

## EVALUATION : KIT SNAP™ DE DETECTION DES $\beta$ -LACTAMINES

**V**u leurs conséquences néfastes en santé publique et en technologie laitière, la présence éventuelle de résidus d'antibiotiques dans le lait est fréquemment contrôlée directement chez le producteur ou à l'arrivée en usine. Des tests rapides et de mise en oeuvre facile sont alors nécessaires. Compte-tenu de la composition des spécialités vétérinaires, la détection d'éventuelles  $\beta$ -lactamines constitue le plus souvent le point d'intérêt majeur, d'où la mise au point récente de plusieurs tests rapides spécifiques de ces substances, dont le SNAP™ test d>IDEX.

Ce test basé sur une réaction immunochimique permet de distinguer visuellement les échantillons positifs et négatifs par comparaison à la coloration de témoins. CECALAIT vient d'en évaluer la justesse et la sensibilité par comparaison avec la méthode officielle française. Les résultats obtenus montrent une bonne concordance des deux méthodes. De même, leur sensibilité est globalement voisine, avec de légères différences selon l'antibiotique testé.

**L**es conséquences néfastes liées à la présence d'antibiotiques dans le lait sont bien connues aussi bien en santé publique qu'en technologie laitière. En industrie laitière, les ferments lactiques utilisés dans la fabrication des yaourts ou en technologie fromagère sont très sensibles à l'effet inhibiteur des antibiotiques, avec comme conséquences possibles des retards d'acidification, des défauts d'égouttage ou la prolifération d'une flore annexes comme les coliformes. Pouvant être toxiques ou engendrer des réactions d'hypersensibilité pour les consommateurs, les antibiotiques peuvent également induire une sélection de souches résistantes aux antibiotiques chez des agents pathogènes. C'est pourquoi la législation communautaire a fixé des concentrations maximales, appelées Limite Maximale de Résidu (LMR) pour la plupart des antibiotiques susceptibles d'être présents dans le lait.

Bien que les producteurs soient contrôlés plusieurs fois par mois par les laboratoires interprofessionnels, des contaminations accidentelles en antibiotiques peuvent subsister. De ce fait, des auto-contrôles sont de plus en plus souvent pratiqués directement chez le producteur ou à réception du lait en usine. Mais les tests conventionnels utilisés dans les laboratoires interprofessionnels et reposant sur le principe de l'inhibition microbienne, ont un délai de réponse long, au minimum 3 heures, inadapté aux cadences industrielles. Des tests rapides et faciles à mettre en oeuvre -souvent de type immunoenzymatique ou immunoradiologique- ont donc été mis au point ces dernières années, notamment des tests spécifiques des  $\beta$ -lactamines.

Ces antibiotiques, de la famille des pénicillines, sont en effet présents dans plus de 90% des spécialités vétérinaires employées dans le traitement des mammites, seuls ou en association avec d'autres familles d'antibiotiques.

Parmi ces tests figure le test SNAP™, de la Société Américaine IDEXX, déjà connue en France dans le diagnostic vétérinaire. Applicable au lait cru, il fournit un résultat en 10 minutes et peut être réalisé sans difficulté.

Entre Janvier et Mars 1996, CECALAIT a mené une étude d'évaluation des performances du test SNAP™  $\beta$ -lactamines par comparaison avec la méthode officielle française (arrêté du 2/9/1983, publié au JO du 6/10/1983).

### PRINCIPE, PRESENTATION ET MISE EN OEUVRE DU TEST

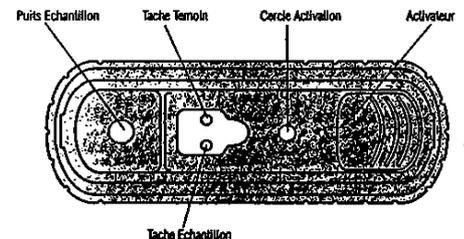
#### ♦ PRINCIPE ET PRESENTATION

Il s'agit d'un test immunoenzymatique, où des récepteurs spécifiques peuvent se lier, soit aux  $\beta$ -lactamines de l'échantillon testé, s'il en contient, soit aux  $\beta$ -lactamines fixées à la surface du test.

Chaque kit individuel prêt à l'emploi comprend une pipette pour le prélèvement du lait, un tube à essai contenant une pastille de réactif (récepteur), et un dispositif SNAP™ « encliquetable ».

Un bloc chauffant pouvant contenir de 2 à 6 dispositifs est nécessaire pour maintenir la température à 45 +/- 5°C pendant toute l'analyse; une version portable existe également.

#### ♦ MISE EN OEUVRE



Le test se déroule en trois étapes. Au départ, l'échantillon est mis en présence du récepteur pendant 5 minutes à 45°C. Si des  $\beta$ -lactamines sont présentes, elles s'y lient alors spécifiquement.

Le lait est ensuite versé dans le puits échantillon du dispositif SNAP™ et migre sur un support jusqu'au cercle d'activation bleu qui se décolore. Pendant cette migration, les récepteurs encore libres se lient aux  $\beta$ -lactamines fixées sur le support au niveau de la tache échantillon.

Enfin, lorsque le cercle activation commence à disparaître, le manipulateur appuie sur l'activateur, libérant le substrat qui migre jusqu'à la tache témoin et à la tache échantillon. Le substrat incolore est transformé par les enzymes fixées au niveau de ces taches en un produit coloré en bleu. La lecture définitive est réalisée après 4 minutes, soit visuellement, soit à l'aide d'un lecteur automatique.

♦ **INTERPRETATION DES RESULTATS:**

Pour un échantillon positif, les  $\beta$ -lactamines contenues dans l'échantillon vont se lier aux récepteurs, qui alors ne se fixent pas ou peu au niveau de la tache échantillon. La réaction colorimétrique est alors **plus faible ou de même intensité** que celle de la tache témoin qui correspond à une concentration en pénicilline de 4 ppb.

Pour un échantillon négatif, les récepteurs restés libres vont se fixer au niveau de la tache échantillon, dont la coloration deviendra alors **plus sombre** que celle de la tache témoin.

**LES ESSAIS**

Chaque échantillon a été soumis au test SNAP™, avec lecture visuelle, et à la méthode de référence.

Rappelons que celle-ci est basée sur la détection d'une acidification du milieu lors de la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Il n'y a pas d'acidification quand la croissance bactérienne est perturbée en présence d'antibiotiques. Dans ce cas (résultat positif) ou dans les cas douteux, la méthode prévoit

une seconde étape de confirmation sur gélose, avec trois espèces bactériennes différentes.

Une seule de ces trois espèces est sensible aux pénicillines. Il s'agit de *Bacillus stearothermophilus*, qui a donc été la seule espèce utilisée pour confirmation dans cette étude.

♦ **ECHANTILLONS:**

\* Echantillons naturels: au total 159 échantillons de lait cru de producteur sélectionnés par la méthode officielle dans les laboratoires interprofessionnels, dont 109 échantillons positifs conservés sous forme congelée et 50 échantillons négatifs (non congelés).

\* Echantillons artificiels: Des dilutions successives d'antibiotiques ont été réalisées dans du lait garanti sans antibiotique ou inhibiteur, et stérilisé par ionisation. Afin d'apprécier la sensibilité du test, 5 à 6 concentrations de pénicilline G, d'ampicilline et de cloxacilline ont été testées. Pour plus de précision les analyses ont été répétées 5 fois par concentration.

**RESULTATS**

tableau I

	Echantillons négatifs n = 50		Echantillons positifs n = 109	
	REFERENCE		REFERENCE	
	-		-	+
SNAP -	50/50 100 %		5/109 5 %	
SNAP +	0/50 0%	10/109 9 %	94/109 86%	

tableau II

		Résultats tous négatifs/5	Résultats intermédiaires (nb de résultats positifs sur 5)	Résultats tous positifs/5
Pénicilline	SNAP test	< 2 ppb	2 ppb (4/5)	3 ppb
	Référence	< 2 ppb	2 ppb (1/5)	3 ppb
Ampicilline	SNAP test	4 ppb	6 ppb (3/5) 8 ppb (4/5)	10 ppb
	Référence	4 ppb		6 ppb
Cloxacilline	SNAP test	20 ppb		30 ppb
	Référence	≥ 70 ppb		> 70 ppb

♦ **JUSTESSE (TABLEAU I):**

Sur les 50 échantillons de lait cru négatifs, les deux méthodes ont donné des résultats négatifs.

Sur les 109 échantillons de lait congelés potentiellement positifs, le SNAP™ test a donné en majorité des résultats positifs (94 échantillons), mais aussi des faux positifs et faux négatifs:

\* Les faux positifs au nombre de 10 correspondent sans doute à une meilleure sensibilité du SNAP™ test par rapport à la méthode de référence, ou à une concentration faible en limite de détection des deux méthodes. Sur 2 échantillons, les résultats sont négatifs par acidification et positifs en confirmation.

\* Les faux négatifs sont au nombre de 5. Pour 3 d'entre eux nous avons obtenu des résultats positifs en utilisant un SNAP™-test différent, spécifique de la détection des tétracyclines. La souche utilisée en confirmation est, en effet, sensible à la fois aux  $\beta$ -lactamines et aux tétracyclines, alors que le SNAP™ test est spécifique des  $\beta$ -lactamines. Pour les

2 autres échantillons il s'agit sans doute d'une concentration faible en  $\beta$ -lactamines, en limite de détection des méthodes; ces échantillons n'ont pas pu être testés par le SNAP™ test tétracyclines.

♦ **SENSIBILITE (TABLEAU II)**

Globalement, le seuil de détection du SNAP™ test est de même ordre que la référence pour la pénicilline (2-3 ppb); et pour l'ampicilline (6-10 ppb) il est un peu supérieur à celui de la méthode officielle (6 ppb). Par contre, la limite de détection de 30 ppb en cloxacilline pour le SNAP™ test, est bien plus faible que pour la référence (> 70 ppb), du fait de la méthode d'acidification, alors que la limite obtenue en confirmation est 30 ppb.

**Des performances comparables à la méthode de référence**

En conclusion, sur 159 échantillons de lait cru, la concordance du SNAP™ test  $\beta$ -lactamines avec la méthode de référence est de 90,6%. Les discordances observées correspondent sans

doute à des différences de sensibilité des tests, ou à une plus grande spécificité du SNAP™ test.

Le SNAP™ test a une sensibilité comparable à la référence pour la pénicilline, plus élevée pour la cloxacilline et un peu plus faible pour l'ampicilline. Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec ceux trouvés dans la littérature.

Si on compare les limites de détections (LD) obtenues dans cette étude aux limites maximales de résidus (LMR) fixées dans le lait cru par la législation européenne, on constate que ces LMRs sont détectables par le SNAP™ test pour la pénicilline et la

cloxacilline mais pas pour l'ampicilline. Celle-ci n'est d'ailleurs pas davantage détectable par la méthode officielle française.

	LD	LMR
* Pénicilline:	2-3 ppb	4 ppb
* Ampicilline:	6-10 ppb	4 ppb
* Cloxacilline:	30 ppb	30 ppb

*[par P. ROLLIER (avec la collaboration technique de L. JEANNEROT)]*