

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

**Faculté des Sciences
et Techniques
(FST)**

**Ecole Inter - Etats
des Sciences et Médecine
Vétérinaires
(EISMV)**



Année 2004



N° 2

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES
ET MÉDECINE VÉTÉRINAIRES
Centre d'information et
de Documentation

**TRANSFERT, ADAPTATION ET VALIDATION DE METHODES
SIMPLES DE DETECTION DES RESIDUS
D'OXYTETRACYCLINE ET DE SULFAMIDES DANS LE LAIT**

**MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
DE PRODUCTIONS ANIMALES**

Présenté et soutenu publiquement le 6 Avril 2004 à 10 heures à l'EISMV de Dakar

Par

Komlan AKODA

Né en 1973 à BOCCO (TOGO)

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT : Mr. François Adébayo ABIOLA	Professeur à l'EISMV Maître et Rapporteur de mémoire
MEMBRES : Mr. Bhen Silina TOGUEBAYE	Professeur à l'UCAD
Mr. Malang SEYDI	Professeur à l'EISMV
Mr. Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur à l'EISMV

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

Faculté des Sciences
et Techniques
(FST)

Ecole Inter - Etats
des Sciences et Médecine
Vétérinaires
(EISMV)



Année 2004

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES
ET MÉDECINE VÉTÉRINAIRES
Centre d'Information et
de Documentation



N° 2

TRANSFERT, ADAPTATION ET VALIDATION DE METHODES SIMPLES DE DETECTION DES RESIDUS D'OXYTETRACYCLINE ET DE SULFAMIDES DANS LE LAIT

MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
DE PRODUCTIONS ANIMALES

Présenté et soutenu publiquement le 6 Avril 2004 à 10 heures à l'EISMV de Dakar

Par

Komlan AKODA

Né en 1973 à BOCCO (TOGO)

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT : Mr. François Adébayo ABIOLA	Professeur à l'EISMV Maître et Rapporteur de mémoire
MEMBRES : Mr. Bhen Sikina TOGUEBAYE	Professeur à l'UCAD
Mr. Malang SEYDI	Professeur à l'EISMV
Mr. Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur à l'EISMV

Sommaire

Introduction	1
1^{ère} Partie : La production laitière et les problèmes de résidus de médicaments vétérinaires	3
Chapitre I : La production laitière au Sénégal	4
1. Demande en lait et la production locale	4
2. Contraintes pathologiques.....	4
3. Utilisation des médicaments vétérinaires	5
Chapitre II : Problèmes liés aux résidus de médicaments vétérinaires.....	7
1. Définition de résidus de médicaments vétérinaires.....	7
2. Réglementation sur les résidus de médicaments vétérinaires.....	7
3. Problèmes liés aux résidus de médicaments vétérinaires	8
3.1. Toxicité des résidus chez le consommateur.....	9
3.2. Résidus de médicaments vétérinaires et technologie alimentaire.....	9
3.3. Résidus de médicaments vétérinaires et le commerce international.....	10
Chapitre III : Méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans le lait	11
1. Méthodes de type I.....	11
2. Méthodes de type II	11
3. Méthodes de type III	12
2^{ème} Partie : Transfert, adaptation et validation de méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides dans le lait	14
Chapitre I : Matériel et méthode.....	15
I. Matériel.....	15

I.1. Lieu d'étude	15
I.2. Matériel et réactifs	15
II. Méthode.....	16
II.1. Transfert, adaptation et validation des méthodes.....	16
II.1.1. Cas des résidus d'oxytétracycline.....	16
II.1.1.1. Réaction colorée.....	16
II.1.1.2. Chromatographie sur couche mince.....	17
II.1.2. Cas des résidus de sulfamides.....	18
II.2. Application à des échantillons de lait prélevés dans deux fermes de Dakar.....	19
Chapitre II : Résultats et discussion	20
I. Résultats	20
I.1. Résultats du transfert, adaptation et validation des méthodes	20
I.1.1. Réaction colorée pour la détection des résidus d'oxytétracycline	20
I.1.2. Chromatographie sur couche pour la détection des résidus d'oxytétracycline	21
I.1.3. Réaction colorée pour la détection des résidus de sulfamides	22
I.2. Résultats d'application aux échantillons de lait prélevés dans deux fermes laitières de la zone périurbaine de Dakar	22
II. Discussion et perspectives.....	23
II.1. Discussion.....	23
II.2. Perspectives.....	25
Conclusion générale.....	26
Références bibliographiques	27

Liste des tableaux et figures

Tableau I : Principales molécules des médicaments vétérinaires utilisées en élevage laitier périurbain de Dakar	6
Tableau II : Valeurs des LMR de quelques anti-infectieux dans le lait	8
Figure 1 : Réaction colorée pour la détection des résidus d'oxytétracycline dans le lait	20
Figure 2 : Chromatographie sur couche mince pour la détection des résidus d'oxytétracycline dans le lait.....	21
Figure 3 : Réaction colorée pour la détection des résidus de sulfamides dans le lait	22

Liste des abréviations

OMC	: Organisation Mondiale du Commerce	
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé	×
FAO	: Fond des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation	
LMR	: Limite Maximales de Résidus	
CCM	: Chromatographie sur Couche mince	
EISMV	: Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecines Vétérinaires	
CEE	: Communauté Economique Européenne	
AFSSA	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	
CNEVA	: Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires	
UPE	: Union des Professionnels d'Elevage	
STD	: Standard	
LACOMEV	: Laboratoire de Contrôle des Médicaments Vétérinaires	

DEDICACES

Grâce soit rendue à Dieu le Père Tout Puissant, pour être demeuré en tout temps et en tout lieu ma Puissante Forteresse, mon Bouclier, mon Rocher en qui je me confie.

Je dédie ce travail :

A mon Père défunt

Que la Terre te soit légère.

A ma très chère Mère et à ma Tante Mawoussi AYEWONE

Aujourd'hui vous représentez la principale raison qui justifie mon combat pour la réussite. Que Dieu vous accorde une longue vie et beaucoup de santé.

A mon Oncle Jérôme AFOUDJI

Tes conseils et ton soutien ne m'ont jamais fait défaut. Ce travail est également le tien.

A mes frères, sœurs, cousins, neveux et nièces

A Monsieur le Directeur de l'EISMV, le Professeur F. A. ABIOLA

En témoignage de tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi. Que Dieu vous le rende au centuple.

A Dr C. F. BIAOU, Dr A. TEKO-AGBO et Mr. El H. Mamadou NIANG

En témoignage de l'atmosphère de bon voisinage qui règne entre nous et du soutien que vous m'avez apporté lors de la réalisation de ce travail. Soyez rassurés de ma reconnaissance.

A mes compatriotes à l'EISMV et à Dakar

A mes ami (es) Charles DAYO, Jeanne Lucie DOSSIM (pensée particulière), Michel Garapaye KALIVOGUI, Atsoufé AKOTIA, Justin Kodjo KOFFI

A la 3^{ème} promotion du DEA de Productions Animales.

Au Togo (ma patrie) et au Sénégal (mon pays hôte).

REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements :

A Monsieur le Directeur de l'EISMV, Pr. François Adébayo ABIOLA

Grâce à vous nous avons pu bénéficier de cette formation. Sincères remerciements et profondes gratitude.

A tout le personnel du LACOMEV

Pour votre soutien et vos précieux conseils.

Aux Pr. AKAKPO Ayayi Justin et Pr. MISSOHOU Ayao

A tous les Enseignants du DEA Productions Animales

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail

×

×

A NOS MAÎTRES ET JUGES

A NOTRE MAÎTRE, JUGE, DIRECTEUR DE MEMOIRE ET PRESIDENT DU JURY

Monsieur François Adébayo ABIOLA, Professeur à l'EISMV de Dakar

Merci d'avoir initié et guidé avec rigueur ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect et notre admiration pour vos grandes qualités scientifiques et d'homme à objectifs. Hommage respectueux.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Monsieur Bhen Sikina TOGUEBAYE, Professeur à la FST de l'UCAD

Vous nous avez fait l'insigne honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Soyez rassuré de notre sincère reconnaissance et profond respect.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Monsieur Malang SEYDI, Professeur à l'EISMV de Dakar

Vous nous faites honneur en jugeant notre travail. Vos qualités humaines et scientifiques nous forcent admiration. Sincère reconnaissance.

×

×

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Monsieur Germain Jérôme SAWADOGO, Professeur à l'EISMV de Dakar

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant avec plaisir et spontanéité de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde admiration et nos sincères remerciements.

INTRODUCTION

La demande de plus en plus croissante des populations en protéines animales au Sénégal s'est traduite par le développement de stratégies sectorielles d'intensification des productions animales. Ainsi, il s'est développé depuis quelques années autour des grands centres urbains du pays en particulier la zone périurbaine de Dakar, des élevages laitiers exploitant les races exotiques importées [22]. Ces animaux peu adaptés aux conditions climatiques tropicales sont généralement soumis à des contraintes pathologiques les empêchant d'extérioriser toutes leurs potentialités.

Pour protéger les vaches laitières des maladies, l'utilisation des médicaments vétérinaires à titre curatif et parfois préventif est une règle [29]. L'utilisation abusive et mal contrôlée de ces produits par un personnel le plus souvent non qualifié, conduit à la présence de leurs résidus dans les denrées animales, le lait en particulier [36, 37]. Or les risques hygiéniques et sanitaires générés par ces résidus sont largement décrits [1, 34, 37, 38].

Au Sénégal, malgré le manque de moyens institutionnels et techniques de surveillance et de contrôle des résidus, des études ont été menées sur les produits aviaires de la zone des Niayes et sur les viandes commercialisées à Dakar. Ces études ont révélé des résidus d'inhibiteurs [9], de nitrofuranes, de chloramphénicol et des tétracyclines [21, 40].

La recherche de ces résidus nécessitant des investissements lourds onéreux [17], nous nous sommes proposé de contribuer à la mise au point des méthodes simples de détection applicables avec peu de moyens dans les pays africains au Sud du Sahara. L'objectif spécifique de ce travail est de transférer des méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides et de les adapter au lait.

Le résultat attendu est l'effectivité de méthodes de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides applicables avec peu de moyens et vulgarisables sur le terrain.

Ce travail comprend deux parties :

- ✓ la première partie est une synthèse bibliographique qui traite de la production laitière au Sénégal et des problèmes de résidus des médicaments vétérinaires.
- ✓ la deuxième partie présente le transfert, l'adaptation et la validation de méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides dans le lait au laboratoire de contrôle des médicaments vétérinaires de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar.

×

×

1^{ère} Partie

La production laitière au Sénégal et les problèmes de résidus de médicaments vétérinaires

Seront abordés successivement dans cette partie :

- ✓ la production laitière au Sénégal en mettant un accent particulier sur la demande et la production locales, les contraintes pathologiques et l'utilisation des médicaments vétérinaires ;
- ✓ les problèmes liés aux résidus de médicaments vétérinaires ;
- ✓ les méthodes de recherche des résidus de médicaments vétérinaires dans le lait.

Chapitre I : La production laitière au Sénégal

1. Demande en lait et la production locale

La population de l'Afrique au Sud du Sahara passera de 800 millions à 1,3 milliards d'habitants en 2025 et 19 millions de tonnes de viande, 43 millions de tonnes de lait seront nécessaires pour nourrir cette population [45]. La majorité de cette population se concentre dans les centres urbains et périurbains avec comme conséquence un accroissement de la demande en protéines animales dont le lait [35].

Au Sénégal, la demande estimée en lait est passée de 283 800 tonnes d'équivalent litre de lait (EqL) en 1983 à 396 500 tonnes EqL en 1993 soit un taux de croissance annuelle moyen de 3,4% sur une période de 10 ans [7]. Or, la production nationale de lait estimée à 118 millions de litres en 2002 [26], est de très loin insuffisante pour couvrir la demande intérieure [47]. Pour combler ce déficit, le Sénégal a recours aux importations, notamment le lait en poudre en provenance de l'Union Européenne, ce qui représente en devise environ 30 milliards de F CFA en 1995 [16]. Quarante (40) à 60 % des produits laitiers importés sont consommés par les populations urbaines [24]. Par ailleurs, depuis quelques années, des élevages laitiers exploitant les races exotiques importées se développent autour des grandes villes notamment à Dakar.

L'élevage de ces animaux peu adaptés aux conditions tropicales est soumis à des contraintes pathologiques.

2. Contraintes pathologiques

Au Sénégal, des efforts ont été faits dans la maîtrise des grandes épizooties comme la peste bovine et la péripneumonie contagieuse bovine grâce notamment à la mise en œuvre des campagnes annuelles de vaccination. Néanmoins, les maladies animales comme la fièvre aphteuse, la dermatose

nodulaire contagieuse bovine, la clavelée, la peste des petits ruminants, la pasteurellose bovine, le botulisme, les charbons bactérien et symptomatique, les parasitoses sanguines et gastro-intestinales sont encore fréquentes chez les ruminants [40, 44]. Dans les systèmes intensifs d'élevage exploitant les races hautes productrices laitières (Holstein, Jerseyaise, Monbéliarde), les problèmes sanitaires sont dominés par les pathologies de la reproduction, les mammites et les affections néonatales. En effet, en 1989 les mammites ont touché 23% des femelles en lactation [19] et 33% en 2001 [18].

L'utilisation des médicaments vétérinaires et les vaccinations constituent les principaux moyens de lutte contre ces pathologies.

3. Utilisation des médicaments vétérinaires

Les médicaments vétérinaires sont utilisés comme remède thérapeutique pour traiter les animaux atteints de maladies. Au Sénégal, l'importance de l'utilisation des médicaments vétérinaires est à l'image du marché de ces produits. En effet, les anti-infectieux pour les ruminants représentent 25 % des parts de marché des médicaments vétérinaires de 1994 à 1999 contre 43,2% pour les antiparasitaires [6]. Les travaux de BA [6] et du Ministère de l'Elevage, Service de la Coopération Culturelle et de l'Institut Pasteur de Dakar [40] montrent que l'oxytétracycline, les Pénicillines, la Streptomycine et les Sulfamides sont les molécules d'anti-infectieux les plus utilisées chez les ruminants au Sénégal. Selon KIRKPATRICK [32] aussi, l'oxytétracycline est le médicament vétérinaire le plus employé chez de nombreux animaux notamment chez les vaches en lactation ou tarées.

Pour le cas spécifique des élevages laitiers périurbains de Dakar, aucune étude à notre connaissance ne fait l'état des lieux sur les molécules utilisées mais une enquête personnelle ponctuelle révèle l'utilisation de diverses formulations

même en cours de lactation et sans respect parfois des délais d'attentes (tableau I).

Tableau n° I : Principales molécules des médicaments vétérinaires utilisées en élevage laitier périurbain de Dakar

Catégories d'animaux	Molécules utilisées	Familles
Vaches en lactation* Génissés Vaches tarées Vaches en gestation	Ampicillines	Pénicillines
	Amoxicilline	
	Cloxacilline	
	Dicloxacilline	
	Procaïne pénicilline	
	Pénicilline G	
	Chlortétracycline	Tétracyclines
	Oxytétracycline	
	Tétracycline	
	Gentamicine	Aminoglycosides
	Streptomycine	
	Chloramphénicol	Phénicolés
	Tylosine	Macrolides
	Sulfadiméthoxine	Sulfamides
	Dexaméthasone	Anti-inflammatoire
Hydrochlorothiazide	Diurétique	
Génissés	Ivermectine	Avermectines
	Doramectine	
	Albendazole	Benzimidazolés

Sources : Enquête personnelle (2003)

* : Aucune distinction n'est faite entre les vaches en lactation et les autres sur le choix des médicaments

L'utilisation de ces médicaments vétérinaires n'est généralement soumise à aucun contrôle. Au Sénégal, des lacunes, des imprécisions ou ambivalences subsistent dans les textes législatifs et réglementaires sur les médicaments vétérinaires et leur utilisation [36]. Cette situation expose le consommateur à des risques qui sans être généralement aigus peuvent être graves et méritent que nous les précisions ici.

Chapitre II : Problèmes liés aux résidus de médicaments vétérinaires

1. Définition de résidus des médicaments vétérinaires

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, un résidu est une substance chimique quelconque qui persiste dans un milieu donné, après qu'elle même ou d'autres composés lui donnant naissance aient été introduits dans ledit milieu volontairement ou non et dont la présence est de ce fait, qualitativement ou quantitativement anormale.

2. Réglementation sur les résidus des médicaments vétérinaires

Au plan international, pour maîtriser les risques liés aux résidus et protéger les consommateurs, une commission mixte FAO/OMS, le Codex Alimentarius, a été créée en 1963 et est chargée d'élaborer des normes alimentaires, des directives et d'autres textes tels que les codes d'usage [11, 27]. Cette commission fixe les limites maximales de résidus (LMR) pour chaque produit (tableau II). Dans les pays du Nord, les normes du Codex Alimentarius ont été mises en application et même rendues plus strictes dans certains cas. La création de l'espace économique commun des pays européens a conduit à un processus d'harmonisation de la législation en matière de médicaments vétérinaires et de résidus avec la mise en place de l'Agence Européenne pour l'Evaluation des Médicaments et l'application du règlement CEE n°2377/90 du 26 juin 1990. Ce règlement fixe les LMR appliquées dans les pays de la Communauté européenne. Les mêmes types de règlements sont appliquées aux Etats-Unis et au Canada et tout produit importé dans ces espaces doit respecter ces normes.

Au niveau Africain, le Botswana est l'un des pionniers en matière de législation sur les résidus. L'Afrique du Sud, le Maroc et la Zambie ont entrepris une démarche de mise à niveau pour les exigences de la communauté Economique

Européenne. Pour le Maroc par exemple, son objectif est d'avoir des produits compétitifs sur le marché européen [31].

Au Sénégal, à notre connaissance, en dehors des initiatives prises par certains exportateurs dans le simple but de satisfaire à l'éligibilité de leurs produits sur le marché d'exportation, il n'y a pas de réglementation en matière de résidus de médicaments vétérinaires et des autres substances chimiques. Ce vide juridique expose le consommateur sénégalais à des risques éventuels que peuvent engendrer ces résidus.

Tableau N° II : Valeurs des LMR de quelques anti-infectieux dans le lait

Médicaments vétérinaires	LMR dans le lait (en µg/l)
Benzylpénicilline	4
Oxytétracycline	100
Sulfamides	100
Ampicilline	4
Pénicilline G	4
Oxacilline	30
Cloxacilline	30
Dicloxacilline	30
Dihydrostreptomycine	0,125
Streptomycine	0,125
Chloramphénicol	0

Sources : [13, 28, 30], Règlements CEE (1990) et CEE (2001) cités par AFSSA [2]

3. Problèmes liés aux résidus de médicaments vétérinaires

En dehors des cas d'allergie, les problèmes liés aux résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées ne sont jamais des problèmes de toxicité aiguë. Certains sont décrits pour le consommateur, pour la technologie alimentaire et le commerce international.

3.1. Toxicité des résidus chez le consommateur

Le risque médical le plus sérieux en matière de résidus de médicaments vétérinaires concerne les accidents d'allergie provoqués essentiellement par les pénicillines et les tétracyclines [34] mais aussi les sulfamides [33]. Les taux résiduels d'antibiotiques dans le lait sont suffisants pour déclencher une crise allergique, quelquefois de type choc anaphylactique gravissime chez les sujets préalablement sensibilisés. Outre ces phénomènes d'allergie, des cas mortels d'aplasie médullaire sont signalés avec le chloramphénicol [30, 39]. Par ailleurs, on signale des effets cancérigène, tératogène, mutagène ou embryotoxique induits par certains résidus de médicaments vétérinaires (surtout les nitrofuranes) chez le consommateur.

L'utilisation abusive et mal contrôlée des antibiotiques engendre aussi des phénomènes d'antibiorésistance chez les bactéries [1, 43]. En effet, les résidus d'antibiotiques présents dans le lait peuvent entraîner un déséquilibre de la microflore digestive par inhibition ou destruction de certaines souches [14, 15]. C'est surtout en technologie alimentaire que les problèmes microbiologiques les plus courants sont rencontrés. ×

3.2. Résidus de médicaments vétérinaires et la technologie alimentaire

Du point de vue technologie laitière, les résidus d'antibiotiques entraînent une inhibition totale ou partielle des phénomènes fermentaires d'origine bactérienne nécessaires à la fabrication des produits laitiers tels que le yaourt, les fromages et le lait caillé. Parmi les molécules impliquées dans cette inhibition des germes fermentaires, il y a les pénicillines, la streptomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines [1, 34, 37, 48]

L'un des aspects les plus importants et qui dominant actuellement l'actualité des résidus, c'est le commerce international.

3.3. Résidus de médicaments vétérinaires et le commerce international

Dans le nouveau contexte des règles de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC), les résidus de médicaments vétérinaires peuvent entraver les échanges des produits d'origine animale entre les pays [41]. En effet, les règles de l'OMC se basent sur les normes sanitaires et phytosanitaires des produits alimentaires. Pour faciliter les pratiques loyales en matière commerciale, la Commission du Codex Alimentarius au travers son comité sur les résidus de médicaments vétérinaires et son comité d'experts sur les additifs alimentaires, fixent les LMR qui doivent garantir la santé du consommateur [1].

A des fins de contrôle des teneurs de résidus, des méthodes analytiques ont été sélectionnées et recommandées par le Codex Alimentarius.

×

×

Chapitre III : Méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans le lait

La recherche des résidus se fait par la détection et le dosage de la substance à rechercher dans les tissus et produits animaux et d'origine animale [8]. Ce dosage nécessite une séparation préalable du médicament des autres constituants de la matrice et se fait donc en plusieurs étapes d'extraction, de purification et de concentration. Les méthodes utilisées sont de ce fait, délicates et nécessitent un appareillage adéquat et une validation précise.

Selon FAO/OMS [28], les méthodes de recherche des résidus sont classées en trois types.

1. Méthodes de type I

Ce sont des méthodes de confirmation ; elles déterminent la quantité de la substance ou des catégories de substances spécifiques à doser et elles identifient avec certitude la substance considérée. Ces méthodes font appel à un appareillage spécifique notamment la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse. Ces méthodes ont l'inconvénient de nécessiter une haute technicité du personnel et de coûter très cher [17].

2. Méthodes de type II

Les méthodes de type II déterminent habituellement la concentration de la substance à doser mais sans identifier avec une certitude absolue la structure de la substance; c'est le cas par exemple de la chromatographie phase liquide. Ces méthodes, bien que requérant un niveau élevé de technicité coûte un peu moins cher que les méthodes de type I.

Les méthodes de type I et II sont désignées sous l'appellation de méthodes physico-chimiques regroupant notamment la chromatographie liquide haute

performance, la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie de masse.

3. Méthodes de type III

Les méthodes de type III déterminent généralement la présence ou l'absence d'un composé ou d'une classe de composés. Elles utilisent des techniques ne comportant pas d'appareillage performant. Ces méthodes sont couramment désignées sous le nom de méthodes de dépistage ou méthodes semi-quantitatives. Parmi les méthodes de type III on peut citer :

- ✓ les méthodes microbiologiques dont la méthode des quatre boîtes, la méthode Galeslout et Hassing, le Delvotest, le STAR (Screening Test of Antibiotic Residues) test et la méthode officielle lait [3, 10, 29]. Leur principe est basé sur l'inhibition de la croissance bactérienne;
- ✓ Les méthodes immuno-enzymatiques tel que le test ELISA capable de déceler les sulfamides jusqu'à une concentration de 1 ng/ml [23].
- ✓ les méthodes chromatographiques sur couche mince (CCM) dont le principe est basé sur des phénomènes d'adsorption;
- ✓ les méthodes colorimétriques telle que la méthode BRATTON MARSHALL (1979) rapportée par AKA [4] et DIATTA [20] pour le dosage de la sulfadimidine dans le sang et le lait dont le principe est basé sur une diazocopulation en milieu acide en présence du N-(1-naphtyl) éthylène diaminodihydrochloride pour donner une coloration rose.

Il faut noter que la littérature disponible ne décrit pas de méthodes colorimétriques pour la recherche de résidus d'antibiotiques. Cependant, l'oxytétracycline peut être identifiée dans les produits finis en donnant une coloration jaune en présence de l'acide chlorhydrique [5, 25] ou en donnant un spot de fluorescence jaune à la lumière UV à 365 nm [42].

Conclusion partielle

L'utilisation des anti-infectieux dans les élevages laitiers périurbains est une pratique courante et inévitable. Cependant, une utilisation mal contrôlée peut engendrer des risques hygiéniques et sanitaires pour le consommateur par leur présence sous forme de résidus dans les denrées ; ces résidus constituent aussi des entraves au commerce international.

Plusieurs méthodes existent pour la détection et la quantification de ces résidus. Les méthodes de type I et II requièrent une haute technicité et nécessitent des appareils très onéreux, souvent hors de la portée des services vétérinaires nationaux en Afrique au Sud du Sahara (ASS).

Dans ce travail, nous nous proposons de faire un transfert de méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides et leur adaptation au lait. Ces méthodes pourraient être applicables avec peu de moyens et vulgarisables sur le terrain en ASS.

×

×

2^{ème} Partie

Transfert, adaptation et validation de méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides dans le lait

Cette deuxième partie présente successivement :

- ✓ la méthodologie ;
- ✓ les résultats obtenus ;
- ✓ la discussion et les perspectives.

Chapitre I : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1. Lieu d'étude

L'étude est réalisée au laboratoire de contrôle des médicaments vétérinaires (LACOMEV) du service de Pharmacie - Toxicologie de l'EISMV de Dakar.

I.2. Matériel et réactifs

I.2.1. Matériel

Le matériel utilisé est composé de la verrerie classique de laboratoire, d'une balance analytique de type PRECISA 205 A SCS, d'une centrifugeuse réfrigérée, d'une hotte aspirante, d'un agitateur de type vortex, des plaques à silicagel, d'une lampe UV, d'une cuve de développement pour plaques chromatographiques, d'un séchoir à cheveux et des tubes à essai.

I.2.2. Réactifs

Les réactifs sont de type analytique. Ils sont composés de l'acide chlorhydrique, du méthanol, de l'ammoniaque, de l'acide trichloroacétique 15%, du nitrite de sodium 0,1%, du sulfate d'ammonium 5%, du naphthyléthylène dihydrochloride 0,1% et de l'eau ultrapure.

I.2.3. Substances de référence

Les substances de référence utilisées sont l'oxytétracycline hydrochloride, la sulfadiméthoxine et la sulfaméthazine toutes de type SIGMA. Elles nous ont été fournies par l'unité des résidus de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) en France.

I.2.4. Substrat

Notre substrat est du lait acheté dans le commerce.

II. METHODES

Nous avons transféré et adapté au lait dans nos conditions des méthodes de détection des résidus d'oxytétracycline ou de sulfamides décrites pour d'autres matrices. Ces méthodes ont été ensuite validées.

Nous avons ainsi expérimenté deux méthodes colorées et une méthode de chromatographie sur couche mince (CCM).

II.1. Transfert, adaptation et validation des méthodes

II.1.1. Cas des résidus d'oxytétracycline

Deux méthodes ont été adaptées : une réaction colorée et une CCM. Pour les deux méthodes, des essais blancs et supplémentés ont été réalisés.

II.1.1.1. Réaction colorée (adaptée de FABIANI et PESEZ [25])

Pour le test de référence, nous avons ajouté 10 ml d'acide chlorhydrique (HCl) concentré à une solution de 2 mg/ml d'oxytétracycline hydrochloride dans du méthanol.

Pour les essais, nous avons d'abord prélevé 5 ml de lait exempt d'oxytétracycline auxquels nous avons ajouté 5 ml d'une solution d'oxytétracycline à 2 mg/ml. Après agitation au vortex, nous avons additionné 10 ml d'acide chlorhydrique. Ensuite une gamme de dilution a été réalisée jusqu'à 20 µg/ml de lait en vue de déterminer la concentration en dessous de laquelle la réaction n'est plus perceptible.

La méthode a été validée selon deux critères (la répétabilité et la reproductibilité). En effet, nous avons répétée la réaction six fois sur deux laits différents dans les mêmes conditions de travail puis à deux jours différents.

II.1.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) (adaptée de Pharmacopée internationale [42])

✓ Préparations des essais

- Les standards : à l'aide de la poudre de l'oxytétracycline hydrochloride (OTC) de référence, nous avons préparé une solution standard (STD) à 2 mg/ml dans du méthanol à partir de laquelle 10 autres STD de concentration respective de 500 µg, 400 µg, 350 µg, 300 µg, 250 µg, 200 µg, 150 µg, 100 µg, 75 µg et 50 µg par millilitre dans du méthanol ont été préparés.
- Les suppléments : à partir d'une solution de supplémentation à 2 mg/ml d'OTC de référence dans le méthanol, 11 prises d'essais de 5 ml de lait exempt d'OTC ont été supplémentées pour obtenir des concentrations respectives de 2 mg, 500 µg, 400 µg, 350 µg, 300 µg, 250 µg, 200 µg, 150 µg, 100 µg, 75 µg et 50 µg par millilitre de lait.
- Extraction : à 2 ml de chaque échantillon de lait supplémenté et à 2 ml d'un lait sans OTC, nous avons additionné 5 ml de méthanol. Après agitation au vortex, les solutions sont centrifugées à 4000 tours/mn pendant 30 minutes à 25 °C. Un surnageant clair a été récupéré pour être chromatographié.

✓ Chromatographie

Le solvant de migration est un mélange de méthanol et d'ammoniaque (100 ml/1,5 ml). Dix (10 µl) du surnageant de chaque essai accompagné de leur standard respectif et 10 µl du témoin sont déposés à 2 cm du bord inférieur de la plaque recouverte de gel de silice. Après séchage pendant 4 minutes à l'aide d'un séchoir de cheveux, la plaque est plongée dans le solvant de migration contenue dans une cuve de développement préalablement conditionnée avec le solvant de migration pendant 2 heures. La chromatographie est arrêtée lorsque le front de

migration du solvant atteint 15 cm. Après séchage, la plaque est observée à la lumière UV à 365 nm.

✓ Validation

Nous avons répété les opérations six fois dans les mêmes conditions de travail puis à deux jours différents.

II.1.2. Cas des résidus de sulfamides (adaptée de BRATTON MARSHALL (1979) cité par AKA [4])

Six (6) échantillons de 2 ml de lait exempt de sulfamides sont supplémentés avec une solution standard de sulfamides (sulfadiméthoxine et sulfaméthazine) à 250 µg/ml pour obtenir des concentrations respectives de 250 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 20 µg et 10 µg par millilitre de lait. A 2 ml de chaque lait supplémentés et à 2 ml d'un lait sans sulfamides, nous avons additionné 6 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide trichloroacétique à 15 %. Les solutions ainsi préparées sont centrifugées à 4000 tours par minute pendant 30 minutes à 25 °C. A 2,5 ml d'une solution standard à 250 µg/ml et à 2,5 ml de chaque surnageant obtenu après centrifugation, nous avons ajouté 0,5 ml de nitrite de sodium à 0,1% (attendre 3 minutes), 0,5 ml de sulfate d'ammonium à 0,5% (attendre 2 minutes) et 0,5 ml de naphtyléthylène dihydrochloride à 0,1%.

La méthode a été répétée six fois sur deux échantillons de lait différents dans les mêmes conditions de travail et à deux jours différents.

II.2. Application à des échantillons de lait prélevés dans 2 élevages de Dakar

Vingt neuf (29) échantillons de lait de 250 ml chacun ont été prélevés dans 2 fermes laitières dans la zone périurbaine de Dakar. Les prélèvements ont été réalisés directement dans le bac de mélange des laits juste après les traites du soir. La fréquence de prélèvement est de 2 fois par semaine pendant 2 mois. Les échantillons sont conservés sous froid dans une glacière jusqu'au laboratoire où ils ont été conservés à - 20 °C jusqu'à l'analyse. Les 3 méthodes validées ont été appliquées aux 29 échantillons.

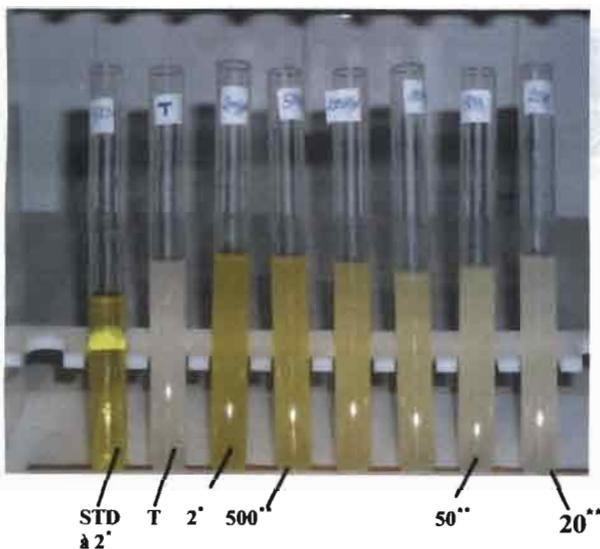
Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats

I.1. Résultat du transfert, adaptation et validation des méthodes

I.1.1. Réaction colorée pour la détection des résidus d'oxytétracycline

Après addition de 10 ml d'acide chlorhydrique concentré au lait supplémenté et au standard, on obtient instantanément une coloration jaune alors que le lait témoin reste incolore. Cette coloration jaune reste visible jusqu'à une concentration de 20 μg d'oxytétracycline par millilitre de lait (figure 1). En dessous de cette concentration, la coloration jaune n'est plus observée. La limite de détection de la méthode est alors de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit 20 mg/litre.



A



B***

* : unité en mg/ml de lait

** : unité en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lait

*** : mêmes concentrations qu'en A

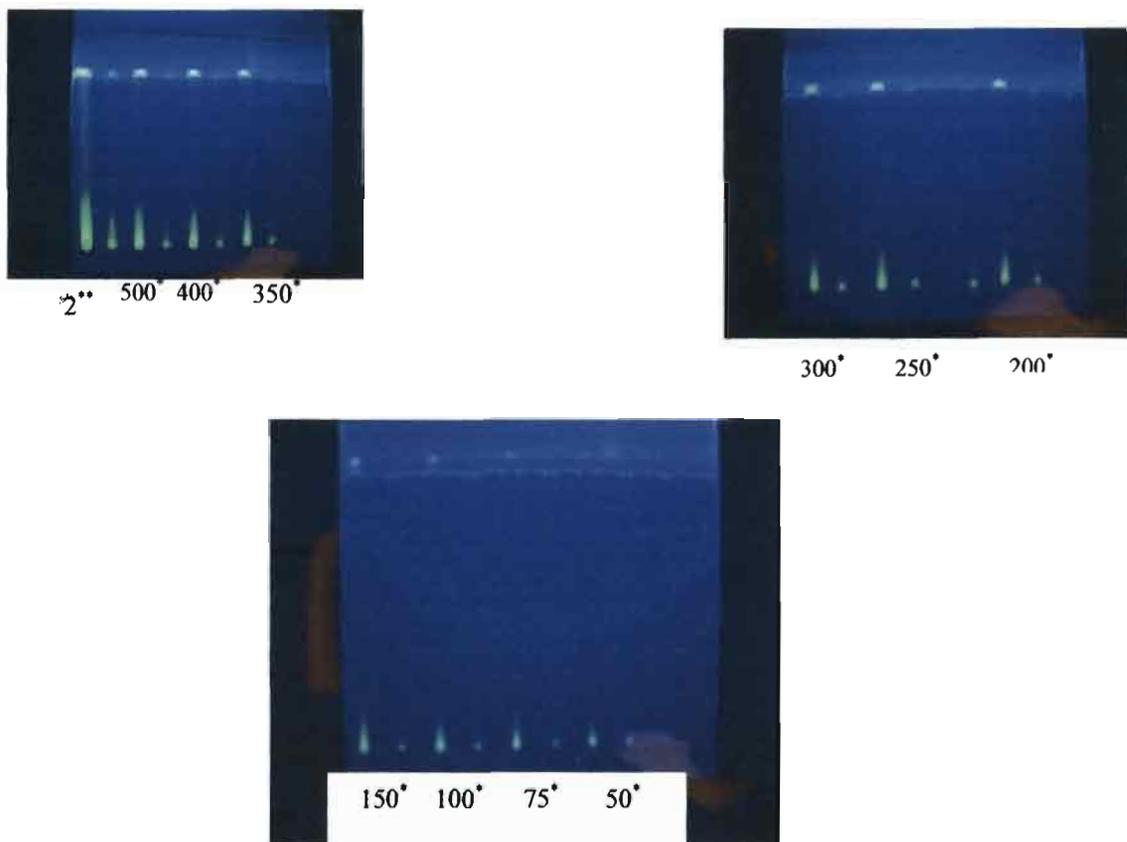
Figure 1 : Réaction colorée pour la détection des résidus d'oxytétracycline dans le lait

A : lait 1

B : lait 2

I.1.2. Chromatographie sur couche mince pour la détection des résidus d'oxytétracycline

A la lecture sous la lumière UV à 365 nm, tous les standards ont migré et donné des spots de fluorescence jaune bien visibles alors que la migration et les spots de fluorescence jaune des laits supplémentés ne sont visibles au même niveau que les standards qu'avec ceux ayant une concentration supérieure ou égale à 350 µg/ml. Cependant, à la ligne de dépôt des surnageants, on observe une fluorescence jaune comparable à celle des standards et un début de migration avec tous les laits supplémentés (figure 2). Le seuil de détection de la méthode est de 50 µg/ml (50 mg/litre).



* : unité en µg/ml de lait

** : unité en mg/ml de lait

Figure 2 : Chromatographie sur couche mince pour la détection des résidus d'oxytétracycline dans le lait

1.1.3. Réaction colorée pour la détection des résidus de sulfamides

Après addition du naphthyléthylène dihydrochloride à 0,1%, il se produit instantanément une coloration rose alors que le lait témoin reste incolore. Cette coloration est intense avec le standard et les laits à fortes concentrations en sulfamides puis diminue d'intensité jusqu'à devenir très faible avec le lait à 10 µg/ml. En dessous de 10 µg/ml, la coloration jaune n'est plus visible (figure 3). La limite de détection est donc de 10 µg/ml (10 mg/litre).



A



B**

* : unité en µg/ml de lait

** : mêmes concentrations que A

Figure 3 : Réaction colorée pour la détection des sulfamides dans le lait
A : lait 1 B : lait 2

1.2. Résultat d'application aux échantillons de lait prélevés dans 2 fermes laitières de la zone périurbaine de Dakar

Deux (2) échantillons de lait sur 29 (soit 6,8%) ont été suspectés de contenir des résidus d'oxytétracycline par la méthode colorée de détection de cette molécule. L'application des 2 autres méthodes n'a révélé aucun lait suspect.

II. Discussion et perspectives

II.1. Discussion

Le travail a porté sur la mise au point de méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides. Le choix de l'oxytétracycline est guidé par le fait qu'elle constitue la principale molécule du groupe des antibiotiques utilisés chez les ruminants au Sénégal [40]. Selon KIRKPATRICK [32] aussi, l'oxytétracycline est le médicament vétérinaire le plus employé chez de nombreux animaux notamment chez les vaches en lactation ou tarées. Pour le cas des sulfamides, notre investigation sur le terrain a montré leur utilisation dans les fermes laitières.

Trois méthodes ont été transférées et adaptées dans cette étude. Il s'agit de :

- ✓ pour les résidus d'oxytétracycline, la réaction colorée décrite par FABIANI et PESEZ [25] pour la détection de cette molécule dans les produits finis puis la méthode chromatographique sur couche mince décrite par la Pharmacopée internationale [42];
- ✓ pour les résidus de sulfamides, de la réaction colorée décrite par BRATTON MARSHALL (1979) rapportée par AKA [4] et DIATTA [20] pour la détection et le dosage de sulfamides dans les matrices biologiques.

Le transfert et l'adaptation au lait de ces méthodes produits finis se justifient par le fait que les tétracyclines sont éliminées dans le lait en nature presque sous forme inchangées [46]; raison pour laquelle nous avons utilisé des substances de référence pures pour réaliser les suppléments.

La coloration jaune que nous avons obtenue avec l'oxytétracycline est similaire à celle de FABIANI et PESEZ [25]. Ces résultats corroborent les travaux de AMADOU NIANDOU [5] qui utilisait la même réaction pour identifier

l'oxytétracycline dans les médicaments. En outre, la fluorescence jaune des spots observée à la lumière UV à 365 nm dans la méthode chromatographique sur couche mince est similaire à celle décrite dans la Pharmacopée internationale [42]. Pour le cas des résidus de sulfamides, la coloration rose que nous avons obtenue est identique à celle trouvée par AKA [4] qui dosait la sulfadimidine dans le sang et le lait.

L'adaptation de ces méthodes initialement destinées aux produits pharmaceutiques finis à des résidus dans le lait, montre qu'elles sont applicables. Nous avons d'ailleurs appliqué ces méthodes à des échantillons de lait prélevés dans la région de Dakar. Elles nous donnent 6,8% d'échantillons suspects de contenir des résidus d'oxytétracycline dans le lait (méthode colorée). Pour les autres méthodes aucun lait n'a été suspecté. En fait, le faible taux d'échantillons suspects serait lié à une faible sensibilité des méthodes. En effet, les limites de détection que nous avons obtenues pour la détection de l'oxytétracycline sont de 20 µg/ml (20 mg/litre) dans le cas de la méthode colorée et 50 µg/ml (50 mg/litre) dans le cas de la chromatographique sur couche mince. Ces valeurs trouvées sont supérieures à celles rapportées par BONFOH et al. [12] avec les méthodes microbiologiques, le "Yoghurt test", capable de déceler des résidus d'oxytétracycline jusqu'à 0,5 µg/ml (0,5 mg/litre) et le Delvotest qui peut identifier cette molécule jusqu'à une concentration de 1 mg/litre). La limite obtenue pour la méthode de détection des sulfamides est de 10 µg/ml (10 mg/litre). Cette limite est largement supérieure à celle de la méthode ELISA rapportée par DIXON et al. [23] capable de déceler les sulfamides jusqu'à une concentration de 1ng/ml. Le Yoghurt test, le Delvotest et la méthode ELISA sont d'ailleurs microbiologiques (pour les deux premiers) et immuno-enzymatique pour le dernier. Elles sont donc plus sensibles et sont reconnues comme méthodes officielles de détection des résidus de médicaments vétérinaires. Même si les seuils de détection de ces méthodes microbiologiques

sont plus bas que les nôtres, elles ne permettent pas aussi comme les nôtres une détection de l'ordre des LMR de l'oxytétracycline (100 µg/litre) et encore moins une quantification même approximative.

Le seuil de détection élevé de nos méthodes serait lié aux effets de dilution des réactifs. On pourrait y remédier en procédant à une concentration par évaporation partielle après extraction. Ces méthodes appartiennent à la catégorie des méthodes d'orientation ou de dépistage des résidus qui sont généralement décrites comme méthodes qualitatives ou semi-quantitatives [28]. C'est d'ailleurs l'objectif de notre étude.

Avec les seuils de détection relativement élevés de ces méthodes, elles ne peuvent permettre que la détection des fortes concentrations de résidus. Les faibles concentrations ne pouvant être révélées, elles ont un faible pouvoir prédictif mais les seuils de détection peuvent encore être améliorés.

II.2. Perspectives

La principale faiblesse de ces méthodes est leur faible sensibilité. Les travaux ultérieurs de procédés de concentration des extraits seraient nécessaires pour abaisser davantage les limites de détection. Ces études rendraient plus performantes nos méthodes en vue de leur vulgarisation.

CONCLUSION GENERALE

L'utilisation des médicaments vétérinaires en production laitière est indispensable pour prévenir et maîtriser les maladies. Cependant, ils doivent être utilisés à bon escient. La pratique abusive et mal contrôlée peut générer les résidus dont les conséquences pour les consommateurs peuvent être graves. La recherche de ces résidus nécessite des moyens onéreux.

Au cours de ce travail nous avons transféré et adapté trois méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides dans le lait. Leurs limites sont de 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivement pour la méthode colorée et la méthode chromatographique sur couche mince de détection de l'oxytétracycline puis la méthode colorée de détection des sulfamides. La sensibilité de ces méthodes est encore faible et elles nécessitent des travaux complémentaires en vue de leur amélioration. Nous avons utilisé ces méthodes pour rechercher des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides dans 29 échantillons de lait prélevés dans 2 élevages de la zone périurbaine de Dakar. Elles nous montrent 6,8% d'échantillons suspects de contenir les résidus d'oxytétracycline. Améliorées, ces méthodes seraient d'un apport important pour les décideurs politiques dans pays africains au Sud du Sahara dans le contrôle des résidus dans les denrées animales ou d'origine animale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABIOLA F. A. , BIAOU C. et FAURE P.** (1999). Bon usage du médicament vétérinaire et résidus médicamenteux dans les aliments. (125 - 128) In: Quatrième séminaire sur les médicaments vétérinaires en Afrique. Dakar, EISMV, 6 - 10 décembre 1999.- Paris : OIE.- 153p
2. **AFSSA** (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2003). Méthode de dosage multi-résidus de 7 pénicillines dans le lait entier par chromatographie liquide haute performance avec détecteur UV multi-longueur d'onde.- Paris -Fougères: AFSSA.- 26p
3. **AFSSA** (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2002). Protocole STAR (Screening test for Antibiotic Residues). Paris-Fougères: AFSSA.-15p
4. **AKA K.** (1988). La sulfadimidine : approche pharmacocinétique chez les ruminants du Sahel. Thèse: Méd. Vét.: Dakar; 44
5. **AMADOU NIANDOU A.** (1993). Marché parallèle des médicaments au Niger: exemple de la communauté urbaine de Niamey. Thèse: Pharmacie: Dakar; 27
6. **BA M.** (2001). La commercialisation des intrants vétérinaires au Sénégal : la situation post-dévaluation et les perspectives. Thèse: Méd. Vét.: Dakar; 3
7. **BA DIAO M.** (1996). La production laitière au Sénégal: contraintes et perspectives. (63-73) In : Actualité scientifique; reproduction et production laitière. Dakar : AUPELF-UREF.-316p
8. **BENAZZOU H., N'KAICHI S., MAADOUDI M. et LARAJE R.** (1998). Programme de surveillance des résidus de médicaments vétérinaires et autres contaminants dans les denrées animales et d'origine animales. Rabat: Direction de l'Elevage.-52p
9. **BIAGUI C.** (2002) . Utilisation des médicaments vétérinaires dans la région de Dakar à travers la recherche de résidus de substances à action antimicrobienne (antibiotiques). Thèse : Méd. Vét. : Dakar; 8
10. **BILLON J.** (1981). Recherche, identification et dosage des résidus d'antibiotiques dans le lait. Rec. Méd. Vét., 157 (2) : 169 - 174
11. **BIZET J.** (2000). Sécurité alimentaire : le Codex Alimentarius. Rapport d'information 450 (1999-2000)- Délégation du SENAT pour l'Union Européenne.- 7p

12. **BONFOH B., DEM S., KEITA O., DELORENZI S., TRAORE H., SIMBE C. F., ALFAROUKH O. I., FARAH Z. NICOLET J. et ZINSSTAG J.** (2003). Assessment of antibiotic residues by microbial tests in fresh cow milk sold in Bamako (Mali). *Milchwissenschaft* 58 (5/8): 304-307
13. **CNEVA** (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires) (1999). Méthode de dépistage par chromatographie planaire de résidus de sulfamides dans le lait cru de bovins.- Paris-Fougère: CNEVA.- 5p
14. **CORPET D. E.** (1987). Antibiotic residues and drug resistance in human intestinal flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 587-593
15. **CORPET D. E. et BRUGERE H. B.** (1995). Résidus des antibiotiques dans les aliments d'origine animale : conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effet chez l'homme. *Rev. Méd. Vét.* 146 (2) : 72 - 82
16. **DAHER I.** (1995). Contribution à l'étude de la filière lait au Sénégal: contraintes liées à la pathologie (dermatose nodulaire) et au changement de la parité du franc CFA. Thèse: Méd. Vét.: Dakar; 27
17. **DELEPINE B., HURTAUD-PESSEL D. et SANDERS P.** (2002). Les méthodes récentes d'analyse physico-chimique des résidus d'antibiotiques dans le lait. *Bull des GTV*, 15 : 191-196
18. **DIA S. F.** (2001). Caractérisation socio-économique de la filière laitière dans le bassin arachidier au Sénégal. Rapport d'activité- projet PROCORDEL.- 14p
19. **DIAO M. B.** (1989). Tentatives d'amélioration de la production laitière au Sénégal: situation et problèmes. (174-186) *In*: Compte rendu du séminaire régional sur les systèmes de production de lait et de viande au Sahel. Dakar, 22 Mai 1989. Dakar: FAPIS .-407p
20. **DIATTA B.** (1993). Pharmacocinétique de la sulfadiméthoxine chez les caprins. Thèse : Méd. Vét. : Dakar; 17 : 83p
21. **DIOP M. M.** (2003). Etude des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits aviaires de la zone des Niayes (Sénégal). Thèse : Méd. Vét. : Dakar; 17 : 131p
22. **DIOP P. E. H.** (1998). Comment réussir une filière laitière en Afrique. (131-140) *In* : Actes du séminaire sur l'étude des contraintes au développement des productions animales en Afrique subsaharienne. Abidjan 1997, les cahiers de l'EISMV n°3
23. **DIXON H. et KATZ S. E.** (1988). Drug residue in animal tissue, competitive detect enzyme linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine. Residues in swire urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Chem.*, 6 (71) : 1137-1140

24. **EL KETROUCI A.** (1993). L'approvisionnement de la ville de Dakar en produits laitiers. Mémoire de DESS Productions Animales.- Paris : CIRAD-IEMVT.- 99p
25. **FABIANI P. et PESEZ M.** (1988). Fiches techniques d'identification et de dosage des médicaments. Paris, SNIP.- 1p
26. **FAO** (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2002). FAOSTAT Database Results. Ressource électronique: Accès Internet:<http://apps1.fao.org/servlet/XteServlet.jrun>.
27. **FAO** (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2001). Initiatives récentes en matière de sécurité sanitaire et de qualité des aliments prises sous l'égide de la FAO. Rome, 28 mai - 1^{er} juin 2001.- 5p
28. **FAO/OMS** (Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organisation Mondiale de la Santé) (1996). Résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. 3 (2); 89p
29. **GODKIN A. et RODENBURG J.** (2003). Utilisation des médicaments vétérinaires à la ferme. Fiche technique. Ontario: Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation : Division Agriculture et Affaires Rurales.- 9p
30. **GOGNY M., PUYT J. D. et PELLERIN J. L.** (1999). Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire. (161-192) In: Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des produits de Santé Animale: diagnostic, diététique, hygiène, petit matériel.- Maisons Alfort : Editions du Point Vétérinaire.- 1659p
31. **IMAD** (1998). Résidus de nitrofuranes dans la viande de poulet et les œufs. Thèse : Méd. Vét. : Rabat, IAV.- 98p
32. **KIRKPATRICK D.** (2003). Des médicaments vétérinaires: proposition pour l'oxytétracycline. Ottawa: Direction générale des produits de santé et des aliments.-3p
33. **KLEMM U.** (2000). Appréciation toxicologique des résidus de sulfamides dans le miel. Lettre d'information n°54 concernant les résidus de sulfamides dans le miel suisse. Berne: Office fédéral de la santé publique.-4p
34. **LABIE C.** (1981). Positions législatives destinées à éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait. Rec. Méd. Vét., 157 (2) : 161 - 167
35. **LY C.** (2001). Place de l'élevage dans l'économie des pays d'Afrique subsaharienne. (5-17) In : Actes du séminaire sur l'utilisation des trypanocides en Afrique subsaharienne. Dakar, EISMV, 6 -9 février 2001.- Dakar : EISMV.- 170p
36. **LY C., BA M. et COLY R.** (2002). L'approvisionnement en médicaments et vaccins vétérinaires au Sénégal. (1- 10) In : Deuxième Journée d'études de l'Ordre des Docteurs Vétérinaires du Sénégal, Kaolack, 9 Mars 2002.- 18p

37. **MAGHUIN-ROGISTER G., JONASI A. et HELBO V.** (2001). Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires. Rapport final SSTC 1998-2001. Université de Liège.-7p.
38. **MICHEL C.** (1986). Intérêt pratique, danger potentiel et règles d'emploi des thérapeutiques antibactériennes chez les poissons. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 5 (3), 635-637
39. **MILHAUD G.** (1985). Les résidus de chloramphénicol et leur toxicité. Ann. Rech. Vét. 16:133-148
40. **MINISTERE DE L'ELEVAGE, SERVICE DE LA COOPERATION CULTURELLE ET INSTITUT PASTEUR DE DAKAR** (2003). Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar. Dakar : Direction de l'élevage.-50p
41. **OMC** (Organisation Mondiale du Commerce) (1995). Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires du cycle d'Uruguay. Annexe 1 A: Accords multilatéraux sur le commerce des marchandises. Genève, OMC :133 - 148
42. **PHARMACOPEE INTERNATIONALE** (1990). 3^{ème} édition, Paris
43. **SANDERS P.** (1999). Traitement thérapeutique et antibiorésistance. Le Point Vétérinaire 30 (198) : 203-210
44. **SENEGAL : MINISTERE DE L'ELEVAGE. DIREL** (2000). Situation zoonositaire du Sénégal. Rapport annuel. Dakar : DIREL.- 5p
45. **SIDIBE S. A.** (2001). Impact économique des maladies animales sur l'élevage en Afrique subsaharienne. (18-28) In : Actes du séminaire sur l'utilisation des trypanocides en Afrique subsaharienne, Dakar, EISMV, 6 au 9 Février 2001.- 170p.
46. **SOTTO A. et JOURDAN J.** (1994). Les Tétracyclines. (199-204) In : Les médicaments anti-infectieux. Paris : Edition Flammarion Médecine-Sciences.- 506p
47. **UPE** (Union des professionnels d'élevage) (1999) . Etude sur le rôle de l'importance du sous secteur de l'élevage dans l'économie nationale: formulation d'une stratégie de développement. Dakar: SONED-Afrique/MEFP
48. **ZEIL J. M.** (1988). Contribution à l'étude de l'incidence des résidus du thiabendazole sur les technologies fromagères. Thèse : Méd. Vét. : Lyon

Titre : Transfert, adaptation et validation de méthodes simples de détection des résidus d'oxytétracycline et de sulfamides dans le lait

RESUME

Dans le but de doter les pays africains au Sud du Sahara des méthodes simples de détection des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées animales, trois méthodes (deux colorimétriques et une chromatographique sur couche mince) d'identification de l'oxytétracycline (OTC) et de sulfamides ont été transférées, adaptées et validées pour le lait. Ces méthodes initialement destinées aux produits pharmaceutiques finis ont été convenablement adaptées au lait. Leur application à des échantillons de lait prélevés dans deux fermes de la région de Dakar donne pour la méthode colorimétrique appliquée à la recherche d'OTC 6,8% d'échantillons suspects. La chromatographique sur couche mince (CCM) appliquée à l'OTC et la colorimétrie appliquée aux sulfamides n'ont rien révélé. Le faible taux d'échantillons suspects de contenir des résidus serait lié à une faible sensibilité des méthodes à ce stade. En effet, les limites de détection que nous avons obtenues pour l'OTC sont de 20 mg/litre dans le cas de la méthode colorée et 50 mg/litre dans le cas de la CCM. Celle de la méthode colorimétrique appliquée aux résidus de sulfamides est de 10 mg/litre. La sensibilité de ces méthodes est encore faible; elles nécessitent des améliorations. Améliorées, ces méthodes seraient d'un apport important pour les décideurs politiques des pays africains au Sud du Sahara dans le contrôle des résidus dans les denrées animales ou d'origine animale.

Mots clés : Adaptation, Méthodes, Résidus, Oxytétracycline, Sulfamides, Lait.

ABSTRACT

On the aim to equip the African subsaharian countries with simple methods of detection of the veterinary drugs residues in foodstuffs of animal origin, three methods (two colorimetric and one thin layer chromatography) of identification of oxytetracyclin and sulfonamides were transferred, adapted and validated for milk. These methods initially intended for pharmaceutical finished were suitably adapted to milk. Their application to milk samples taken in two farms of the area of Dakar gives for the colorimetric method applied to the research of oxytetracyclin 6,8% of suspect samples. The thin layer chromatography applied to the oxytetracyclin and the colorimetry applied to the sulfonamides didn't reveal anything. The weak rate of suspect samples to contain residues would be related to a low sensitivity of the methods at this stage. Indeed, the limits of detection which we obtained for the oxytetracyclin are 20 mg/litre in the case of the colorimetric method and 50 mg/litre in the case of the thin layer chromatography. That of the colorimetric method applied to the sulfonamides residues is 10 mg/litre. The sensitivity of these methods is still low; they require improvements. These methods improved, would be an important contribution for public authorities of the african subsaharian countries in the control of the residues in foodstuffs of animal origin.

Key words : Adaptation; Methods; Residues; Oxytetracyclin; Sulfonamides; Milk.

Adresse : Dr Komlan AKODA S/C EISMV BP 5077 Dakar (Sénégal) Tél: 221 656 50 43

Dr Komlan AKODA S/C Atsoufé AKOTIA BP 20 793 Lomé (Togo) Tél: 228 902 98 28
E-mail : gilbert_akoda@yahoo.fr