Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 88 (1997)

Heft: 5

Artikel: Abaque pour l'analyse d'antibiotiques et de sulfamides par la méthode modifiée du test à 4 plaques et détermination des limites de détection de la méthode = Abacus for the analysis of antibiotics and sulfonamides using the modified 4-plates test method ...

Autor: Vacher, Pierre-Yves / Jemmi, Thomas

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982335

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Trav. chim. aliment. hyg. 88, 540–553 (1997)
Présenté le 20 juin 1997. Accepté le 11 juillet 1997

Abaque pour l'analyse d'antibiotiques et de sulfamides par la méthode modifiée du test à 4 plaques et détermination des limites de détection de la méthode

Abacus for the Analysis of Antibiotics and Sulfonamides using the Modified 4-Plates Test Method and Determination of the Limits of Detection of the Method

Key words: 4-plates test, Chemotherapeutics, Residues, Discs model, Detection limit, Simulation

Pierre-Yves Vacher et *Thomas Jemmi*
Office vétérinaire fédéral, Berne-Liebefeld

Introduction

Le dépistage de substances inhibitrices (antibiotiques, sulfamides) dans les produits carnés est effectué au moyen de tests que l'on souhaite les plus sensibles possible au plus grand nombre de celles-ci.

Nombreuses sont les méthodes qui ont été testées ou utilisées pour analyser les résidus d'antibiotiques dans la viande (1–2). Actuellement, le test reconnu officiellement sur le plan européen est le test à 4 plaques basé sur la méthode de *Bogaerts* et *Wolf* (3). La présence de substances inhibitrices est mise en évidence par la formation de zones d'inhibition de croissance des microorganismes autour de l'échantillon testé sur une ou plusieurs géloses ensemencées avec *Bacillus subtilis (B. subtilis)* à divers pH pour trois d'entre elles et avec *Micrococcus luteus (M. luteus)* pour la quatrième. La largeur de la zone d'inhibition est fonction de la concentration de la substance inhibitrice. Elle est mesurée du bord de l'échantillon jusqu'au bord extérieur de la zone d'inhibition de croissance. Un résultat positif doit impérativement être confirmé par une dialyse qui apporte la preuve que l'origine de la substance inhibitrice n'est pas naturelle, c'est-à-dire due à l'animal. En effet, des substances telles que le lysosyme (4–6) sont sources de faux-positifs souvent dus à la congélation de l'échantillon.

De nombreux auteurs ont publié des résultats sur le test à 4 plaques et les tests d'inhibition microbienne (7–14). On n'y trouve pourtant que peu d'informations sur les limites de détection des substances inhibitrices (15), notamment sur les

rapports existant entre la concentration dans l'échantillon et la zone d'inhibition de croissance induite pour les quatre géloses prescrites. L'objectif du présent travail est donc de mettre à la disposition du praticien une abaque permettant de déterminer tant la famille à laquelle appartient la substance inhibitrice présente lors d'un résultat positif que sa concentration dans l'échantillon de tissu analysé.

Définitions et abréviations

Abaque: nom masculin (gr. abax, table à calcul, anglais abacus). Diagramme, graphique donnant par simple lecture la solution approchée d'un problème numérique.

SI: Substances inhibitrices, produits médicamenteux (antibiotiques, chimiothérapeutiques, sulfamides) à action antimicrobienne utilisés généralement pour le traitement d'animaux malades ou comme stimulateur de croissance.

BS: *B. subtilis.*

BS pH 6,0: gélose ensemencée avec *Bacillus subtilis* à pH 6,0 (4).

BS pH 7,2: gélose ensemencée avec *Bacillus subtilis* à pH 7,2 (4).

BS pH 8,0: gélose ensemencée avec *Bacillus subtilis* à pH 8,0 (4).

ML: *M. luteus.*

ML pH 8,0: gélose ensemencée avec *Micrococcus luteus* à pH 8,0 (4).

Matériel et méthode

Le mode opératoire utilisé est celui indiqué dans le Manuel suisse des denrées alimentaires (4) aux modifications suivantes près:

1. Lors de la préparation des plaques tests, les 4 géloses ont été liquéfiées dans un four à microondes et non dans un autoclave juste avant de les couler.
2. *M. luteus* a été cultivé et repiqué sur gélose Columbia contenant 5% de sang de mouton (BioMérieux, Art. 43041, F-69280 Marcy l'Etoile).
3. Cinq ml de bouillon cerveau-cœur (4) ont été fraîchement et fortement ensemencés avec une anse de *M. luteus* sans contrôle ultérieur de la transmission au moyen d'un spectrophotomètre. Après avoir bien homogénisé le bouillon ensemencé, on a ajouté 0,8 ml de ce dernier à 80 ml de gélose ML liquéfiée à 50 ± 2 °C et coulée dans les boîtes en polystyrol (4).
4. Les contrôles de sensibilité des plaques tests ont été effectués en déposant sur chacune des 4 plaques de gélose trois différents disques de contrôle d'antibiotiques (Penicillin G, Oxoid, Code P1,5, Basingstoke, Hampshire, Angleterre; Sulfonamides Compound discs, Oxoid Code S3/300 et Streptomycin sensi-discs Becton Dickinson, SD S 50, BBL 31570, Cockeysville, Maryland 21030, USA). Les 4 plaques ainsi préparées ont été incubées selon (4).

5. Les échantillons de tissu ont été remplacés par des disques en papier buvard (Schleicher & Schull, Art. 321 260, D-37586 Dassel, Allemagne) imbibés par des solutions de SI. Au total 66 substances inhibitrices ont été testées (tableau 1): 10 aminoglycosides, 5 amphénicols, 6 inhibiteurs de gyrase, 2 lincosamides, 4 macrolides, 2 nitrofuranes, 8 β-lactames, 3 polypeptides, 10 sulfamides, 3 tétracyclines et 13 diverses. Les SI sous forme de poudres ont été dissoutes dans les solvants appropriés (tableau 1): acétone (Merck, Art. 14, D-64271 Darmstadt, Allemagne), acétonitrile (Merck, Art. 3), acide chlorhydrique (HCl) (Merck Art. 316 à 0,01 mol/l), hydroxide de sodium (NaOH) (Merck, Art. 6482 à 0,01 mol/l), eau bidistillée, éthanol (Merck, Art. 1.00983), méthanol (Merck, Art. 1.06009). Pour chaque SI, une solution mère, préparée le jour même à 100 000 µg/l, a été diluée 1:5 successivement de façon à obtenir les concentrations suivantes: C1 = 100 000, C2 = 20 000, C3 = 4000, C4 = 800, C5 = 160, C6 = 32 µg/l. Les dilutions ont été réalisées avec de l'eau bidistillée. Chacune des solutions, à raison de 20 µl, a été pipetée sur des petits disques en papier buvard susmentionnés. Les disques ont alors été séchés à température ambiante. Un disque pour chacune des solutions utilisées à chacune des concentrations susmentionnées a été déposé sur les 4 géloses. Des blancs ont été préparés pour chacun des solvants.
6. Les géloses BS pH 6,0, BS pH 7,2 et BS pH 8,0 ont été incubées à 30 ± 1 °C et ML pH 8,0 à 37 ± 1 °C. La lecture a été faite après un laps de temps allant de 16 à 24 h.
7. Chaque essai a été réalisé en double. La moyenne des deux résultats a été rapportée sur les figures.

Les limites de détection mentionnées et exprimées en µg/l correspondent à des zones d'inhibition de croissance de 2 mm.

Résultats

Analyse qualitative et quantitative

Les résultats sont présentés par les abaques des figures 1–3. On y trouve en ordonnée la taille de la zone d'inhibition en mm et en abscisse les concentrations en µg/l des SI testées. On constate que les sulfamides ont des limites de détections élevées (la plus basse est à 1000 µg/l). Quant aux produits de dégradation des sulfamides (N_4-acétyl-sulfadimidine, N_4-acétyl-sulfaguanidine, N_4-acétyl-sulfathiazole), on ne les a même pas détectés à la concentration initiale de 100 000 µg/l, raison pour laquelle ces composés n'ont pas été pris en compte dans les figures.

Limite de détection

La limite de détection a été indiquée pour la plaque sur laquelle la substance inhibitrice testée a induit la zone d'inhibition la plus grande. Les limites de détection

Tableau 1. Liste des substances inhibitrices, du milieu de dilution utilisé, de leur producteur et de leur famille

Substances inhibitrices	Solution de dilution	Producteur	Familles*
Chlortétracycline-HCl	eau bidest.	Sigma C 4881	TC
Oxytétracycline-HCl	eau bidest.	Sigma O 5875	TC
Tétracycline-HCl	eau bidest.	Sigma T 3383	TC
Amoxicilline (crystalline)	HCl 0,01 mol/l	Sigma A 8523	P
Ampicilline-Na	eau bidest.	Merck 278.0005	P
Céfquinome (sulfate de)	eau bidest.	Naxcel, Ch. Bez. D001, steril mikronisiert	P
Céftiofur-Na	eau bidest.	Upjohn Co., U-64279E.	P
Céphalothine-Na	eau bidest.	Sigma C 4520	P
Cloxacilline-Na* 1H2O	eau bidest.	Sigma C 9393	P
Pénicilline G-Na	eau bidest.	Seromed, Biochrom KG Kat. Nr. A321-42	P
Ticarcilline-2Na	eau bidest.	Sigma T 5639	P
Amikacine (sulfate de sel d')	eau bidest.	Sigma A 2324	AG
Békanamycine (sulfate de)	eau bidest.	Sigma B 5264	AG
Dihydrostreptomycine (sulfate de)	eau bidest.	Sigma D 7253	AG
Gentamicine (sulfate de)	eau bidest.	Fluka 48760	AG
Kanamycine (disulfate de)	eau bidest.	Merck 5177	AG
Kanamycine (monosulfate de)	eau bidest.	Sigma K 4000	AG
Néomycine (sulfate de)	eau bidest.	Sigma N 1876	AG
Spectinomycine-2HCl	eau bidest.	Sigma S 9007	AG
Streptomycine (sulfate de)	eau bidest.	Merck 10117	AG
Tobramycine	eau bidest.	Fluka 89549	AG
Enrofloxacine	NaOH 0,01 mol/l	Rt. Nr. R-177-1, teneur 99,3%, examiné le 1. 4. 91	GH
Fluméquine	éthanol	Inovet, Arovet, ISTD zu Oxolinic acid (Inoxyl), Lot R1030	GH
Nalidixique (acide)	NaOH 0,01 mol/l	Sigma N 8878	GH

Substances inhibitrices	Solution de dilution	Producteur	Familles*
Norfloxacine	méthanol	Sigma N 9890	GH
Oxolinique (acide)	NaOH 0,01 mol/l	Sigma O-0877	GH
Piromidique (acide)	NaOH 0,01 mol/l	Sigma P 6542	GH
Furazolidone	acétonitrile	Sigma F 9505	NF
Nitrofurazone	acétonitrile	Serva 30610	NF
Avilamycine	acétone	Eli Lilly Indianapolis, Lot. No. RS0107	D
Avoparcine (sulfate d')	eau bidest.	Cyanamid (UK), Batch D192-167-L2	D
Carbadox	méthanol	Sigma C 6770	D
Flavomycine	eau bidest.	Hoechst Veterinär GmbH, 990 mg/mg, Op. 1/91	D
Lasalocide	méthanol	Sigma L 1021	D
Maduramycine (ammonium de)	eau bidest.	Cyanamid GmbH, Interferm, 936 mg/mg, AC 9745-1B (Cygro R)	D
Monensine-Na	méthanol	Eli Lilly Indianapolis, IN 46285, USA, Lot. No. RS0073	D
Narasine	méthanol	Eli Lilly Indianapolis (Elanco), IN 46285, USA, Lot. No. RS0153	D
Novobiocine-Na	eau bidest.	Sigma N 1628	D
Rifampicine	méthanol	Sigma R 3501	D
Salinomycine-Na	méthanol	Hoechst Veterinär GmbH, Batch No.: V 1301, 980 mg/mg	D
Tiamuline (hydrogenfumarate de)	eau bidest.	CH 0005 Analyse Nr. 892518 CPP-HUE 23. 2. 90 (Sandoz)	D
Virginiamycine	méthanol	SmithKline Beecham Animal Health, 1252/T/V1 (2220 mcg/mg)	D
Bacitracine (sel de zinc de)	HCl 0,01 mol/l	Sigma B5150, 68 000 units/g	Poly
Polymyxine B (sulfate de)	eau bidest.	Sigma P 1004	Poly
Pyriméthamine	éthanol	Sigma P 7771	Poly

Substances inhibitrices	Solution de dilution	Producteur	Familles*
Clindamycine-HCl	eau bidest.	Sigma C 5269	LS
Lincomycine-HCl	eau bidest.	Sigma L 6004	LS
Erythromycine	méthanol	Sigma E 6376	Mac
Oléandomycine (phosphate d')	eau bidest.	Sigma O 6125	Mac
Spiramycine (I, II, III)	méthanol	Sigma S 9132	Mac
Tylosine	méthanol	Eli Lilly Indianapolis (Elanco), IN 46285, USA, Lot. No. RS0139	Mac
Chloramphénicol	méthanol	Fluka AG, 23275, USP cryst.	AS
Florfénicol	méthanol	Schering Plough, Batch no. 92-DFC-NP-01	AS
Monochloramphénicol	méthanol	HC-B21, Ma 0203/8-89	AS
Thiamphénicol	méthanol	Inpharzam Ricerche S.A. (CH), Batchno. 20TFI	AS
Trichloramphénicol	méthanol	BVET/Ry, Smp.: 68–72 °C, 16. 3. 90	AS
N4-acétyl-sulfadimidine	méthanol	BVET/Ry, Ga, métabolite de sulfadimidine, mp 247–249°, 4. 7. 89	SA
N4-acétyl-sulfaguanidine	méthanol	BVET, métabolite de sulfaguanidine, mp 251–255	SA
N4-acétyl-sulfathiazole	méthanol	BVET, métabolite de sulfathiazole, mp 261–265°, 7. 7. 89/Ga	SA
Succinylsulfathiazole	NaOH 0,01 mol/l	Sigma S 8752	SA
Sulfachlorpyrazine-Na	eau bidest.	Ciba-Geigy, Ana. Nr. 0481535, Exp. 7. 95	SA
Sulfadimidine-Na	eau bidest.	BP, charge H:209499, 9. 2. 95 (A. Grogg)	SA
Sulfaguanidine	méthanol	Sigma S 8751	SA
Sulfaméthoxazole	méthanol	Sigma S 7507	SA
Sulfathiazole	eau bidest.	Serva 35690, Control: I6	SA
Triméthoprime	méthanol	Sigma T 7883	SA

*AG = aminoglycosides; AS = amphénicols; GH = inhibiteurs de gyrase; LS = lincosamides; Mac = macrolides; NF = nitrofurances; P = beta-lactames; Poly = polypeptides; SA = sulfamidés; TC = tétracyclines; D = divers

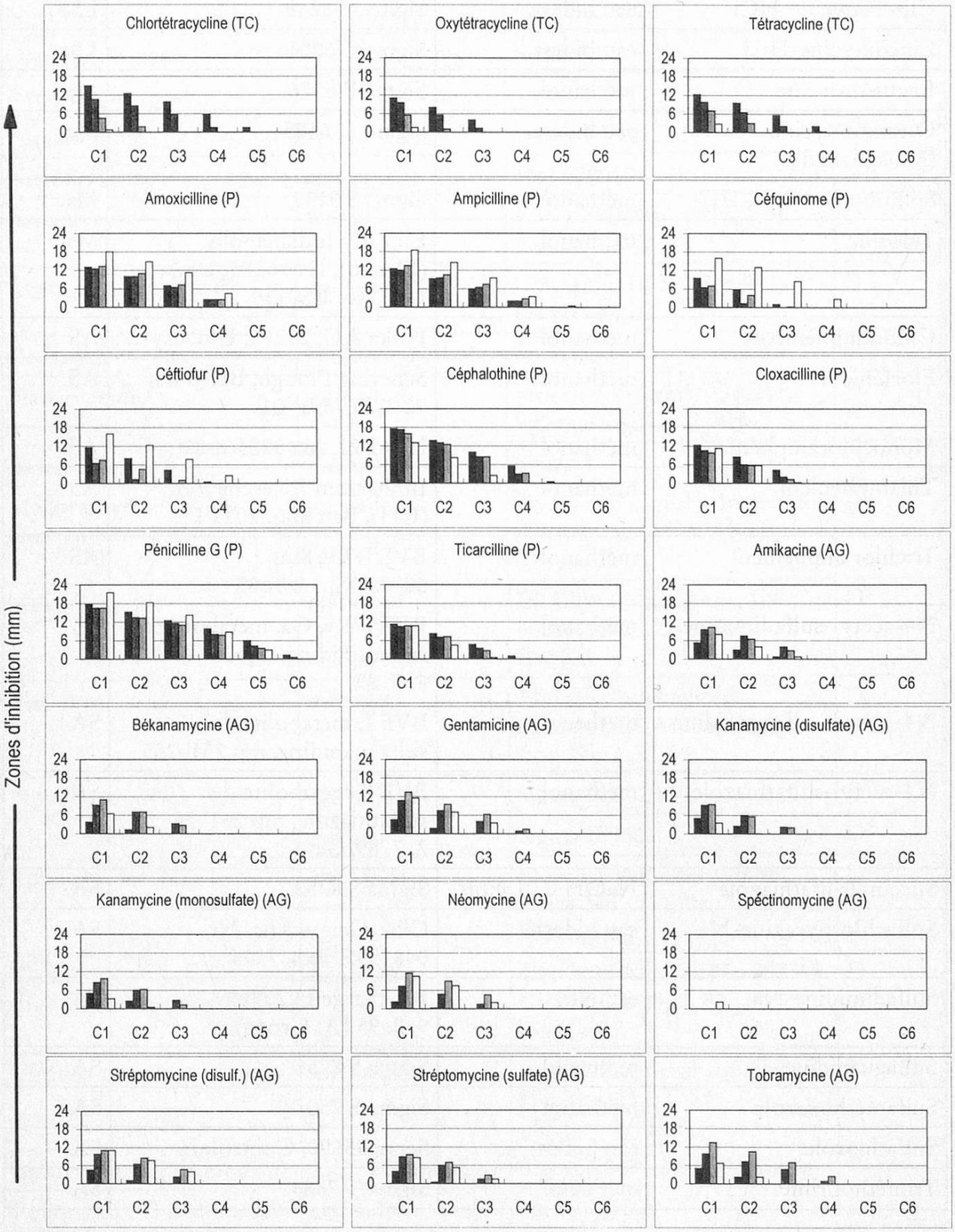
Zones d'inhibition (mm)
Chlortétracycline (TC)
Oxytétracycline (TC)
Tétracycline (TC)
Amoxicilline (P)
Ampicilline (P)
Céfquinome (P)
Céftiofur (P)
Céphalothine (P)
Cloxacilline (P)
Pénicilline G (P)
Ticarcilline (P)
Amikacine (AG)
Békanamycine (AG)
Gentamicine (AG)
Kanamycine (disulfate) (AG)
Kanamycine (monosulfate) (AG)
Néomycine (AG)
Spéctinomycine (AG)
Stréptomycine (disulf.) (AG)
Stréptomycine (sulfate) (AG)
Tobramycine (AG)
0
6
12
18
24
C1
C2
C3
C4
C5
C6

Fig. 1

Légende de la *Fig. 1.* Zones d'inhibition des substances inhibitrices aux six concentrations mesurées et sur les 4 plaques.
Concentration des substances inhibitrices: C1 = 100 000 µg/l; C2 = 20 000 µg/l; C3 = 4000 µg/l; C4 = 800 µg/l; C5 = 160 µg/l; C6 = 32 µg/l

■ > pH 6; *B. subtilis* ■ > pH 7.2; *B. subtilis* ■ > pH 8; *B. subtilis* □ > pH 8; *M. luteus*

TC = tétracyclines; P = β-lactames; AG = aminoglycosides; GH = inhibiteurs de gyrase; NF = nitrofuranes; D = divers; Poly = polypeptides; LS = lincosamides; Mac = macrolides; AS = amphénicols; SA = sulfamides

(zone d'inhibition de 2 mm) ont été estimées entre 30 µg/l (pénicilline) et 1570 µg/l (cloxacilline) pour les β-lactames, entre 450 µg/l (tobramycine) et 2700 µg/l (disulfate de kanamycine) pour les aminoglycosides, entre 70 µg/l (érythromycine) et plus de 20 000 µg/l (spectinomycine) pour les macrolides, entre 350 µg/l (enrofloxacine) et 7000 µg/l (acide nalidixique) pour les inhibiteurs de gyrase, au-dessus de 8000 µg/l (florfenicol) et plus pour les amphénicols, à 120 µg/l pour la chlortétracycline, à 600 µg/l pour la tétracycline et à 1500 µg/l pour l'oxytétracycline, à 320 µg/l pour la clindamycine et à 680 µg/l pour la lincomycine. Les antibiotiques indiqués sous «divers» ont été détectés à partir de 400 µg/l (hydrogénofumarate de tiamuline) jusqu'à plus de 100 000 µg/l pour d'autres tels que le carbadox et la pyriméthamine. Les limites de détection des polypeptides, sulfamides et nitrofuranes se situent toutes largement au-dessus de 5000 µg/l à l'exception du furazolidone (900 µg/l) et du succinylsulfathiazole (1800 µg/l).

La variance des blancs a été plus grande sur géloses ML que sur gélose BS. Cela pourrait s'expliquer par la technique de préparation de la suspension de *M. luteus* sans mesure de la transmission spectrophotométrique de la solution.

Discussion des résultats

L'utilisation de disques en papier imbibés d'une quantité connue de substance inhibitrice permet pratiquement d'identifier la famille à laquelle appartient la SI (analyse qualitative) puis d'en estimer la limite de détection grâce à des séries de dilution. On peut ensuite établir des abaques pour prédire la concentration en SI d'échantillons réels de musculature ou d'organe (analyse semi-quantitative). Il faut donc considérer cette étude comme une simulation. Les abaques sont présentées par famille d'antibiotiques pour mettre en évidence tant les similitudes entre les familles que les différences dans chacun des groupes. Le présent travail admet a priori la validité du postulat suivant: la teneur en SI de l'échantillon de viande ou de produit carné analysé dans la pratique est transférée et diffuse dans le milieu de culture de la même manière qu'avec le papier buvard. On admet donc pour le présent travail que l'échantillon réel (la viande et les produits carnés) n'exerce aucun

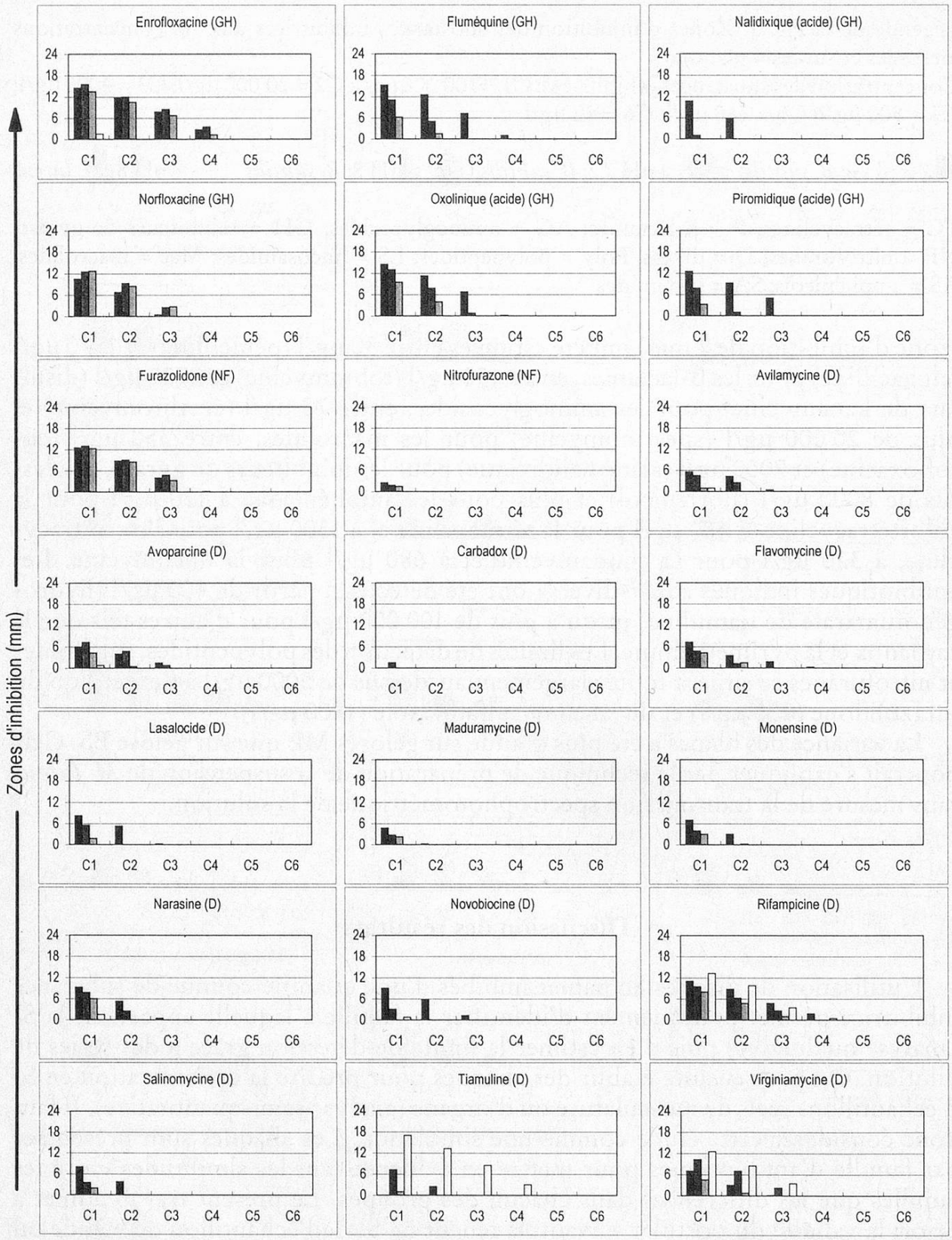

Fig. 2. cf. légende fig. 1

«effet de matrice» (dû par exemple au caractère lipophile de certains SI dans les tissus adipeux).

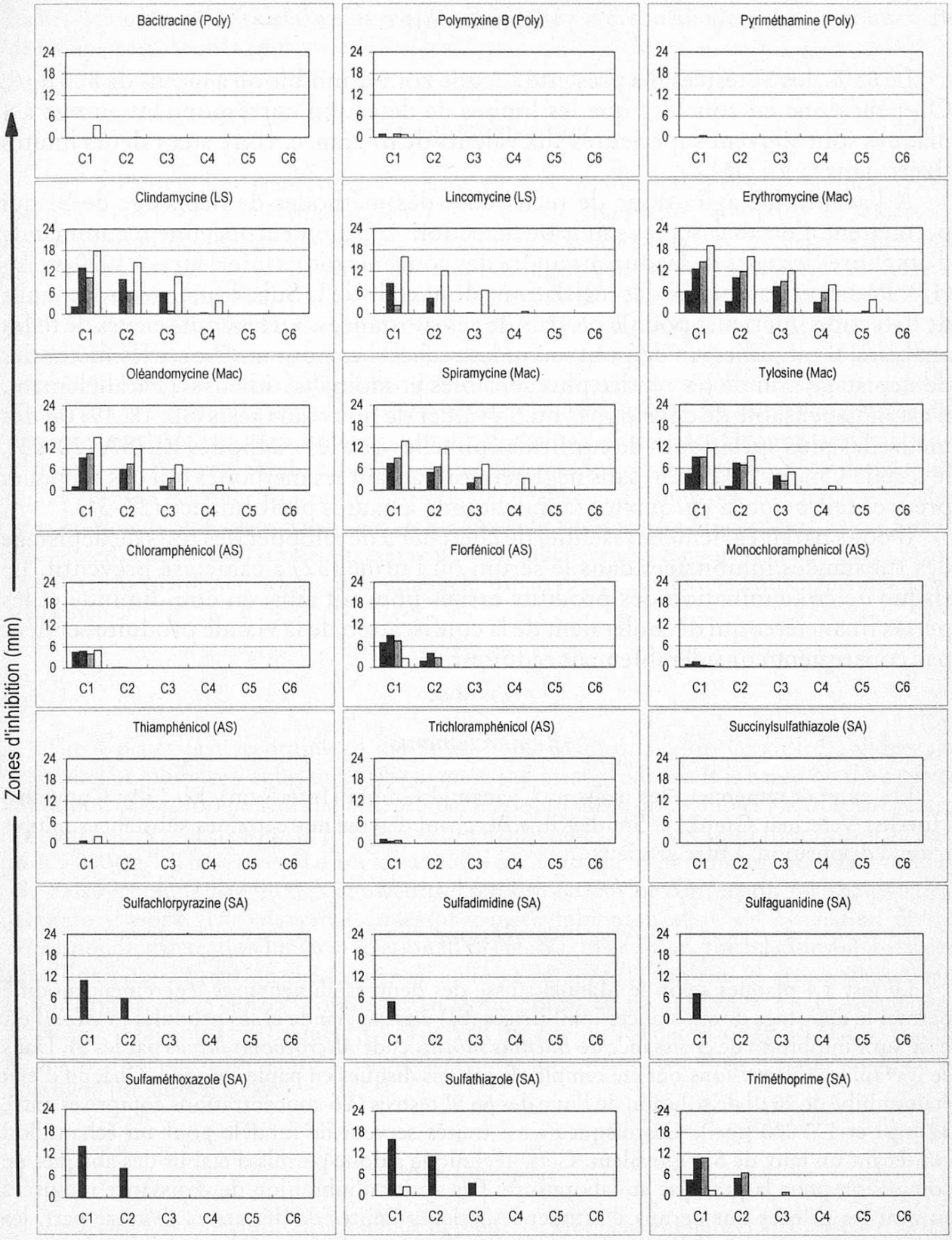

Fig. 3. cf. légende fig. 1

Conclusion

Le 65% des SI testées n'a présenté aucune zone d'inhibition à moins de 800 µg/l. On peut donc en conclure que les limites de détection correspondant au test à 4 plaques sont souvent supérieures aux valeurs de tolérance, voire aux valeurs limites fixées dans la loi (16).

A l'avenir, il s'agira donc de rechercher des méthodes de dépistage de SI qui permettent d'en abaisser les seuils de détection. L'Union européenne recommande d'améliorer les tests de façon à atteindre des concentrations inférieures à 1000 µg/kg (17). Pourtant, la plupart des législations dont celle de la Suisse imposent des seuils de détection inférieurs pour la plupart de ces substances. Vu les coûts élevés de telles analyses, il est judicieux de poursuivre les recherches pour améliorer les méthodes de dépistage afin de les rendre plus sensibles et moins fastidieuses. Parallèlement, il est indispensable de développer ou d'évaluer de nouveaux tests (10, 18, 19) ou des méthodes plus spécifiques de confirmation telles que les méthodes ELISA (20–23), le test de Charm II (24–26) sans négliger pour autant les méthodes qui ont fait leurs preuves telles que la chromatographie liquide à hautes performance (27–31).

Il nous paraît également essentiel de chercher à développer des tests de dépistage des substances inhibitrices dans le sérum ou l'urine (32) à caractère préventif. Le risque de contamination des produits carnés pourrait ainsi en être diminué et les pertes financières qui découleraient de la confiscation de la viande produite seraient par conséquent considérablement réduites.

Remerciements

Les auteurs remercient les maisons Cyanamid GmbH (Interferm), Eli Lilly Company, Hoechst Veterinär GmbH et Smith Kline Beecham d'avoir mis certaines substances inhibitrices à disposition, à titre gracieux.

Résumé

Le test à 4 plaques selon le Manuel suisse des denrées alimentaires légèrement modifié permet le dépistage de substances inhibitrices (SI) dans la viande et les produits carnés. Il est basé sur l'inhibition de croissance de *Bacillus subtilis* et de *Micrococcus luteus* par les SI. Dans ce travail, les échantillons ont été remplacés par des disques en papier buvard. Chacun d'eux était imbibé de 20 µl de solution de l'une des 66 SI testées (à 6 concentrations comprises entre 32 µg/l et 100 000 µg/l). Ces disques ainsi traités servent de modèle pour un échantillon contenant un taux de SI équivalent. Cette technique a donc permis d'établir des abaques de conversion pour la pratique au laboratoire. Les zones d'inhibition de croissance mesurées suivant les géloses ont permis d'estimer les valeurs limites de détection. D'autre part, les rapports entre ces zones d'inhibition sur les 4 géloses rendent possible une estimation de la famille (β-lactames, sulfamides, etc.) à laquelle fait partie la SI. Le 65% des SI testées n'a présenté aucune zone d'inhibition à 800 µg/l. Ce pourcentage dénote dans bien des cas des limites de détection supérieures aux valeurs limites légales. Ces résultats incitent donc à

rechercher un test de dépistage plus sensible complété par des méthodes plus spécifiques afin de combler les lacunes apparentes de ce test.

Zusammenfassung

Der 4-Platten-Test gemäss Schweizerischem Lebensmittelbuch (leicht modifiziert) erlaubt den Nachweis von Hemmstoffen (HS) in Fleisch und Fleischprodukten. Er basiert auf der Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* und *Micrococcus luteus*. In dieser Arbeit sind die Proben durch Papierblättchen, die mit Lösungen von 66 verschiedenen HS versetzt wurden, ersetzt. Jeweils 20 µl von 6 verschiedenen HS-Konzentrationen (32 µg/l bis 100 000 µg/l) wurden auf diese Papierblättchen pipettiert. Die so behandelten Blättchen sind ein Modell für eine Probe mit gleicher HS-Konzentration. Aufgrund graphischer Ableitungen können für die praktische Laborarbeit HS-Konzentrationen der Proben bestimmt werden. Zusätzlich erlauben die gemessenen Hemmzonen eine Schätzung der Nachweisgrenzen der verschiedenen Medien. Ausserdem geben die Verteilungsmuster der Hemmzonen auf den 4 Platten einen Hinweis auf die HS-Familie (β-Laktame, Sulfonamide usw.). 65% der geteste-ten HS weisen bei einer Konzentration von 800 µg/l keine Hemmzone auf. In vielen Fällen ist aber diese Nachweisgrenze höher als der gesetzlich festgelegte Höchstwert. Diese Resultate zeigen deutlich die Notwendigkeit von empfindlicheren Screening-Tests auf. Ergänzt mit spezifischen Methoden würde dies erlauben, die in dieser Arbeit ersichtlichen Lücken zu schliessen.

Summary

The 4-plates test according to the Swiss Food Manual (slightly modified), allows the screening of inhibitory substances (IS) in meat and meat products. It is based on the growth inhibition of *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. In this work, samples have been replaced by paper discs soaked with 20 µl solution of 66 different IS in 6 concentrations from 32 µg/l to 100 000 µg/l. These treated discs are a model for a sample containing an equivalent level of IS. This technique has though allowed to establish abacus of conversion for the practical laboratory work. The measured zones of growth inhibition allow an estimation of the corresponding detection limits in relation to the media. In addition, the relationship between these inhibition zones on the four media allows an approach to the IS-group (β-lactams, sulfonamides, etc.). The 65% of the tested IS did not show any inhibition zones at 800 µg/l. However, legal limits are frequently lower than the established detection limits. These results strengthen the need for more sensitive screening tests combined with specific methods to complete the shown lacks.

Bibliographie

1. *Petz, M.:* Tierarzneimittelrückstände in Fleisch – Möglichkeiten ihrer analytischen Erfassung. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **82**, 7–23 (1991).
2. *Ellerbroek, L., Schramm, G., Weise, E.* und *Reuter, G.:* Mikrobiologischer Hemmstoffnachweis in Fleisch. I. Zur Funktionsweise des deutschen Dreiplattentests, des EG-Vier-

plattentests, des Neuen Niederländischen Nierentests sowie der US-Amerikanischen STOP- und CAST-Tests. Fleischwirtschaft **74,** 413–416 (1994).
3. *Bogaerts, R.* und *Wolf, F.:* Eine standardisierte Methode zum Nachweis von Rückständen antibakteriell wirksamer Substanzen in frischem Fleisch. Fleischwirtschaft **60,** 667–671 (1980).
4. *Anonyme:* Recherche de substances inhibitrices. Manuel suisse des denrées alimentaires, chapitre 11, méthode d'analyse no 8. EDMZ, Berne 1991/95.
5. *Zavanella, M.* e *Tagliabue, S.:* Differenziazione di sostanze inibenti specifiche ed aspecifiche in alimenti di origine animale. Archivo Veterinario Italiano **31,** 157–161 (1980).
6. *Terplan, G., Zaadhof, K. J., Angersbach, H.* and *Skarlakidou, M.:* Elimination of non-specific inhibition of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in the detection of inhibitory substances in foods of animal origin. Preliminary contribution, Arch. Lebensm. Hyg. **24,** 90–92 (1973).
7. *Forschner, E.* und *Glende, W.:* Die Schweineniere als Problemorgan beim biologischen Hemmstofftest. Fleischwirtschaft **56,** 226–228 (1976).
8. *Forschner, E.* und *Seidler, M.:* Die Schweineniere als Problemorgan beim biologischen Hemmstofftest. Fleischwirtschaft **56,** 1008–1013 (1976).
9. *Johnston, R. W., Reamer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G.* and *Schwab, B.:* A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. J. Food Prot. **44,** 828–831 (1981).
10. *Koenen-Dierick, K., Okerman, L., de Zutter, L., Degroodt, J. M., van Hoof, J.* and *Srebrnik, S.:* A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method? Food Additives and Contaminants **12,** 77–82 (1995).
11. *Levetzow, R.:* Zur Entwicklung eines EG-Standards für den Nachweis von Hemmstoffen in Fleisch. Fleischwirtschaft **5,** 868–870 (1978).
12. *MacNeil, J. D., Korsrud, G. O., Boison, J. O., Papich, M. G.* and *Yates, W. D. G.:* Performance of five screening tests for the detection of penicillin G residues in experimentally injected calves. J. Food Prot. **54,** 37–40 (1991).
13. *Nouws, J. F. M., Broex, N. J. G., Hartog den, J. M. P.* and *Driessens, F.:* The new Dutch kidney test. Arch. Lebensm. Hyg., **39,** 133–138 (1988).
14. *Untermann, F.:* Hemmstoffnachweis im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung, Schweiz. Arch. Tierheilk. **128,** 307–311 (1986).
15. *Nouws, J. F. M.:* Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. Arch. Lebensm. Hyg. **32,** 103–110 (1981).
16. Anonyme, Ordonnance du 26 juin 1995 sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (p. 72–79, RO 1995).
17. *Heitzman, R. J.:* Veterinary drug residues, Blackwell Scientific Publications, Edited by R. J. Heitzman, Second Edition, p. 6/4, 1994.
18. *Korsrud, G. O., Salisbury, C. D. C., Fesser, A. C. E.* and *MacNeil, J. D.:* Laboratory evaluation on the Charm Farm Test for antimicrobial residues in meat. J. Food Prot. **58,** 1129–1132 (1995).
19. *Corrégé, I., Lacoste, A., Morche, N.* et *Duval, D.:* Comparison of rapid methods for detection of residues of antibiotics in pork. Viandes et Produits Carnés **15,** 110–114 (1994).
20. *Märtlbauer, E., Usleber, E., Schneider, E.* and *Dietrich, R.:* Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. Analyst **119,** 2543–2548 (1994).
21. *Märtlbauer, E.:* Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Ed. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1993.

22. *Thomson, C. A.* and *Sporns, P.:* Variation in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) components to lower sulfathiazole detection limits. J. Food Sci. **60,** 872–879 (1995).
23. *Strebel, K.* and *Schneider, N.:* Official control of meat, milk, and eggs on chloramphenicol and sulfadimidine by adapted enzymimmunoassays. Amtliche Kontrolle von Fleisch, Milch und Eiern auf Chloramphenicol und Sulfadimidin mit adaptierten Enzymimmunoassays. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86,** 191–212 (1995).
24. *Kitts, D. D., Zheng, M., Burns-Flett, E.* and *McErlane, K.M.:* Comparison of sulfadimethoxine residue analyses in salmon muscle using HPLC and Charm II test. J. Food Prot. **58,** 678–682 (1995).
25. *Korsrud, G. O., Salisbury, C. D. C., Fesser, A. C. E.* and *MacNeil, J. D:* Evaluation and testing of Charm test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in meat. In: V.K. Agarwal (ed.) analysis of antibiotic drug residues in food products of animal origin, p. 75–79. Plenum Press, New York 1992.
26. *Korsrud, G. O., Salisbury, C. D., Fesser, A. C.* and *MacNeil, J. D.:* Investigation of Charm Test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in suspect meat samples. Analyst **119,** 2737–2741 (1994).
27. *Guggisberg, D.* und *Koch, H.:* Methode zur quantitativen Bestimmung von Gentamicin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisation. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86,** 14–28 (1995).
28. *Guggisberg, D.* und *Koch, H.:* Methode zur fluorimetrischen Bestimmung von Neomycin in der Niere und in der Leber mit HPLC und Nachsäulenderivatisation. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86,** 449–457 (1995).
29. *Guggisberg, D., Mooser, A. E.* und *Koch, H.:* Screening-Methode zur quantitativen Bestimmung von 12 Sulfonamiden Gentamicin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisation. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86,** 14–28 (1995).
30. *Renard, L., Henry, Ph., Sanders, P., Laurentie, M.* and *Delmas, J. M.:* Determination of spiramycin and neospiramycin in plasma and milk of lactating cows by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B **657,** 219–226 (1994).
31. *Rychener, M., Mooser, A. E.* und *Koch, H.:* Rückstandsbestimmung von Sulfonamiden und deren N^4-Metaboliten in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **81,** 522–543 (1990).
32. *Randecker, V. W., Reagan, J. A., Engel, R. E., Soderberg, D. L.* and *McNeal, J. E.:* Serum and urine as predictors of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. J. Food Prot. **50,** 115–122 (1987).

Dr Pierre-Yves Vacher
Dr Thomas Jemmi
Office vétérinaire fédéral
Division hygiène des viandes et abattage
Section microbiologie
Berne-Liebefeld
Schwarzenburgstrasse 161
CH-3003 Berne