lait analysés. Pendant les recherches effectuées, on a utilisé des kits pour déterminer les substances antibactériennes fournies par les entreprises R-Biopharm (Allemagne) et Bio Scientific (États-Unis de l'Amérique).

CHAPITRE IV – RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

En utilisant le **test qualitatif microbien Delvotest SP NT 100**, à partir de 2008 jusqu'en 2013 on a analysé 2214 échantillons de lait cru pris de cinq centres de collecte et deux fermes situés aux alentours de la ville de Bucarest (département d'Ilfov). Parmi les 2214 échantillons analysés, 2032 échantillons (91,78%) ont fourni des résultats négatifs, 94 échantillons (4,25%) ont fourni des résultats douteux, pendant que 88 échantillons (3,97%) ont fourni des résultats positifs.

Afin de dépister les éventuelles réactions faussement positives et pour clarifier la situation des échantillons douteux, on a ré-analysé les échantillons qui ont fourni des résultats positifs et douteux suite à l'application initiale du test Delvotest SP NT 100, après leur

traitement thermique pendant 10 minutes à 82°C. Suite à nouveaux tests des échantillons ayant initialement une réaction positive et douteuse, après le traitement thermique, on a établi un nombre de 84 échantillons (3,79% du total) qui avaient présenté lors du premier test une réaction faussement positive et à la fin on les a considéré des échantillons négatifs.

De la sorte, suite à l'utilisation du test qualitatif microbien Delvotest SP NT 100, parmi les 2214 échantillons de lait cru analysés, 2116 échantillons (95,57% des échantillons totaux analysés) ont présenté un résultat négatif, pendant que 98 échantillons (4,43% des échantillons totaux analysés) ont été détectés comme positifs, à savoir ont contenu des résidus de substances antibactériennes ayant une concentration supérieure à la limite de détection de la méthode.

En ce qui concerne la corrélation entre les échantillons positifs et la saison, l'analyse des données obtenues a relevé que, durant l'intervalle concernée, le plus grand nombre d'échantillons positifs a été enregistré pendant les mois de printemps (mars-mai). Suite au traitement statistique des résultats obtenus, on a observé une décroissance graduelle du nombre des échantillons positifs pour les résidus de substances antibactériennes au début et durant l'été et une nouvelle croissance au début de l'automne, et non au taux enregistrés durant les mois du printemps. Par rapport au mois d'octobre, la dynamique des échantillons positifs a manifesté une ligne descendante durant l'hiver, pendant cette saison la contamination avec des résidus de substances antibactériennes ayant le plus bas niveau de toute l'année.

La détermination semi-quantitative des résidus de substances antibactériennes des échantillons de lait cru a été ré-analysée **à travers la méthode de radio-immuno-analyse Charm II**, afin d'identifier les groupes de substances antibactériennes des résidus présents dans les échantillons déterminés comme positifs suite à l'application du test qualitatif microbien.

La méthode utilisée a permis la classification des substances antibactériennes présentes comme des résidus dans les échantillons de lait cru analysés dans 7 groupes distincts : aminoglycosides du tipe I, aminoglycosides du tipe II, phénicols, bêta-lactamines, macrolides/lincosamides, tétracyclines, sulfamides.

Suite aux analyses effectuées, parmi les 98 échantillons analysés, 69 échantillons (70,41%) ont été contaminés par une seule classe de substances antibactériennes et 29 échantillons (29,59%) ont contenu de résidus de substances antibactériennes classifiées dans deux groupes différents.

Durant la période concernée, dans les échantillons contaminés par un seul groupe de substances antibactériennes, les antibiotiques bêta-lactamines ont été identifiés dans 38 échantillons (55,07%), les tétracyclines dans 11 échantillons (15,94%), aminoglycosides du

type I (neomicine, gentamicine) dans 5 échantillons (7,25%), aminoglycosides du type II (streptomycine, dihydrostreptomycine, gentamicine) dans 7 échantillons (10,14%), macrolides/lincosamides dans 5 échantillons (7,25%), et les sulfamides dans 3 échantillons (4,35%). Les antibiotiques du groupe des phénicolés n'ont été identifiés dans aucun échantillon analysé.

Quant aux échantillons dans lesquels on a identifié des résidus de substances antibactériennes appartenant à deux groupes différents, on a remarqué la fréquence très élevée de l'association des bêta-lactamines et aminoglycosides, étant donné que ces deux groupes d'antibiotiques complètent très bien leur champ d'activité ; parmi l'ensemble des associations déterminées durant les expériences, on a identifié cette combinaison dans 20 des 29 échantillons analysés. On a également identifié des échantillons dont on a déterminé des associations entre diverses aminoglycosides et tétracyclines, cette chose étant liée à l'utilisation de ces antibiotiques dans le traitement des mammites des vaches laitières.

Selon les résultats globaux, on a identifié 60 échantillons de lait contenant des résidus d'antibiotiques du groupe des bêta-lactamines (47,24%), 40 échantillons de lait contenant des résidus d'aminoglycosides (31,50%), 15 échantillons de lait contenant des résidus de tétracyclines (11,81%), 9 échantillons de lait contenant des résidus de macrolides / lincosamides (7,09%) et 3 échantillons de lait contenant des résidus de sulfamides (2,36%). On n'a pas identifié des échantillons de lait contenant des résidus d'antibiotiques du groupe des phénicolés.

En ensemble, à partir de l'année 2008 jusqu'en 2013, à travers la technique **ELISA**, on a quantitativement déterminé des résidus de substances antibactériennes dans 27 échantillons de lait cru. Parmi ces 127 échantillons, 60 échantillons ont été positifs pour les résidus de *bêta-lactamines*; la valeur la plus basse des résidus a été 6 µg/kg, et la valeur la plus élevée a été de 74 µg/kg, avec une moyenne de 26,13 µg/kg.

Quoique le kit ELISA utilisé dans cette étude n'ait pas permis la détermination de chaque représentant de la classe des bêta-lactamines et seulement du groupe per ensemble, on peut considérer les taux déterminés élevés, tenant compte que les limites maximales admises de la pénicilline G, de l'ampicilline et de l'amoxicilline dans le lait sont de 4 µg/kg, dans les conditions dans lesquelles ces antibiotiques sont reconnus comme les bêta-lactamines les plus utilisés dans la thérapeutique.

En ce qui concerne les résidus d'*aminoglycosides*, durant la période concernée pendant l'étude on a analysé 40 échantillons positifs. Il convient de remarquer que la méthode a permis d'identifier de façon exacte l'antibiotique aminoglycosidique; de ce fait, dans les échantillons analysés on a identifié les antibiotiques gentamicine, streptomycine / dihydrostreptomycine et neomicine.

Les résidus de gentamicine ont été déterminés dans 7 échantillons de lait; la valeur la plus basse des résidus a été de 179 µg/kg, et la valeur la plus élevée a été de 287 µg/kg, avec une moyenne de 221,14 µg/kg. Tous les 7 échantillons ont présenté des résidus supérieurs à la limite maximale admise (100 µg/kg).

Les résidus de neomicine ont été déterminés dans 12 échantillons de lait; la valeur la plus basse des résidus a été de 309 µg/kg, et la valeur la plus élevée a été de 2.280 µg/kg, avec une moyenne de 849,83 µg/kg. Il convient de remarquer que seulement deux échantillons ont présenté des valeurs de la neomicine supérieures à la limite maximale admise (1.500 µg/kg).

En ensemble, à partir de l'année 2008 jusqu'en 2013 on a enregistré 21 échantillons positifs pour les résidus de streptomycine / dihydrostreptomycine; la valeur la plus basse des résidus a été de 302 µg/kg, et la valeur la plus élevée a été de 673 µg/kg, avec une moyenne de 409,95 µg/kg. Tous les 21 échantillons ont présenté des résidus supérieurs à la limite maximale admise (200 µg/kg). Ni dans le cas des résidus de streptomycine / dihydrostreptomycine on n'a pas observé une tendance claire d'évolution décroissante des concentrations déterminées durant les six années d'étude.

Durant les 6 années d'étude on a enregistré 15 échantillons positifs pour les résidus de *tétracycline*; la valeur la plus basse des résidus a été de 113 µg/kg, et la valeur la plus élevée a été de 443 µg/kg, avec une moyenne de 224,27 µg/kg. Tous les 15 échantillons ont présenté des résidus supérieurs à la limite maximale admise (100 µg/kg).

Parmi les 127 échantillons positifs pour des résidus de substances antibactériennes, les *macrolides* ont été identifiées et quantifiées dans 9 échantillons de lait cru.

Les résidus de tilosine ont été déterminés dans 6 échantillons de lait; la valeur la plus basse des résidus a été de 62 µg/kg, et la valeur la plus élevée a été de 113 µg/kg, avec une moyenne de 88,17 µg/kg. Tous les 6 échantillons ont présenté des résidus supérieurs à la limite maximale admise (50 µg/kg).

Les résidus d'érythromycine ont été déterminés dans 3 échantillons de lait; la valeur la plus basse des résidus a été de 59 µg/kg, et la valeur la plus élevée a été de 97 µg/kg, avec une moyenne de 78 µg/kg. Tous les 3 échantillons ont présenté des résidus supérieurs à la limite maximale admise (40 µg/kg).

Les résidus de *sulfamides* ont été déterminés dans 3 échantillons de lait; la valeur la plus basse des résidus a été de 75 µg/kg et la valeur la plus élevée a été de 180 µg/kg, avec une moyenne de 125,33 µg/kg. Parmi les trois échantillons positifs seulement deux ont présenté des résidus supérieurs à la limite maximale admise (100 µg/kg).

CHAPITRE V. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS présente un nombre de 17 conclusions et recommandations issus des résultats obtenus.