

Détection des inhibiteurs dans le lait d'industrie

Introduction

Cette méthode décrit la procédure à suivre pour la détection des antibiotiques et des sulfamides dans le lait de l'industrie.

Le lait cru, soumis à cette détection, subit un premier test de triage au moyen du Delvotest[®] SP, Delvotest[®] Mini ou Delvotest[®] SP 5PACK. Tous les échantillons qui, après la période d'incubation définie, donnent un résultat positif ou douteux, doivent être confirmés. Cette confirmation est effectuée après le chauffage pendant 10 minutes à 80°C des échantillons de lait originaux. Les échantillons pour lesquels une inhibition est à nouveau constatée, sont considérés comme positifs.

Un échantillon de lait exempt d'antibiotiques et un échantillon standard de pénicilline (4 µg/l ou 4 ppb) sont systématiquement analysés en parallèle pour vérifier le bon déroulement du test.

Le Delvotest[®] SP (et ses variantes Delvotest[®] Mini ou Delvotest[®] SP 5PACK) est un test de sélection microbiologique à large spectre, permettant de déceler les résidus de substances anti-infectieuses dans le lait. L'utilisation de ce test permet de déceler au niveau des MRL (Maximum Residue Limit) un certain nombre de substances reprises dans la liste de MRL définies pour le lait dans la législation européenne (Règlement CEE 2377/90 et ses modifications ultérieures). L'utilisation du Delvotest[®] SP ou de ses variantes n'exclut pas que, pour certaines molécules (par exemple, les tétracyclines ou les quinolones, ...) utilisées dans des médicaments vétérinaires, des résidus puissent être présents dans le lait à des teneurs supérieures aux MRL, sans pour autant y être décelées. Il en est de même pour certaines substances interdites comme le chloramphénicol ou les nitrofuranes. Si l'on veut être sûr à 100% de la sécurité du produit en ce qui concerne la présence de résidus d'antibiotiques, il convient de mettre en œuvre des tests complémentaires en parallèle.

A. Principe du test

Un échantillon de lait est laissé à diffuser dans un milieu gélosé contenant des substances nutritives, un indicateur de pH et du triméthoprime,ensemencé par des spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Après incubation, la croissance normale du micro-organisme et la production d'acide qui en résulte provoquent le virage de couleur de l'indicateur de pH du pourpre (violet) vers le jaune. En présence de substances inhibitrices, la couleur du milieu gélosé reste pourpre (violet) après la période d'incubation prescrite.

B. Matériel

B.1. Lait exempt de substances inhibitrices

Lait entier, exempt de substances antibactériennes

B.2. Solution standard de pénicilline

Standard pénicilline à 4µg/l ou 4 ppb (≡ 0.0067 U.I./ml), réalisé avec le lait exempt de substances inhibitrices (B.1.)

Cette solution standard peut être conservée au maximum 3 mois à -18°C.

B.3. Kits de tests : choix entre trois versions commerciales

B.3.1. Delvotest[®] SP (DSM-Gist)

B.3.2. Delvotest[®] Mini (DSM-Gist) - conditionnement de 25 ampoules

B.3.3. Delvotest[®] SP 5PACK (DSM-Gist). Une boîte 5PACK contient 5 microplaques dont les puits sont remplis d'un milieu gélosé déterminé et une bouteille contenant environ 500

pastilles de nutriments. Les microplaques sont recouvertes d'une feuille d'aluminium et sont constituées de 6 blocs de 16 cupules.

B.4. Système d'incubation: suivant la version du test utilisée, choix entre différents systèmes d'incubation, réglés à 64.0°C

B.4.1. Bloc chauffant spécifique réglé à 64.0 +/- 0.5°C

B.4.2. Bain-marie à circulation, réglé à 64.0 +/- 0.5°C. Le bain-marie doit être pourvu d'un couvercle.

B.4.3. Étuve à circulation, réglée à 64.0 +/- 0.5°C

B.5. Bain-marie à circulation, réglé à 80 +/- 1°C

B.6. Micropipette à embouts jetables permettant des prélèvements de 100 µl

Triage

C.1. Après mélange, un échantillon représentatif de lait du tank à analyser est prélevé. En attendant l'analyse, cet échantillon de lait est conservé entre 0°C et 5°C.

C.2. Identifier chaque cupule (B.3.1. ou B.3.2.) ou chaque puits de la microplaque (ou du bloc) (B.3.3.).

C.3. Après avoir enlevé la feuille d'aluminium, ajouter une pastille de nutriments à chaque cupule (B.3.1. ou B.3.2.) ou à chaque puits de la microplaque (ou du bloc) (B.3.3.).

C.4. Mélanger les échantillons à analyser. Transférer 100 µl de l'échantillon de lait dans une cupule (B.3.1. ou B.3.2.) ou dans un puits de la microplaque (B.3.3.).

C.5. Transférer 100 µl du lait exempt de substances inhibitrices (B.1.) dans une cupule (B.3.1. ou B.3.2.) ou dans un puits de la microplaque (B.3.3.).

C.6. Transférer 100 µl du standard pénicilline (B.2.) dans une cupule (B.3.1. ou B.3.2.) ou dans un puits de la microplaque (B.3.3.).

C.7. Sceller les cupules avec du ruban adhésif ou les puits de la microplaque avec la feuille autocollante fournie avec le kit. Mettre à incuber à 64.0 +/- 0.5°C. Les cupules sont incubées dans un incubateur spécifique (B.4.1.) ou dans un bain-marie (B.4.2.) ou dans une étuve ventilée (B.4.3.). Les microplaques ou les parties de microplaque sont incubées dans un bain-marie (B.4.2.) ou dans une étuve ventilée (B.4.3.).

Pour le Delvotest[®] SP et le Delvotest[®] Mini, le temps d'incubation à respecter est de 2h50. Pour le Delvotest[®] SP 5PACK (microplaque), le temps d'incubation à respecter est de 2h45.

C.8. Évaluation des échantillons - Interprétation des résultats

La couleur du milieu gélosé des cupules ou des puits de la microplaque doit être évaluée directement après incubation.

C.8.1. Une coloration pourpre (ou violette) du milieu confirme la présence de substances antibactériennes.

C.8.2. Une coloration jaune du milieu témoigne de l'absence ou de la présence à des teneurs non décelables de substances antibactériennes.

C.8.3. Le milieu des cupules ou des puits correspondant aux échantillons de contrôle (C.5.) doit présenter une coloration jaune, sans quoi les spores présentent une vitalité insuffisante et l'essai doit être recommencé.

C.8.4. Le milieu des cupules ou des puits correspondant aux standards pénicilline (C.6.) doit présenter une coloration inchangée, sans quoi les spores offrent une sensibilité insuffisante et l'essai doit être recommencé.

C.9. Confirmation des résultats

Tous les échantillons présentant un résultat tel que décrit au point C.8.1. doivent être confirmés selon la méthode D.

D. Confirmation

D.1. Chauffage du lait

Tous les échantillons de lait positifs ou douteux doivent être chauffés durant 10 minutes dans un bain-marie à 80°C (B.5.). Il est important de vérifier que le niveau d'eau dans le bain-marie soit supérieur d'au moins 1 cm au niveau du lait. Ce chauffage permet la destruction des substances antibactériennes naturellement présentes dans le lait. Après chauffage, les échantillons de lait sont immédiatement refroidis sous eau courante pour les ramener à une température de conservation comprise entre 0°C et 5°C.

D.2. La méthode décrite au point C. est alors appliquée aux échantillons de lait chauffés afin de confirmer la présence des substances antibactériennes étrangères au lait.

D.3. Évaluation des échantillons - Interprétation des résultats

Les échantillons pour lesquels le milieu conserve la coloration pourpre (ou violette), obtenue lors du premier test sont considérés comme positifs. Le bon déroulement du test est contrôlé par l'analyse simultanée de lait exempt de substances inhibitrices et de standards pénicilline.