

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE 8 MAI 1945-GUELMA**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département d'Ecologie et Génie de l'Environnement  
Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement



**THESE :**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de  
Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle en Sciences Biologiques

**Option :** Santé, Eau et Environnement

**Thème**

**Mise en évidence des résidus d'antibiotiques  
dans les denrées alimentaires d'origine animale  
« cas du lait de vache »**

**Présentée par :**

**LAYADA Samiha**

**Devant le jury :**

Président:	M. HOUHAMDI	Prof	Université de Guelma
Directeur de thèse:	D.E. BENOURETH	Prof	Université de Guelma
Examineur:	Z. BRANES	Prof	Université d'Annaba
Examineur:	N. GRARA	M.C.A	Université de Guelma

Année Universitaire 2016/2017

*Dédicace*

*Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années. Je suis redevable à mes parents Dalila et Boubakeur, pour leur soutien moral et matériel et leur confiance indéfectible dans mes choix. Je dédie ce travail à ceux qui m'ont donné la volonté, pour réussir dans ma vie et mes études*

*A*

*Mes très chères sœurs : "Karima"; Mounia ; Radia ; Selouma et Amoula.*

*A ma belle-sœur Imene*

*A*

*Mes très chers frères: Azou, Chokri, Amine et Ayoub.*

*A mon beau-frère : Marwan*

*Aux*

*Fleurs de ma vie: Ibtihel, Mayar, Iyed et Saja.*

*A*

*Mes beaux-parents, beaux-frères et belles-sœurs*

*À Mon Mari Salah Eddine Berramdane;*

*Cette thèse s'ajoute à toutes les aventures que nous avons déjà partagées et il y en aura tellement d'autres ! C'est auprès de toi que je m'épanouis pleinement. Tu donnes tellement aux personnes qui t'entourent: tu mérites que la vie ne te réserve que de bonnes surprises.*

*Enfin;*

*A tous ceux qui m'aiment*

*A tous ceux que j'aime.*

*Samiha*

## Remerciements

*La thèse de doctorat représente un travail s'inscrivant dans la durée, et pour cette raison, constitue le fil conducteur d'une tranche de vie de son auteur, parfois au crépuscule de la candeur étudiante, et souvent à l'aube de la maturité scientifique. De nombreuses personnes se retrouvent ainsi de manière fortuite ou non, pour le meilleur, entre le doctorant et son doctorat. Ce sont certaines de ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.*

*Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse et notamment toute ma reconnaissance et ma gratitude s'adresse au directeur de cette thèse, le Professeur Benouareth Djamel Eddine pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.*

*Ainsi, je tiens à remercier Mr M. Houhamdi pour avoir accepté de présider le Jury de ma thèse. Je remercie vivement Mr Z. Branes et Mme N. Grara de bien vouloir accepter de juger mon travail.*

*Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Dr Mirjana Andjelkovic qui m'a accepté au sein de son service des résidus et contaminants ISP WIV Bruxelles Belgique et m'a surveillé tout au long de la réalisation de la partie des analyses UPLC-MS/MS.*

*Mes remerciements vont également au Dr Wim Coucke d'avoir accepté de me réaliser toutes les analyses statistiques.*

*Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'Université de Guelma, qui m'a permis, grâce à une aide financière pour un stage, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.*

*Je remercie infiniment DSM food specialties et spécialement Mr Joan Vinas (Directeur de comptes Iberia et Maghreb) qui m'a fourni les kits et l'incubateur Delvotest SP-NT, ainsi que pour son soutien moral et ses conseils professionnels.*

*Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'ont témoigné Mme Saliha, Mr Rachid et le vétérinaire Bilel de la ferme Mekhancha, le personnel de cette ferme et celui de la ferme école, Khari, Jean Yve et Tim et le personnel de l'ISP Bruxelles.*

*Je remercie également Mr HOUHAMDI Moussa, responsable du laboratoire de Recherche de Biologie, Eau et Environnement pour son aide et serviabilité, je remercie infiniment Mlle ABBAS Leila pour son extrême aide.*

*Merci à Mr Ksori Samir Chef département de l'écologie et génie de l'environnement et à Mme KHALLEF Messaouda, pour leur aide et conseils précieux durant la réalisation de ce travail.*

*Mr Adjabi Rabeh, Directeur de la CAAR que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi à mon oncle Mr Khelaifia Mohammed Taher (Nacer) et tout le cadre professoral et administratif de l'Université 8 Mai 45 de Guelma.*

*À mes Amies ;*

*Azouz Hanen, Tabet Mouna, Moumen Meryem, Bergal Amira, Abda Ahlem, Bouganoun Imene et Mairif Sameh et les autres doctorants (promotion 2011).*

*Pour cette chance que j'ai eu que nos chemins se croisent, que nous partageons tant de bons moments. Je vous souhaite plein de bonheur et qu'on se revoie le plus souvent possible !*

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b>	Présentation de la méthode des 4 boîtes utilisée pour le contrôle officiel	19
<b>Tableau 02</b>	La répartition des prélèvements provenant des fermes	26
<b>Tableau 03</b>	Les solvants utilisés pour la préparation des solutions standards intermédiaires mixtes (5LMR)	33
<b>Tableau 04</b>	Solution stock et 5LMR des Sulfamides	34
<b>Tableau 05</b>	Solution stock et 5LMR des Pénicillines	35
<b>Tableau 06</b>	Solution stock et 5LMR des Macrolides	36
<b>Tableau 07</b>	Solution stock et 5LMR des Tétracyclines	37
<b>Tableau 08</b>	Solution stock et 5LMR des Quinolones	38
<b>Tableau 09</b>	Solution stock et de 5LMR des Standards internes	41
<b>Tableau 10</b>	Résumé de comparaison entre les protocoles des quatre méthodes d'extraction	45
<b>Tableau 11</b>	Concentrations des solutions des standards d'antibiotiques utilisées pour obtenir la courbe de calibration. ( $\mu\text{g/L}$ )	48
<b>Tableau 12</b>	Les paramètres de la spectrométrie de Masse utilisés pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait	50
<b>Tableau 13</b>	Programme du gradient d'élution	53

<b>Tableau 14</b>	Exemple de la fiche de renseignement de certains prélèvements provenant des vaches traitées	55
<b>Tableau 15</b>	Les résultats de Delvotest obtenus pour les deux fermes et pour chaque type de lait analysé	57
<b>Tableau 16</b>	Les résultats de Delvotest obtenus pour les échantillons collectés des différents points de vente	58
<b>Tableau 17</b>	Comparaison entre les résultats des différents types de lait analysés par Delvotest SP-NT	59
<b>Tableau 18</b>	Statistique de confirmation avec ANOVA	63
<b>Tableau 19</b>	Tous les paramètres utilisés pour la comparaison entre quatre méthodes (M1, M2, M3 et M4) et la sélection finale de la méthode choisie	65
<b>Tableau 20</b>	Limites Maximales des résidus (MRL*), CC $\beta$ et le nombre des échantillons analysés pour chaque antibiotique utilisé pour la validation de la méthode choisie	68
<b>Tableau 21</b>	Comparaison des résultats obtenus par LC-MS/MS entre les différents types de lait analysés	70
<b>Tableau 22</b>	Nombre des échantillons de lait positifs par antibiotique analysé.	71
<b>Tableau 23</b>	Corrélation statistique entre les résultats du Delvotest SP-NT et LC-MS/MS	115
<b>Tableau 24</b>	Comparaison des résultats obtenus par LC-MS/MS et Delvotest SP-NT donnée par la fréquence des antibiotiques surreprésentés	116

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	Production laitière et fromagère algérienne	05
<b>Figure 02</b>	Principe du test d'acidification	18
<b>Figure 03</b>	Présentation de la zone d'étude	24
<b>Figure 04</b>	Delvotest® -sp-nt 100 ampoules	27
<b>Figure 05</b>	Incubateur Delvotest	28
<b>Figure 06</b>	Interprétation des résultats Delvotest	28
<b>Figure 07</b>	Evaporateur sous flux d'azote	30
<b>Figure 08</b>	Colonne C18 réservée pour l'analyse des multi résidus d'antibiotiques	30
<b>Figure 09</b>	Système Millipore pour production de l'eau milli-Q	31
<b>Figure 10</b>	UPLC couplée à la spectrométrie de masse	31
<b>Figure 11</b>	Exemples des résultats positifs (mauve), négatifs (jaune) et douteux après analyse par Delvotest SP-NT	58
<b>Figure 12</b>	Exploration graphique de rendement (recovery) par méthode, tous antibiotiques confondus	62
<b>Figure 13</b>	Elaboration graphique de rendement par méthode et antibiotique	63
<b>Figure 14</b>	Diagramme présentant une comparaison entre les quatre méthodes pour les antibiotiques qui ont des rendements plus bas	67
<b>Figure 15</b>	Chromatogrammes –a, b, c, d, e, f, g, h, i, j- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et des échantillons trouvés positifs pour l'amoxicilline représentant des pénicillines	83
<b>Figure 16</b>	Chromatogrammes –a, b, c, d, e- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs pour triméthoprime représentant des sulfamides	88

<b>Figure 17</b>	Chromatogrammes –a, b, c, d- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour tilmicosin représentant des macrolides	93
<b>Figure 18</b>	Chromatogrammes –a, b, c, d, e, f, g- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour l'oxytétracycline représentant des tétracyclines	102
<b>Figure 19</b>	Chromatogrammes –a, b, c, d- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour danofloxacin représentant des quinolones	106
<b>Figure 20</b>	Chromatogrammes –a, b, c- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour tylvalosine représentant des macrolides qui ne possèdent pas de LMR	110
<b>Figure 21</b>	Chromatogrammes –a, b, c- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour doxycycline, acide oxolonique et tulathromycine représentant des antibiotiques interdits	114
<b>Figure 22</b>	Estimation de la concentration des tétracyclines dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).	122
<b>Figure 23</b>	Estimation de la concentration des pénicillines dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps	123



<b>Figure 24</b>	Estimation de la concentration des macrolides dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).	124
<b>Figure 25</b>	Estimation de la concentration des quinolones dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).	125
<b>Figure 26</b>	Estimation de la concentration des sulfamides dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).	126

## Liste des abréviations

CEE: Communauté Economique Européenne.

pH : Potentiel d'hydrogène.

ppm : Partie par million.

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance.

DES : Dose Sans Effet.

LMR : Limite Maximale de Résidus.

AMM : L'autorisation de mise sur le marché.

var : variation.

CIP : La Collection de l'Institut Pasteur.

UI : Unité Internationale.

ELISA: l'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

R.I.A: Radio-Immuno-Assay.

ppb : Partie par billion.

UPLC : Chromatographie Liquide Ultra Performance.

°C : Le degré Celsius.

Ha : Hectare.

UPLC/MS-MS : Chromatographie Liquide Ultra Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem.

MRM : Multiple Reaction Monitoring (suivi de transition multiples).

mM : milli Molaire.

M : Molaire.

EDTA : Ethylenediamine tetracetic acid dipotassium salt dehydrate.

v/v: volume/volume.

ISP: Institut Scientifique de Santé Publique.

UHT : Ultra Haute Température.

CC $\beta$  : La capacité de détection.

S/N : signal to noise ou signal/bruit.

RRT : Le temps de rétention relatif.

ES : Electrospray.

IM : Injection intramusculaire.

MRPL : la limite minimale requise de performance.

LOD : niveau de détection.

## Sommaire

<b>Introduction</b>	1
---------------------	---

### Partie bibliographique

#### **Chapitre I : Généralités sur la filière laitière en Algérie**

1. Le lait et ses dérivées	4
2. Importance de la consommation du lait en Algérie	5
3. Production laitière en Algérie	6

#### **Chapitre II : Généralités sur les résidus d'antibiotiques**

1. Définition des résidus d'antibiotiques	7
2. Origine des résidus d'antibiotiques	7
2.1. Utilisation des antibiotiques à titre thérapeutique curatif ou en antibio-prévention	7
2.2. Utilisation en méthyphylaxie	8
2.3. Utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaires	8
3. Pharmacocinétique et résidus	8
3.1. Modélisation de la phase d'élimination: Exemple du passage dans le lait	9
3.2. Facteurs de variation des paramètres pharmacocinétiques	9
3.2.1. L'antibiotique	9
3.2.2. Facteurs liés au mode et à la voie d'administration	10
3.2.3. Facteurs liés à l'animal	10
4. Les dangers liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale	12
4.1. Toxicité directe des résidus d'antibiotiques	12
4.2. Risques allergiques	13
4.3. Risques cancérigènes	13
4.4. Risques liés à la modification de la flore digestive par les résidus d'antibiotiques	14
4.5. Risques de développement et dissémination de résistance bactérienne aux antibiotiques	14
4.6. Les problèmes liés à la transformation du lait	15
5. La réglementation autour des résidus d'antibiotiques	16
5.1. Mise en place des limites maximales des résidus LMR	17
5.2. Le délai d'attente	17
6. Les méthodes de recherches des résidus d'antibiotiques	17
6.1. Les méthodes microbiologiques	18
6.1.1. Test d'acidification	18
6.1.2. Méthode de diffusion sur gélose	19
6.1.3. Méthode des 4 boîtes	19
6.2. Les méthodes physico-chimiques	20
6.2.1. Méthodes enzymatiques	20
6.2.2. Méthodes immunologiques	20
6.2.3. Capteurs biologiques	21
6.2.4. Méthodes chromatographiques	21

**Partie expérimentale**  
**Chapitre III : Matériel et méthodes**

I. Cadre et période de l'étude	22
II. Échantillonnage	25
III. Matériel et Méthodes d'analyse	27
1. Analyse avec un test d'inhibition microbiologique Delvotest® -SP-NT	27
1.1. Echantillons	27
1.2. Matériel utilisé	27
1.3. Protocole d'analyse	28
2. Analyse par Chromatographie Liquide à Ultra Performance couplée avec Spectrométrie de Masse (UPLC/MS-MS)	29
2.1. Matériel utilisé	29
2.2. Principe de la méthode	32
2.3. Protocole d'analyse	32
2.3.1. Préparation des solutions standards d'antibiotiques	32
A. Solutions stocks (C1)	33
B. Solutions standard intermédiaires mixtes (5 LMR)	33
C. Solutions standards intermédiaires mixtes (1 LMR)	40
D. Solutions stocks des standards internes (roxythromycine, norfloxacine-D5, sulfadimidine C13, déméclocycline, flucloxacilline) à une concentration de 1mg/ml	40
2.3.2. Préparations des réactifs	42
2.3.3. Optimisation et validation de la méthode d'extraction	43
2.3.3.1. Optimisation de la méthode d'extraction	43
2.3.3.2. Validation de la méthode d'extraction	47
2.3.4. Extraction des échantillons de lait à analyser	49
2.3.5. Le dosage par UPLC/MS-MS	49
2.3.6. L'évaluation de la stabilité des antibiotiques dans le lait	53
3. L'analyse Statistique	54

**Chapitre IV : Résultats et discussion**

1. Résultats des questionnaires utilisés pour la collecte des données auprès des fermes et points de ventes	55
2. Résultats de l'analyse de résidus d'antibiotiques par test d'inhibition microbiologique Delvotest SP-NT	57
2.1. Résultats des échantillons collectés des deux Fermes A et B	57
2.2. Résultats des échantillons collectés à partir des points de vente	57
3. Résultats de l'analyse multi-résidus d'antibiotiques dans le lait par UPLC-MS/MS	62
3.1. Résultats de l'optimisation et validation de la méthode d'extraction	62
3.1.1. Optimisation de la méthode d'extraction	62
3.1.2. Validation de la méthode d'extraction	67
3.2 Résultats de l'analyse des échantillons de lait collectés par UPLC-MS/MS	70
4. Corrélation entre les résultats de l'UPLCMS/MS et ceux du Delvotest SP-NT et présence d'antibiotiques spécifiques	115
5. Résultats de la stabilité des antibiotiques dans le lait pendant conservation	120

**Conclusion**  
**Références bibliographiques**  
**Annexes**

129

**Résumés**

# **Introduction**

# INTRODUCTION

---

## ***Introduction***

Les antibiotiques ont une place importante dans l'élevage moderne d'aujourd'hui. Leur utilisation pour protéger la santé de l'animal et perfectionner sa production (Jank et al., 2015), conduit à leur présence sous forme de résidus dans les denrées alimentaires spécialement le lait. Il convient donc de s'interroger sur les risques qu'encourent les consommateurs vis-à-vis de cette présence qui peut conduire à un développement des réactions allergiques chez certains individus hypersensibles, à l'émergence de la résistance bactérienne, à la perturbation dans la composition de la flore digestive, à l'augmentation du risque de la carcinogénéicité jusqu'à la toxicité aigüe pouvant causer la mort (cas du chloramphénicol) (Petrović et al., 2008 ; Hou et al., 2014 ; Wang et al., 2006 ; Borràs et al., 2011). Peu après l'introduction des antibiotiques dans le traitement de la mammite bovine, l'industrie laitière se heurta à des difficultés techniques, surtout dans la fabrication des fromages affinés à pâte dure. Ces difficultés provenaient de l'action inhibitrice des antibiotiques présents à faible concentration sur le développement de la culture initiale (Petrović et al., 2008 ; Stead et al., 2008). Cette présence suscite toujours de nombreuses interrogations bien que des décisions telles que les Limites Maximales des Résidus aient conduites à la réduction de l'utilisation des antibiotiques (Kassaify et al., 2013), notamment avec l'interdiction récente de presque tous les additifs antibiotiques alimentaires facteurs de croissance pour rassurer la sécurité du consommateur et pour empêcher leur présence dans les denrées alimentaires d'origine animale (Council regulation, 2003).

Parallèlement, le lait est un aliment complet dont l'intérêt nutritionnel est incontestable chez le jeune en croissance et chez l'adulte. Cette denrée, largement consommée, occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire (Boultif, 2015). Par conséquent, la présence des résidus d'antibiotiques dans un lait destiné à une consommation directe ou une transformation doit être contrôlée. Maintenant, il existe plusieurs techniques qui peuvent être utilisées pour l'analyser. Les tests microbiologiques et immunologiques sont largement utilisés à cause de leur faible cout (Ramirez et al., 2003; Beltran et al., 2015), le Delvotest SP-NT comme la plupart des méthodes microbiologiques de détection ont été développés initialement pour la recherche des  $\beta$ -lactames dans le lait de vache. Ces tests sont basés sur l'inhibition de la souche *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis* à cause de sa sensibilité à plusieurs antibiotiques (Beltran et al., 2015). Tandis qu'une confirmation à l'aide des techniques plus sensibles et sélectives est recommandée. Actuellement, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) est la méthode d'analyse la plus utilisée à cause de



## *INTRODUCTION*

---

sa sensibilité et sa sélectivité élevées pour la détection de plusieurs résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires (Martins et al., 2014). Plusieurs recherches sont dirigées vers l'analyse de différentes classes de résidus d'antibiotiques dans le lait, en utilisant la LC-MS/MS (Han et al., 2015 ; Meng et al., 2015). Cependant, l'emploi de cette dernière pour ce type de détection dans une seule matrice est tellement exigeant de produits et donc de l'argent. Pour cette raison, l'optimisation d'une méthode qui puissent détecter plusieurs résidus d'antibiotiques dans différentes matrices quelques soient viande, lait ou autres est une thématique de recherche d'actualité.

On assiste aujourd'hui à une utilisation irrationnelle et de manière totalement abusive et anarchique des antibiotiques en pratique rurale en Algérie. Le contrôle des résidus d'antibiotique n'étant pas réglementé. A ce jour, notre pays ne possède pas de limite maximale de résidus dans le lait, et autres produits issus des animaux, propres aux antibiotiques utilisés. De ce fait aucun contrôle officiel n'est fait ni au niveau des fermes, ni sur les tanks après la collecte (Boultif, 2015). Par conséquent, quelques efforts de recherches individuels de Tarzaali et al., (2008), Aggad et al., (2009) et Titouche et al., (2013) en utilisant des méthodes microbiologiques moins spécifiques ont été menés sur le potentiel de la présence des résidus d'antibiotiques dans des échantillons de lait de vache cru.

Cette étude a été menée en raison de l'absence quasi-totale des données sur ce sujet en Algérie. L'objet principal de cette étude est :

L'évaluation des niveaux de contamination en résidus d'antibiotiques non seulement dans des échantillons de lait collectés directement dans des fermes mais aussi de poursuivre le contrôle dans des échantillons destinés à la consommation directe collectés à partir des différents points de ventes.

Deux types de lait seront analysés cru et lben afin de rechercher si les résidus d'antibiotiques persistent et peuvent être détecté dans ces échantillons après la production.

Une enquête auprès des praticiens des vétérinaires des fermes sur les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des bovins et leurs délais d'attente, ainsi qu'auprès des vendeurs privés de lait (points de vente) sur les origines de lait vendu aux consommateurs seront effectuées afin de cibler le et/ou les antibiotiques à rechercher. La détection des résidus d'antibiotiques dans les échantillons de lait collectés sera effectuée par l'utilisation de deux

## *INTRODUCTION*

---

méthodes. Nous commençons par une détection avec un test microbiologique d'inhibition Delvotest SP-NT. Ensuite une méthode de l'UPLC-MS/MS sera utilisée. Cette dernière sera tout d'abord optimisée et validée pour l'extraction et la purification des antibiotiques dans le lait selon des normes internationaux. Ensuite tous les échantillons collectés incluant ceux analysés par Delvotest SP-NT seront analysés. Les résultats obtenus par les deux méthodes seront comparés et corrélés afin d'évaluer la fiabilité de l'utilisation de Delvotest SP-NT dans les conditions Algérienne.

Une partie bibliographique sera présentée dans deux chapitres, le premier résume des généralités sur la filière laitière en Algérie et le second sera réservé aux généralités sur les résidus d'antibiotiques en présentant des notions, les risques liés à leur présence dans l'alimentation et les méthodes consacrées à leur détection.

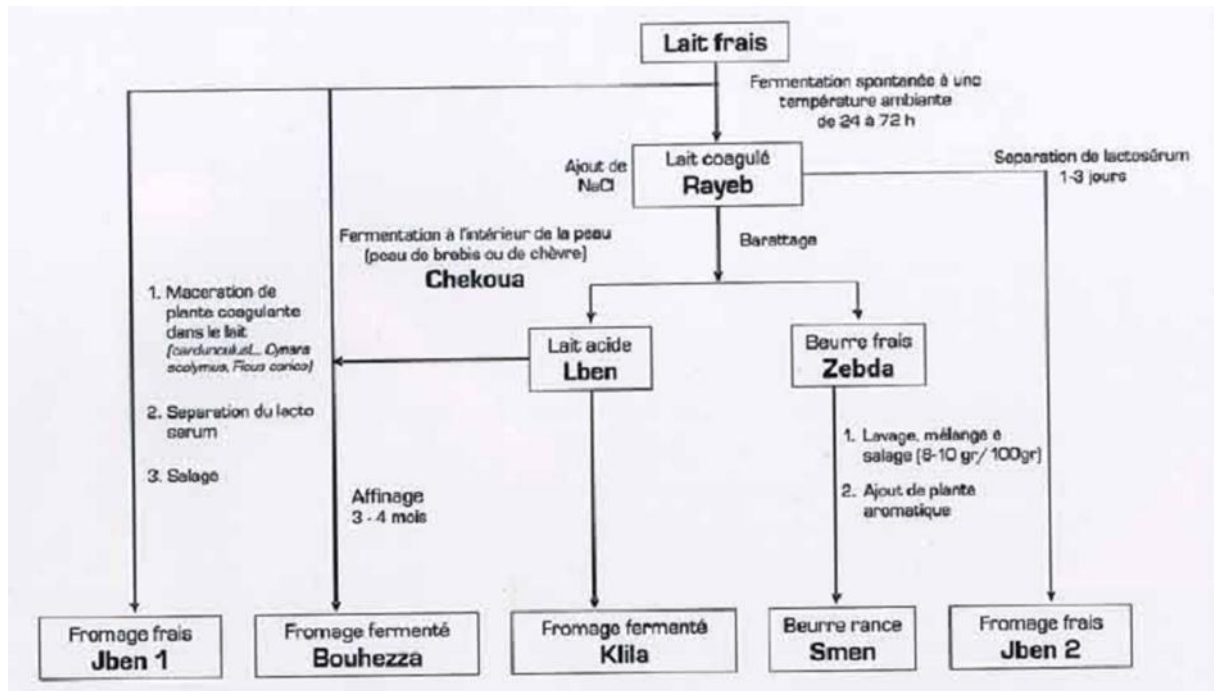
# **Partie bibliographique**

# **Chapitre I : Généralités sur la filière laitière en Algérie**

## 1. Le lait et ses dérivées

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Du point de vue physicochimique, le lait est un produit très complexe (Amiot et al., 2002). Un liquide biologique complexe qui contient un ensemble d'éléments nutritifs (glucides, lipides, protéines, vitamines, minéraux) et de constituants du système immunitaire nécessaires à la croissance rapide et à la protection du jeune mammifère durant les premières semaines ou les premiers mois de sa vie. Il est élaboré par la femelle en lactation à partir de matériaux qu'elle synthétise ou qu'elle prélève dans les divers pools et réserves corporels. L'étape clé est la phase d'exportation de ces matériaux. Si la régulation des synthèses et le franchissement de la membrane biologique ultime de la cellule sécrétrice par les différents composants conduisent à l'assemblage d'un produit de composition et de nature bien particuliers, cette « sortie » n'est pas très discriminante, et de nombreuses autres molécules, y compris des peptides et des protéines de poids moléculaire relativement élevé, peuvent être exportées simultanément. De ce fait, le lait se retrouve être le vecteur de nombre de métabolites endogènes de l'organisme maternel (hormones stéroïdiennes, peptidiques et protéiques par exemple), mais également de substances étrangères non nutritionnelles (xénobiotiques) introduites par l'alimentation ou résultant de traitements thérapeutiques directs (médicaments) (Merad et Merad, 2001).

Cependant, ce produit est consommé à son état cru ou transformé dont l'Algérie présente une tradition des produits laitiers bien établie. Le raïb fait partie de ces produits fermentés populaires en Algérie (Belhadia et al., 2011; Zoubeidi et Gharabi, 2013), il est fabriqué à partir du lait cru de vache ou de chèvre. La fermentation est effectuée à une façon spontanée et le produit résultant « raïb » pourrait être une source précieuse des bactéries lactiques autochtones (Mechai et Kirane, 2008). En ce cas le raïb s'agit d'un lait fermenté entier contrairement au lben qui est à son tour le résultat de barattage du raïb pendant 30 à 40 min (figure 1). A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10% du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre (Benkerroum et Tamime, 2004 ; Ouadghiri, 2009a).



**Figure 1:** Production laitière et fromagère Algérienne (Claps et Morone, 2011).

## 2. Importance de la consommation du lait en Algérie

Le lait et ses dérivés représentent environ 14% des dépenses agroalimentaires par foyer. Cette demande est tirée par la croissance démographique estimée à 1.6% par an, l'urbanisation qui est estimée à plus de 5% par an et s'ajoutant à cela l'amélioration du pouvoir d'achat (4% à 7% par an). Une enquête menée sur les ménages algériens fait ressortir que la catégorie de produits « lait et produits laitiers » occupe la quatrième position avec (7.5%) du total des dépenses de ces ménages, après les céréales (24.6%), viande rouge (18.4%) et légumes et fruits frais (13.7%) (Bouazouni, 2008). En effet, l'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb et le second pays au monde importateur de lait et de ses dérivés avec un marché annuel estimé, en 2004, à 1,7 milliard de litres (Boultif, 2015), plus de trois milliards de litres en 2007 (Griffoul, 2007 ; Boultif, 2015) et une consommation moyenne de l'ordre de 115L par habitant et par an en 2010 (Ghazi et Niar, 2011).

La production locale est évaluée à un peu moins de deux milliards de litres (Boultif, 2015), l'Algérie est donc contrainte d'importer des quantités massives de lait, dont la plus grande partie sous forme de lait de poudre qui coûte de plus en plus cher (Griffoul, 2007). Le manque est donc énorme; ainsi, le pays a adopté une politique d'importation des vaches laitières, mais celles-ci ne parviennent pas à donner les résultats escomptés (Ghazi et Niar, 2011).

### **3. Production laitière en Algérie**

On appelle filière un système économique qui consiste en un réseau de distribution et d'approvisionnement utilisé par tous les producteurs d'un même produit ou type de produits, en concurrence sur un marché de consommation (Lagrange, 1989). Elle vise à valoriser le potentiel d'une matière première fournie par l'agriculture en les transformant en produits finis à forte valeur ajoutée (Adrian et al., 1995 ; Cazet, 2007). Actuellement, la filière lait en Algérie se trouve dans une phase critique, face à une production locale qui ne dépasse pas les 2.3 milliards de litres (Kabir, 2015), aggravée par un taux de collecte très faible et une augmentation des prix de la matière première sur les marchés internationaux (Kacimi, 2013). Par conséquent, cette production est très faiblement intégrée dans l'industrie laitière locale (Bencharif, 2001). En Algérie, la filière s'articule autour de trois maillons principaux :

- En amont, une grande diversité d'élevages bovins,
- les organismes de collecte et de transformation à la fois étatiques et privés,
- les systèmes de mise en marché et les consommateurs.

L'émergence en amont d'un élevage laitier en mesure d'assurer les approvisionnements nécessaires conséquents en lait, représente la principale condition pour le développement de cette filière (Cherfaoui. 2003 ; Belhadia et al., 2009).

# **Chapitre II : Généralités sur les résidus d'antibiotiques**



## 1. Définition des résidus d'antibiotiques

Le médicament est d'une importance capitale en pratique vétérinaire. Son utilisation a pour but de sécuriser les productions et d'extérioriser au mieux les potentialités animales. De ce fait, l'emploi des médicaments vétérinaires chez les animaux de rente occupe une place importante dans la production laitière. Ces médicaments qui sont utilisés en vue de garantir l'état sanitaire des animaux ou d'améliorer leurs productions se retrouvent de façon courante dans les denrées destinées aux consommateurs sous forme de résidus lorsque le délai d'attente n'est pas respecté (Talnan, 2013). Selon la directive Européenne (Directive 81/851/CEE, 1981), les résidus sont définis comme étant: « Tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré». Tandis que, le règlement 2377/90/CEE modifie légèrement cette définition en la complétant: « Les résidus sont définis comme toute substance pharmacologiquement active, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après l'administration de médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux » (Stoltz, 2008).

## 2. Origine des résidus d'antibiotiques

Les antibiotiques sont utilisés de quatre façons différentes chez les animaux de production et avec des objectifs différents.

### 2.1. Utilisation des antibiotiques à titre thérapeutique curatif ou en antibio-prévention

Les antibiotiques peuvent être utilisés à titre thérapeutique curatif dont l'objectif est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Ainsi, ils peuvent être administrés à des périodes critiques de la vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue. Dans ces conditions, on parle d'antibio-prévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être provisoire et ponctuelle. L'antibio-prophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes (Stoltz, 2008).

## **2.2. Utilisation en métaphylaxie**

Lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques (sains ou en incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades. Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie (Maillard, 2002).

## **2.3. Utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaires**

Les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance afin d'améliorer la productivité des élevages (Bories et Louisot, 1998 ; Sanders, 2005 ; Jank et al., 2015). Dans son avis du 28 mai 1999, le comité scientifique directeur de la direction générale de la commission européenne, a déclaré que l'utilisation en tant que facteurs de croissance d'antimicrobiens appartenant aux catégories utilisées en médecine humaine et animale, ou susceptibles de l'être devrait être réduite le plus vite possible et à terme proscrite. Dans un deuxième avis, adopté en mai 2001, ce comité directeur soulignait que ce processus d'élimination devait être planifié et coordonné. Le règlement n° 1831/2003 du 22/11/2003 de la commission européenne prévoyait la suppression définitive de l'usage des antibiotiques comme additifs en alimentation animale à la fin de l'année 2005 et c'est en 2006 que l'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux était banni dans l'union européenne (Guillemot, 2006).

## **3. Pharmacocinétique et résidus**

Le médicament se déplace pour aller agir dans l'organisme au niveau de sa cible. Il y parcourt un chemin qui le mènera dans différents compartiments. Il pénètre dans l'organisme par la voie d'administration, après absorption, la substance active se trouve dans le compartiment de transport qui est le sang. Il peut aller agir au niveau d'une cible ou bien enjoindre le compartiment de stockage (les graisses). Tout au long de sa présence dans l'organisme, il sera régulièrement métabolisé, puis enfin il sera éliminé (Stora, 2005).

### 3.1. Modélisation de la phase d'élimination : Exemple du passage dans le lait

Les mécanismes de passage du sang vers le lait correspondent à la traversée de l'épithélium de la glande mammaire qui comporte comme une membrane lipoprotéique séparant le sang pH 7,4 du lait pH 6,6. Après administration parentérale, les substances à caractères base faible diffusent plus facilement dans le lait que les substances acides faibles, qui ont tendance à se localiser dans le plasma. La taille moléculaire intervient, également et les composés de poids moléculaire inférieur à 800 - 1000 Dalton diffusent mieux que les autres. Ainsi, les substances qui passent dans le lait en proportion importante sont celles qui ont une fixation tissulaire prépondérante et un caractère de base faible: Tétracycline, macrolide. Les substances lipophiles diffusent également bien dans le lait et restent fixées sur les lipides du lait (Stoltz, 2008).

### 3.2. Facteurs de variation des paramètres pharmacocinétiques

Il existe trois principaux types de facteurs pouvant modifier les paramètres pharmacocinétiques d'un médicament antibiotique. On trouve, des facteurs liés au médicament, au mode et à la voie d'administration et à l'animal.

#### 3.2.1. L'antibiotique

- A. **La forme galénique de l'antibiotique** (c'est-à-dire de la formule: excipients...etc) influe fortement sur son devenir dans l'organisme.
  
- B. **La forme chimique** exacte du composé intervient dans son absorption et sa distribution : Les sels les plus couramment utilisés sont plus hydrosolubles que les composés parentaux dont ils dérivent. La mise en suspension huileuse ralentit l'absorption: la pénicilline sodique ou potassique mise en suspension huileuse présente une résorption prolongée à partir du site d'injection intramusculaire pendant environ 18 heures. Sous forme de pénicilline procaïne, la même pénicilline en suspension huileuse présente une résorption prolongée sur 24 heures au minimum (Enriquez et Boulouis, 1990). Les esters sont en générale lipophile. C'est le cas par exemple des esters de macrolides (Triacétyl d'oléandomycine).

C. **La forme physique** et les excipients jouent un rôle dans la diffusion du ou des principes actifs. De nombreux constituants utilisés dans les spécialités pharmaceutiques, interviennent dans la diffusion (Fiscus-mougel, 1993).

### 3.2.2. Facteurs liés au mode et à la voie d'administration

**a. Administration intraveineuse** correspond à l'introduction du médicament directement dans la circulation sanguine. Il n'y a donc pas de phase d'absorption et la phase de distribution commence immédiatement.

**b. Administration intramusculaire et sous-cutanée** se distinguent surtout par la distance à franchir avant d'atteindre la circulation sanguine. En général, la résorption est plus rapide après une injection intramusculaire. Cependant, la vitesse de résorption peut être augmentée ou diminuée par la forme galénique (formulation longue action ou retard).

**c. Administration orale** est assez complexe car de multiples facteurs interviennent comme les particularités du système gastro-intestinal dans les différentes espèces, la présence d'aliments ou encore la maturité du système digestif.

**d. Administration intramammaire** est une voie couramment utilisée chez les vaches laitières. L'absorption est ici fortement modulée par l'état de la glande mammaire elle-même, notamment en cas d'infection.

### 3.2.3. Facteurs liés à l'animal

Les facteurs liés à l'animal correspondent essentiellement à son espèce mais également à l'âge ou à l'état physiologique.

#### A. l'espèce animale

Pour un médicament donné, ses paramètres pharmacocinétiques peuvent varier en fonction de l'espèce à laquelle il est administré. Des variations peuvent avoir lieu entre animaux d'une même catégorie (entre bovins, ovins et caprins, qui sont tous trois des ruminants) mais surtout entre animaux de classe différente (entre mammifères et oiseaux) (Enriquez et Boulouis, 1990).

### **B. l'âge de l'animal**

Un animal jeune ou âgé présente des capacités de détoxification hépatique et d'élimination moins importantes qu'un adulte. Ceci peut influencer sur les cinétiques de métabolisation et d'élimination et donc sur la qualité de résidus présents dans les tissus, résidus qui mettront alors plus de temps à être éliminés.

### **C. l'état pathologique de l'animal**

La variation des paramètres pharmacocinétiques d'un antibiotique peut être affectée par la présence de différentes infections dont la plus courante est la mammite. L'acquisition d'une infection mammaire chez les vaches laitières provoque une perturbation de fonctionnement de la glande et par conséquent la composition du lait produit. Ces perturbations résultent de l'infection elle-même, avec la présence de bactéries pathogènes dans le quartier infecté de la mamelle, mais aussi bien de la réaction inflammatoire que cette infection déclenche (Le Minor, 1982 ; Stoltz, 2008). Dans la glande mammaire, ce processus pathologique se traduit par différentes lésions et modifications des tissus :

- ✓ Une altération et une destruction des cellules de l'épithélium sécrétoire. Ces lésions sont dues à l'action des bactéries pathogènes et au passage de nombreux leucocytes dans le lait à travers cet épithélium. La barrière sécrétoire que constitue cet épithélium entre le sang et le lait, est rompue.
- ✓ Une augmentation de la perméabilité vasculaire et tissulaire associée à tous les états inflammatoires.

Ces lésions conduisent à un passage grave dans le lait d'éléments provenant du sang ou même le passage du sang (Le Minor, 1982). Après une injection parentérale, pour certains antibiotiques comme la pénicilline, les résidus persistent plus longtemps dans le lait de vache atteinte de mammite. Pour d'autres antibiotiques, il n'y a pas de différence observée dans la cinétique d'élimination des résidus entre une vache saine et une vache atteinte de mammite. Après administration intra-mammaire dans le trayon du quartier infecté, il peut y avoir passage partiel de l'antibiotique dans les quartiers non traités (Burgat-Sacaze et Petit, 1983).

#### **4. Les dangers liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale**

Une portion non négligeable des produits laitiers retrouvés sur le marché, tels les yogourts et les fromages, sont préparés par fermentation du lait à l'aide de bactéries lactiques. Les caractéristiques texturales et organoleptiques de ces produits sont directement liées au degré de croissance de ces bactéries dans le lait de départ. Occasionnellement, et à cause de la présence des antibiotiques, certains laits sont jugés impropres à la consommation et à la transformation en produits fermentés (Barbut et Petit, 2007). Les risques pour le consommateur et la Santé Publique liés à cette présence de résidus dans les denrées alimentaires sont (Reig et Toldra, 2008) :

- risque de toxicité directe,
- risque allergique,
- risque cancérogène,
- risque de pathologie liée à la modification de la flore digestive,
- risque d'apparition, de sélection et de dissémination de résistances bactériennes aux antibiotiques au sein des populations humaines et animales.

La présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires, et notamment le lait, pose également un problème à l'Industrie agroalimentaire pour la fabrication de produits fermentés. Les résidus d'antibiotiques sont alors appelés « inhibiteurs ». Ainsi, la notion d'inhibiteur correspond à un problème technologique et la notion de résidu correspond à un problème de santé publique (Fabre et al., 2002).

##### **4.1. Toxicité directe des résidus d'antibiotiques**

Les antibiotiques sont des médicaments antibactériens d'origine naturelle, produits à partir des champignons ou des bactéries ou obtenus par synthèse ou semi-synthèse. Ils ont en principe une toxicité sélective, c'est-à-dire qu'ils sont toxiques pour les bactéries mais non pour l'organisme; ce qui malheureusement n'est pas toujours vrai. Comme pour tout médicament actif, les antibiotiques sont susceptibles de provoquer des accidents plus ou moins importants. Il faut cependant signaler que du fait de leur mode d'administration qui se fait souvent par voie générale, les antibiotiques constituent une classe relativement peu toxique. Ces effets indésirables, même s'ils sont relativement peu fréquents et rarement graves doivent dans tous

les cas faire l'objet d'une déclaration au niveau des centres de pharmacovigilance (Clive et al., 1999).

#### **4.2. Risques allergiques**

Les antibiotiques, particulièrement les dérivés B- lactames et leurs produits de dégradation, sont bien connus pour provoquer des réactions allergiques. Les patients ayant des antécédents d'allergie atopique paraissent particulièrement susceptibles de développer ces réactions. Les sulfamides, le triméthoprime, la nitrofurantoïne et l'érythromycine ont aussi été associés à des réactions d'hypersensibilité, particulièrement des rashes (Chambers et Sande, 1998). Il est important de savoir que le potentiel allergénique de certains résidus d'antibiotiques n'est pas nécessairement identique à celui de la molécule parentale. Par exemple, pour les pénicillines, le déterminant majeur est le groupement benzylpenicilloyl, qui est à 95% le produit métabolique majeur des biotransformations de la pénicilline, mais d'autres dérivés peuvent être mis en cause tels les acides pénicilloïque, pénicillénique, pénalmaldique, pénicillényles ou pénicillamines. Ce dernier étant classiquement considéré comme responsable du plus grand nombre de chocs anaphylactiques (Demoly et al., 2000). Ces divers composés ne sont immunogènes qu'après fixation covalente sur une protéine, *in vivo* chez l'individu. Ces complexes immunogènes peuvent également exister dans l'organisme de l'animal et peuvent ne pas être dosés en tant que résidus car ils correspondent à des résidus non-extractibles ou résidus liés. En conclusion, on peut dire que le rôle sensibilisant des résidus d'antibiotiques, c'est-à-dire leur allergénicité, ne semble pas représenter un danger pour la Santé Publique. Par contre, leur rôle déclenchant, c'est-à-dire leur immunogénicité, peut entraîner des accidents chez des individus extrêmement sensibles (Petrovic et al., 2008 ; Stoltz, 2008 ; Hou et al., 2014). Cependant, les cas certains d'allergie, directement liés à la présence de résidus d'antibiotiques dans des denrées d'origine animale sont extrêmement rares (Stoltz, 2008).

#### **4.3. Risques cancérigènes**

Certains antibiotiques ont des propriétés carcinogènes connues. Les résidus de ces antibiotiques peuvent avoir un effet carcinogène sur le long terme (Petrovic et al., 2008 ; Hou et al., 2014), suite à une consommation régulière d'aliments contenant ces résidus. Ces antibiotiques ou composés utilisés comme antibiotiques sont alors interdits d'utilisation chez les animaux de production.

#### **4.4. Risques liés à la modification de la flore digestive par les résidus d'antibiotiques**

Notre tube digestif contient des bactéries dites entérobactéries avec lesquelles nous cohabitons toute notre vie. Leur fonction principale est de nous protéger en permanence contre les toxines, les microbes, les virus et les germes pathogènes nocifs présents dans l'environnement mais également dans nos aliments. L'activité des antibiotiques peut provoquer la mort de certaines bactéries ou diminuer leur aptitude à proliférer dans l'intestin. L'atteinte de certaines populations bactériennes qui font partie de la flore normale entraîne le développement d'autres populations pouvant être pathogènes ou opportunistes (Wang et al., 2006 ; Borràs et al., 2011). Une bactérie résistante aux antibiotiques peut être sélectionnée par un résidu d'antibiotique, soit directement par l'élimination de la bactérie sensible correspondante, soit indirectement par l'affaiblissement des barrières. Les bactéries non pathogènes résistantes aux antibiotiques ne sont pas dangereuses. Cependant, la gravité des infections opportunistes est très augmentée par les résistances. De plus, ces résistances peuvent être transmises à des bactéries pathogènes si leur support génétique est mobilisable (plasmide, transposon) (Stoltz, 2008).

#### **4.5. Risques de développement et dissémination de résistance bactérienne aux antibiotiques**

Le risque lié à l'apparition d'antibiorésistance reste préoccupant. En effet, l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et en médecine vétérinaire conduit inévitablement à la sélection de bactéries résistantes (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001 ; Wang et al., 2006 ; Borràs et al., 2011). Le risque d'antibiorésistance consécutif à un usage massif d'antibiotiques en élevage est donc bien réel. La dynamique de la résistance est avant tout en fonction des antibiotiques utilisés mais elle dépend aussi d'autres facteurs parmi lesquels une prédisposition génétique, l'échange de gènes de résistance et leur fonctionnalité chez différentes bactéries hôtes et la pression de sélection. Le transfert de la résistance acquise au niveau de l'agriculture vers l'homme a cependant pu être établi (Rhodes et al., 2000).



#### 4.6. Les problèmes liés à la transformation du lait

L'industrie de transformation laitière s'est sensibilisée à la présence des résidus d'antibiotiques dès l'utilisation de ces molécules en élevage laitier. Ainsi, dès le début des années cinquante, des études ont montré l'importance de la sensibilité des starters industriels à la présence de résidus inhibiteurs (Petrovic et al., 2008 ; Stead et al., 2008 ; Romnee, 2009). La présence de résidus d'antibiotiques dans le lait présente des conséquences néfastes pour la technologie laitière de fabrication de produits fermentés. Ces conséquences néfastes résultent essentiellement de l'inhibition partielle ou totale des phénomènes de fermentation bactérienne nécessaires à la fabrication de nombreux produits laitiers. Les fabrications les plus sensibles sont celles où interviennent les ferments lactiques et les germes d'aromatisation : yaourt, fromages à caillage acide et à caillage mixte, crème et beurres maturés. En effet, même une faible quantité d'antibiotique suffit en général à inhiber ces ferments (Stoltz, 2008).

Au cours de la fabrication du fromage, la présence de résidus d'antibiotiques modifie profondément l'équilibre normal de la flore microbienne présente dans le lait, souvent en faveur des bactéries coliformes (germes de contamination fécale). Le caillage se fait normalement, mais les ferments lactiques vrais, sensibles aux antibiotiques, sont inhibés. L'acidification du caillé ne se produit pas et l'égouttage naturel et spontané, s'effectue mal : le caillé reste volumineux, visqueux, mou et gorgé de lactosérum : c'est le caillé floconneux. La flore coliforme, insensible à la pénicilline grâce à une pénicillinase, se développe dans le caillé. Elle fermente le lactosérum résiduel en fermentation gazeuse dont les gaz s'accumulent dans le caillé en faisant apparaître de multiples petits trous et gonfler la pâte. Le manque d'acide lactique ne permet pas le développement des moisissures de surface qui sont remplacées par des moisissures anormales. Enfin, la pâte se trouve rapidement envahie par des germes de putréfaction (Giraudet, 1978). Les crèmes et les beurres subissent une perte de goût ou d'arôme. L'arôme du beurre est dû à la présence de diacétyl, produit du métabolisme de *Streptococcus diacetylactis*, principal ferment d'arôme. D'autre part, l'aromatisation doit se faire en milieu acide et les antibiotiques retardent ou empêchent la phase d'acidification (Fiscus-Mougel, 1993).

Les différents ferments ne sont pas sensibles de la même manière aux différents résidus d'antibiotiques présents dans le lait. Les laits contaminés par la pénicilline posent de sérieux problèmes en laiterie. Dès 0,01 partie par million (ppm), la production d'arômes cesse. A 0,05 ppm, la fermentation lactique est ralentie de façon significative et de 0,1 à 0,2 ppm, l'acidification est arrêtée (Mourot et Loussouarn, 1981 ; Heeschen et Bluthgen, 1990). Ainsi, une très petite quantité de résidus d'antibiotiques peut perturber les techniques de transformation du lait (Petrovic et al., 2008 ; Stead et al., 2008).

### **5. La réglementation autour des résidus d'antibiotiques**

Avant les années 1980, les méthodes de détection des résidus dans les viandes étaient relativement peu sensibles. Les Services Vétérinaires menaient alors, afin de protéger la Santé Publique, une politique de zéro résidu. Si une carcasse ou une pièce de viande était contrôlée positive aux résidus d'antibiotiques, elle était saisie et déclassée. Au début des années 1980, les progrès techniques ont permis un bon spectaculaire dans les méthodes de détection avec notamment le développement de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). La politique du zéro résidu n'était alors plus tenable car des quantités infimes de résidus étaient presque systématiquement détectées. Ces quantités détectées étaient si faibles dans la grande majorité des cas qu'il devenait important d'évaluer le danger qu'elles représentaient vraiment pour la Santé Publique. Deux notions très importantes sont alors apparues dans la réglementation, afin de compléter celle de résidus: La notion de Dose Sans Effet (DES) et la notion de Limite Maximale de Résidus (LMR) (Stoltz, 2008 ; Kassaify et al., 2013).

Le Journal Officiel de l'Union Européenne du 20 Janvier 2010 publie un règlement (Commission Regulation, 2010) qui consolide la nouvelle liste des LMR (Limites Maximales des Résidus). Ce règlement de 72 pages comprend deux tableaux dans lesquelles les LMR des substances pharmacologiquement actives listées par ordre alphabétique sont présentées. Le premier tableau de 72 pages présente «Les substances autorisées» en productions animales. Le second tableau d'une demi- page liste les substances interdites d'emploi en production animale. Dix inscriptions au total incluant le chloramphénicol et les nitrofuranes sont mentionnées.

### **5. 1. Mise en place des limites maximales des résidus LMR**

La LMR correspond à la concentration maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire, sans risque sanitaire pour le consommateur et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les denrées alimentaires. Dans le cas du lait, une substance doit obtenir une LMR lait pour chaque espèce de destination, pour que son utilisation soit autorisée chez les femelles en cours de production laitière dans ces espèces de destination. Si une substance n'a pas de LMR lait dans une espèce, le médicament vétérinaire la contenant ne peut pas être utilisé chez une femelle de cette espèce en lactation. La mise en évidence de ce résidu dans le lait de cette espèce correspond à un non-respect de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) et de la réglementation sur les résidus (Laurentie et Sanders, 2002).

### **5.2. Le délai d'attente**

D'une façon générale, les antibiotiques persistent longtemps dans l'organisme avant leur excrétion complète. Pour prévenir la présence d'antibiotiques dans le lait, on impose souvent un temps d'attente avant la commercialisation du lait. Ce délai d'attente, généralement de plusieurs jours, varie énormément en fonction de la nature de l'antibiotique utilisé, de la dose injectée ainsi que de la fréquence d'utilisation et de la voie d'administration. Compte tenu de toutes ces variables, il est pratiquement impossible d'établir des délais exacts pour chaque famille d'antibiotiques. Cela explique en partie le fait qu'on retrouve occasionnellement des résidus d'antibiotiques dans le lait, et ce, même au-delà des délais d'attente prévus. Le manque d'informations sur la biodistribution et l'élimination de ces substances par l'organisme semble «être à l'origine de ce phénomène de persistance prolongée des antibiotiques dans le lait». Le respect des délais d'attente constitue toujours un moyen de prévention valable. Cependant, la recherche systématique des résidus d'antibiotiques dans les échantillons de lait demeure le seul moyen de prévention qui peut assurer l'innocuité complète des produits. Pour ce faire, il est donc impératif de disposer de méthodes de détection fiables, sensibles et spécifiques (Le Minor, 1982).

### **6. Les méthodes de recherches des résidus d'antibiotiques**

Dans le cadre de la surveillance de la qualité des denrées d'origine animales, plusieurs méthodes de détection des résidus sont mises en œuvre. Certaines de ces méthodes sont dites de dépistages qui consistent à distinguer les échantillons positifs des échantillons négatifs, et d'autres méthodes sont dites de confirmation (Le Minor, 1982 ; Bergogne-Berizin et

Dellamonica, 1999). Selon le principe de chacune de ces méthodes, on peut les classer en méthodes microbiologiques et en méthodes physico-chimiques.

### 6.1. Les méthodes microbiologiques

Les méthodes microbiologiques sont très largement utilisées en routine, sont qualitatives et constituent la première étape des plans de contrôle, et sont basées sur l'inhibition de la croissance bactérienne. Ces méthodes consistent à effectuer un contrôle positif «un antibiotique auquel la souche utilisée est sensible» et un contrôle négatif «l'eau distillée stérile ou un lait ne contenant pas d'antibiotiques» pour permettre de valider les résultats (Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999).

#### 6.1.1. Test d'acidification

Pour ce test, on utilise une culture d'une bactérie capable de dégrader le lactose en acide lactique et un indicateur de couleur, le pourpre de bromocrésol, qui nous permet de savoir s'il y a eu acidification du milieu. La souche la plus adaptée pour cette méthode est *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 (souche C953, CIP 5281) (Ben Mahdi et Ouslimani, 2009). Si le lait analysé contient des antibiotiques alors les bactéries ne dégraderont pas le lactose, la couleur du milieu reste inchangée. Par contre, l'absence d'antibiotique, se traduit par le virage de la couleur du bleu vers le jaune, il y a donc acidification (figure 2).

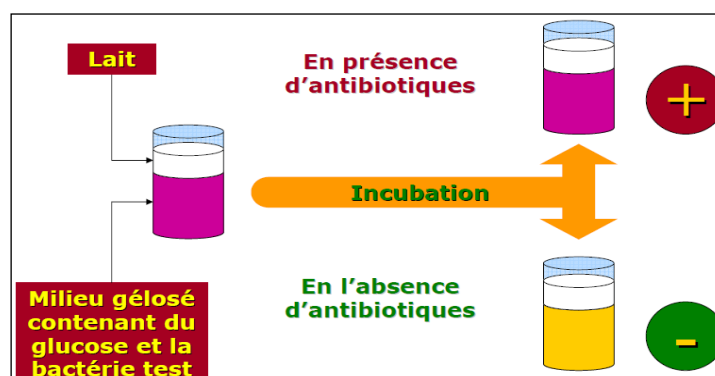


Figure 2 : Principe du test d'acidification (Singleton, 2008).

### 6.1.2. Méthode de diffusion sur gélose

Elle consiste à faire diffuser un antibiotique dans un milieu gélosé contenant une souche bactérienne sensible à cet antibiotique. Pour ce faire, on dépose des volumes identiques représentant plusieurs dilutions de la solution contenant l'antibiotique sur des rondelles de papier buvard. Ces disques sont mis en contact d'une surface gélosée contenant  $10^6$  à  $10^7$  cellules souches indicatrices ou de spores. Pendant l'incubation, l'antibiotique diffuse dans la gélose de façon radiaire à partir de son point d'application. Après 15 à 48 heures à la température optimale de croissance du micro-organisme, on mesure les diamètres d'inhibition qui apparaissent sous l'aspect de zones claires.

### 6.1.3. Méthode des 4 boîtes

La méthode des 4 boîtes est la méthode officielle française de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande. Elle a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. La méthode est basée sur l'analyse de rondelles de viande selon le principe de la méthode de diffusion sur gélose (tableau 1) (Talnan, 2013).

**Tableau 1:** Présentation de la méthode des 4 boîtes utilisée pour le contrôle officiel.

Boite	1	2	3	4
Souche	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
pH	6	7.4	8	8
Observations		+Triméthoprième		
Molécules (cible)	Bétalactames + Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bétalactames + Macrolides

## 6.2. Les méthodes physico-chimiques

Ce sont des méthodes confirmatives et/ou quantitatives, sont spécifiques à un antibiotique ou une famille d'antibiotiques. Les méthodes physico-chimiques regroupent les méthodes enzymatiques, immuno-enzymatiques et immunologiques qui sont dites des méthodes rapides et les méthodes chromatographiques dites aussi méthodes analytiques.

### 6.2.1. Méthodes enzymatiques

Les méthodes enzymatiques sont très rapides ont pour principe l'inhibition d'une enzyme en présence d'un résidu d'antibiotique spécifique. Cette enzyme n'est alors plus révélée par un indicateur coloré (Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999). Le test le plus répandu est le Penzyme qui permet de détecter aussi peu que 0.017 UI des  $\beta$ -lactames dans le lait en 20 minutes seulement. Repose sur la capacité des  $\beta$ -lactames d'inhiber l'enzyme DD-carboxypeptidase responsable de la libération de la D-alanine à partir de l'Acetyl<sub>2</sub>-l.Lys-D.Ala-D.Ala. En absence d'antibiotiques, la D-alanine est oxydée par la D-amino-oxydase et libère du peroxyde d'oxygène qui en présence d'un indicateur coloré, génère une coloration rose. En présence d'antibiotiques, cette réaction colorimétrique est inhibée et le lait demeure blanc (Le Minor, 1982).

### 6.2.2. Méthodes immunologiques

Sont basées sur l'interaction antigène-anticorps, qui est très spécifique pour un résidu particulier. La technique la plus répandue est l'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) et le système de détection peut être basé sur des réactifs à enzymes marquées. Il y a différentes méthodes pour la quantification des antigènes, comme la méthode « double anticorps » encore appelée ELISA sandwich et le test de compétition directe ELISA (Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999). Les Radio-Immuno-Assay (R.I.A.) sont compétitifs et utilisent des anticorps spécifiques pour les récepteurs des antibiotiques sont basés sur la mesure de la radioactivité du complexe immunologique en 10 minutes, ces tests permettent la détection des quantités de 05 à 80 partie par billion (ppb) (Le Minor, 1982). D'autres tests utilisent la luminescence ou la fluorimétrie comme méthode de détection. Aujourd'hui, il existe de nombreux kits ELISA de différent type utilisables pour un grand nombre de substances et notamment de nombreux antibiotiques. Ils sont disponibles pour un résidu

spécifique ou pour un groupe de composés apparentés comme par exemple le groupe des fluoroquinolones (Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999).

### **6.2.3. Capteurs biologiques**

Différents types de capteurs biologiques ont été développés ces dernières années pour le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires dans la viande, dont bien sûr les résidus d'antibiotiques. En général, ces capteurs contiennent un anticorps comme élément de reconnaissance qui interagit avec l'analyte. Le signal biochimique qui en résulte est mesuré optiquement ou converti en un signal électronique qui est ensuite traité dans un équipement approprié. Les capteurs biologiques sont capables de détecter simultanément de multiples résidus dans un échantillon et en une seule fois ce qui les rend intéressants pour le contrôle en laboratoire car ils permettent l'analyse d'un grand nombre d'échantillons et de résidus en un minimum de temps et avec un minimum de consommables utilisés pour l'analyse. Ils représentent aujourd'hui une vraie alternative aux tests ELISA (Singleton, 2008).

### **6.2.4. Méthodes chromatographiques**

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie liquide ultra performance (UPLC) sont les méthodes chromatographiques les plus utilisées. Ces méthodes physico-chimiques sont basées sur l'extraction et la purification des antibiotiques à partir des tissus ou des liquides comme le lait (Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999). De ce fait, la séparation de composés en solution élués s'effectue à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile liquide percolée grâce à une pression élevée. Effectivement, il existe une réelle interaction triple entre l'analyte, la phase stationnaire et la phase mobile basée sur l'affinité physico-chimique entre les trois (Boultif, 2015).

# **Partie expérimentale**



# **Chapitre III : Matériel et méthodes**

## I- Cadre et période de l'étude

La démarche de cette étude est axée sur des enquêtes de terrain et sur des analyses réalisées au laboratoire de microbiologie et de biochimie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers ; Université de Guelma (Algérie). Ainsi qu'au service des résidus et contaminants ; Institut Scientifique de Santé Publique, Bruxelles (Belgique).

Notre étude s'est déroulée dans la wilaya de Guelma plus précisément dans le centre de la ville de Guelma et certaines communes. La wilaya de Guelma se situe au Nord-est du pays et constitue, du point de vue géographique, un point de rencontre, voire un carrefour entre les pôles industriels du Nord (Annaba et Skikda) et les centres d'échanges au Sud (Oum El Bouaghi et Tébessa). Elle occupe une position médiane entre le Nord du pays, les Hauts plateaux et le Sud. La wilaya de Guelma s'étend sur une superficie de 3.686,84 Km<sup>2</sup>. Elle est limitrophe aux Wilayas de: Annaba au Nord, El Taref au Nord-est, Souk Ahras à l'Est, Oum El-Bouaghi au Sud, Constantine à l'Ouest et Skikda, au Nord-ouest.

Son territoire se caractérise par un climat subhumide au centre et au Nord et semi-aride vers le Sud. Ce climat est doux et pluvieux en hiver et chaud en été. La température qui varie de 4°C en hiver à 35.4°C en été, est en moyenne de 17,3°C. D'une vocation essentiellement agricole, la Wilaya de Guelma recèle un important potentiel, à savoir:

\*Surface Agricole Totale (SAT): De 264.618 Ha, soit 71,77 % de la superficie totale.

\*Surface Agricole Utile (SAU): De près de 187.338ha, soit 50,81% de la superficie totale de la wilaya et 70,80% de la SAT.

\*Superficie forestière de 113.182 ha, soit un taux de 30,70% de la superficie totale de la wilaya (ANDI, 2015).

Ce potentiel a permis le développement de nombreuses activités agropastorales tel que l'élevage de vaches laitières dans des fermes étatiques et/ou privées ou par des éleveurs à petite échelle. Dans le but de préserver cette activité, les éleveurs ne cessent d'utiliser des antibiotiques, cette étude a pour objectif de détecter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait collecté dans deux fermes majeurs et 16 points de vente destiné au consommateur. Les différents sites de prélèvements sont présentés dans la figure 3.

**❖ Institut de Technologie Moyenne d'Agriculture (Ferme A)**

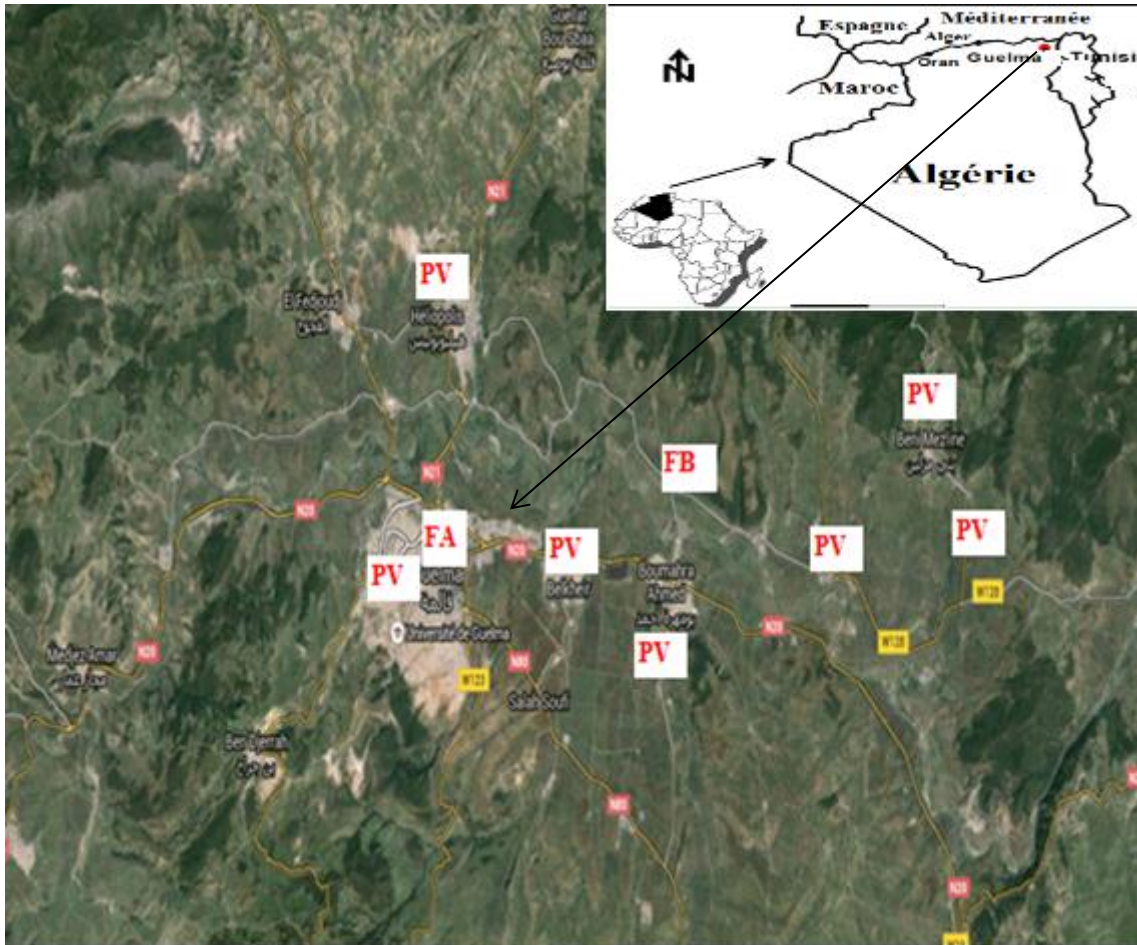
La ferme école est située à quelques mètres du siège de la wilaya de Guelma. Elle dispose un étable avec 24 vaches laitières, dont les races sont de Prim' holshtein et la Guelmoise. L'hygiène est peu acceptable, l'étable est riche en débris organiques en décomposition. La traite est mécanique; elle est réalisée deux fois par jour dans la salle de traite, grâce à quatre chariots trayeurs. Le lait collecté lors la traite est vendu directement aux citoyens de la wilaya.

**❖ Ferme de MEKHANCHA NAFAA (Ferme B)**

La ferme pilote MEKHANCHA NAFAA est située sur le territoire de la commune Boumahra Ahmed à l'Est du chef-lieu de la wilaya de Guelma. Elle comprend des vaches laitières de race Prim' holshtein pie noir. Les animaux reçoivent une ration différente selon le stade de lactation ou de tarissement et l'état de vache (l'état de chair). En plus de la paille et du concentré, l'alimentation des vaches laitières est occasionnellement complétée par des résidus de tomate fraîche et les drèches de brasserie. L'hygiène s'effectue avec de l'eau, et raclages des déchets. L'étable est riche en débris organiques en décomposition (concentré moisi, matières fécales des animaux, fientes des pigeons). La traite est mécanique; elle est réalisée deux fois par jour dans l'étable (absence de salle de traite), grâce à quatre chariots trayeurs. A la fin, le lait collecté est vendu aux collecteurs privés qui vont le distribuer aux usines et/ou vendeurs privés.

**❖ Points de ventes**

Seize (16) points de ventes ont été visités pour la collecte des échantillons de lait de vache cru et de Lben destinés directement à la consommation humaine. Ces vendeurs sont localisés au centre de la wilaya ainsi que dans ses communes, citons principalement (Boumahra Ahmed, Belkheir, Héliopolice, Djebala et Beni mezline)



**Figure 3:** Présentation de la zone d'étude (Source électronique : Google Earth 2016). Abréviations: FA ferme A, FB ferme B, PV points de vente.

## II. Échantillonnage

Avant de commencer le prélèvement du lait de vache il faut d'abord s'assurer que vous êtes en sécurité; c'est-à-dire que la vache est bien reliée par un professionnel d'étable et que vous vous positionnez dans une manière qui vous facilite la traite et vous protège lors du mouvement de la vache. Une procédure rigoureusement aseptique a été suivie pour le prélèvement d'échantillon de lait afin d'éviter toute contamination par les nombreux microorganismes présents sur le pis et les trayons de la vache, que sur les mains du préleveur. Premièrement, la mamelle est bien nettoyée des selles et des impuretés avec de l'eau tiède javellisée. Deuxièmement, une compresse trempée avec un antifongique à base d'ammonium quaternaire est utilisée pour désinfecter l'extrémité du trayon en insistant sur l'extrémité de l'orifice de canal du trayon. Troisièmement, l'extrémité de chaque trayon est essuyée avec du coton contenant de l'éthanol à 70%. L'alcool est l'antiseptique de choix car il s'évapore rapidement et ne laisse aucun résidu bactéricide dans l'échantillon de lait (NMC, 1990).

Avant de commencer le prélèvement de lait à collecter, 3 à 4 jets sont éliminés pour éviter toutes traces des désinfectants. Pour le lait de tank ; un échantillon est prélevé sur chaque citerne de collecte à des périodes aléatoires. Tous les échantillons sont bien identifiés, conservés dans une glacière à +4°C jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

Durant la période de janvier 2013 à juillet 2014; un total de 194 échantillons de lait est collecté dont 156 échantillons (tableau 2) sont rassemblés de deux fermes (A et B). Le principe des prélèvements est la recherche des résidus d'antibiotiques dans des échantillons de lait collectés des vaches qui ont eu un traitement aux antibiotiques le même mois de la collecte en particulier après le délai d'attente, des vaches déclarées saines et qui n'ont reçu aucun traitement durant le mois de prélèvement et de lait de collecte (tank). Effectivement, un questionnaire est utilisé pour rassembler des données sur le traitement des vaches utilisé (type d'antibiotique administré, voie de traitement, date de traitement et le délai d'attente pour chaque antibiotique utilisé). Ce questionnaire nous dirige aux antibiotiques qui seront par la suite analysés et nous permet de pouvoir contrôler, si le temps d'attente est vraiment respecté au sein des fermes.

**Tableau 2:** La répartition des prélèvements provenant des fermes.

Lieu de prélèvement	Nombre d'échantillon par type de lait		
	Lait de vaches saines	Lait de vaches traitées	Lait de collecte
Ferme A	28	8	17
Ferme B	70	18	15
Total	98	26	32

Egalement, 38 échantillons de lait (22 du lait fermenté "Iben" et 16 lait de vache cru) sont achetés auprès des 16 points de vente préalablement cités. Un autre questionnaire est utilisé pour la collecte des données sur les origines du lait commercialisé.

Approximativement, un volume de 140 ml de chaque échantillon de lait est rassemblé dans des flacons stériles; conservé et transporté au laboratoire à 4°C. 10 mL sont utilisés pour le premier dépistage des résidus d'antibiotiques avec Delvotest SP-NT et 130mL sont conservés à (-20°C) pour d'autres analyses de confirmation avec UPLC/MS-MS.

### III. Matériel et Méthodes d'analyse

La recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait comporte deux analyses principales. Premièrement, une analyse avec Delvotest SP-NT et deuxièmement une analyse avec UPLC-MS/MS.

#### 1. Analyse avec un test d'inhibition microbiologique Delvotest® -SP-NT

##### 1.1. Echantillons

Un total de 154 échantillons de lait (127 des deux fermes et 27 des différents points de ventes) fera l'objet d'une analyse par Delvotest® -SP-NT.

##### 1.2. Matériel utilisé

###### 1.2.1. Description du kit Delvotest® -SP-NT

Delvotest® -SP-NT 100 ampoules (DSM, Pays-Bas) est un test de diffusion sur gélose et quatre kits sont utilisés (figure 4). Trois sont fournis par la firme DSM Food Specialties (Espagne) et le quatrième est acheté (Tunisie). Chaque kit est équipé avec 100 ampoules coulées avec une gélose qui contient : un nombre standards de spores de *Bacillus stearothermophilus var calidolactis*, des substances nutritives et l'indicateur de pH (pourpre de bromocrésole). Ainsi 100 pipettes en plastiques jetables à 0.1mL.



**Figure 4:** Delvotest® -SP-NT 100 ampoules

### 1.2.2. Incubateur Delvotest SP-NT

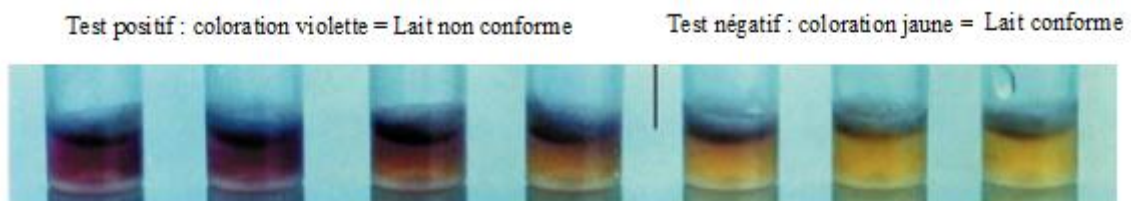
Est un appareil préconisé pour l'incubation de 10 ampoules à une température de  $64 \pm 1$  °C et un temps de 3h préalablement réglés (figure 5).



**Figure 5:** Incubateur Delvotest SP-NT

### 1.3. Protocole d'analyse

A l'exception des échantillons de lben, 10 mL de chaque échantillon de lait cru sont chauffés dans des tubes à vis stériles à 80°C pendant 10 min dans un autoclave pour détruire les inhibiteurs (lysozyme et lactoferrine) naturellement présents dans le lait (Hillerton et al, 1998). Après, les ampoules nécessaires sont séparées à une façon d'éviter de détériorer les ampoules adjacentes et la pellicule aluminium est perforée avec la pipette. 0.1mL de lait est prélevé à l'aide d'une pipette et décanté lentement dans les ampoules Delvotest SP-NT identifiées au préalable pour chaque échantillon à tester. Une nouvelle pipette est utilisée afin d'éviter toute contamination entre les échantillons. Finalement, les ampoules sont incubées dans un bain Marie ou dans l'incubateur Delvotest à  $64^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 3h. Les instructions de la firme de production sont respectées pour le protocole et l'interprétation des résultats (figure 6).



**Figure6:** Interprétation des résultats Delvotest SP-NT (DSM, 2012).



## **2. Analyse par Chromatographie Liquide Ultra Performance couplée avec Spectrométrie de Masse (UPLC/MS-MS)**

En raison de vérifier la fiabilité des résultats obtenus avec Delvotest SP-NT, une technique rapide et spécifique est utilisée pour l'analyse de 194 échantillons.

### **2.1. Matériel utilisé**

#### **A. Verrerie et consommable**

- matras jaugé de 5ml et 10ml
- pipettes graduées
- tube en verre de 10ml
- Tube Falcon® conique avec bouchon de 50ml
- Pipettes Pasteur
- Seringues Terumo de 2ml (VWR)
- Poire
- Portoirs
- cupules eppendorf
- Filtres membrane nylon 0.2µm (Euroscientific)
- Fioles à UPLC en verre et en plastique (GRACE)
- Eprouvettes graduées
- Flacons en verre ombré pour stocker les solutions d'antibiotiques préparées.

#### **B. Appareillage**

- Dispensettes 10ml et 50ml
- Micropipettes à volume variable 10- 100µl
- micropipettes à volume variable 100- 1000µl
- Balance de précision (Metler AK 160)

- Balance (Sartorius)
- Vortex (biosan)
- Centrifugeuse vitesse maximale 10000t/min (Jouan BR4)
- Centrifugeuse, type eppendorf vitesse maximale 12000 t/min (Biofuge; Heraeus)
- Incubateur (SHEL-LAB)
- Hotte aspirante
- Evaporateur sous flux d'azote de type (PIERCE) (figure7)



**Figure 7:** Evaporateur sous flux d'azote (26-2-2015)

- Colonne analytique UPLC: Acquity BEH C18 100×2.1 mm, 1.7µm WATERS (Millford, MA, USA) (figure 8)



**Figure 8:** Colonne C18 réservée pour l'analyse des multi- résidus d'antibiotiques (30-3-2015)

- Système Millipore (Bedford, MA, USA) (figure 9).



**Figure 9:** Système Millipore pour production de l'eau milli-Q (2-4-2015)

- Chromatographie liquide Ultra Performance (WATERS Acquity) couplée au Spectromètre de masse Xevo-TQMS avec enregistreur (PC) muni d'un logiciel Masslynx (figure 10).



**Figure 10:** UPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) (26-2-2015)

### C. Produits chimiques

Les réactifs utilisés sont de qualité UPLC. On note:

- Méthanol pour UPLC-MS (Biosolve; Valkenswaard, Pays bas)
- Acétonitrile pour UPLC-MS (Biosolve; Valkenswaard, Pays bas)
- Ethanol pour UPLC-MS (Biosolve; Valkenswaard, Pays bas)
- Eau Milli-Q (système Millipore, Bedford, MA, USA)

- Acide formique pour analyse (Darmstadt, Allemagne)
- Acide acétique pour analyse (Darmstadt, Allemagne)
- Acide oxalique pour analyse (Darmstadt, Allemagne)
- Ethylenediamine tetracetic acid dipotassium salt dihydrate 99% (EDTA) (Darmstadt, Allemagne)
- Sulfate de Sodium anhydride (Darmstadt, Allemagne)
- Solution NH<sub>4</sub>OH 2M
- Oxyde d'aluminium
- Les standards d'antibiotiques de référence, Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
- Les standards internes (sulfadimidine C<sup>13</sup>, flucloxacilline, norfloxacin\_D5, roxythromycine et déméclocycline), Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique).

## 2.2. Principe de la méthode

la chromatographie liquide ultra-performance (UPLC) couplée avec spectrométrie de masse en tandem polyvalente (UPLC–MS/MS) susceptible de contrôler multiples réactions (MRM) est devenue l'outil d'analyse de choix pour une quantification sensible simultanée et même pour une confirmation claire d'une vaste gamme d'antibiotiques cibles et leurs métabolites dans des matrices complexes. Les méthodes UPLC-MS/MS multi-résidu sont une façon efficace pour contrôler une large variété de contaminants chimiques en une seule analyse, augmentant les ressources de laboratoire et permettant une flexibilité élevée au traitement d'échantillon (Meng et al., 2015).

La recherche des résidus d'antibiotiques à l'aide de l'UPLC-MS/MS comporte trois étapes essentielles:

- la préparation des solutions standards d'antibiotiques et la préparation des solutions des solvants utilisés au cours de l'analyse.
- L'extraction et purification des résidus d'antibiotiques des échantillons à analyser.
- Le dosage par UPLC-MS/MS.

## 2.3. Protocole d'analyse

### 2.3.1. Préparation des solutions standards d'antibiotiques

Toutes les solutions des standards d'antibiotiques préparées doivent être conservé à -20°C afin d'assurer leurs stabilité.

## A. Solutions stocks (C1)

### A.1. Sulfamides, pénicillines, macrolides et tétracyclines

Dans un ballon jaugé de 10 ml, peser séparément environ 10 mg de standard et mettre au trait avec le solvant adéquat (tableaux 4, 5, 6 et 7). Corriger la concentration en tenant compte de la pureté du standard, selon la formule

$$\text{Concentration. Exacte} = (\text{masse pesée} \times \text{pureté}) / \text{volume}$$

### A.2. Quinolones

Dans un ballon jaugé de 50 ml, peser séparément environ 5 mg de standard et mettre au trait avec le solvant adéquat (tableau 8). Corriger la concentration en tenant compte de la pureté du standard, selon la formule précédente.

## B. Solutions standard intermédiaires mixtes (5 LMR)

Dans un ballon jaugé de 10 ml (V2) (tableau 3), prélever le volume exact (V1) de chacune des solutions stocks (C1) pour obtenir une concentration finale de x µg/ml (C2) (tableaux 4, 5, 6, 7 et 8). Utiliser pour cela la formule:

$$\underline{C1 \times V1 = C2 \times V2}$$

C1 = concentration de la solution stock en µg/ml

V1 = volume à prélever de la solution stock en ml

C2 = concentration finale

V2 = volume final

**Tableau 3:** Les solvants utilisés pour la préparation des solutions standard intermédiaires mixtes (5LMR).

Mixte antibiotiques	V2 (ml)	solvant
Mixte sulfamides	10	méthanol
Mixte pénicillines	10	eau
Mixte tétracyclines	10	méthanol
Mixte macrolides	10	méthanol
Mixte quinolones	10	méthanol

Tableau 4: solution stock et 5LMR des sulfamides.

Antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	Solvant	Concentration exacte C1 (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "Sulf mix 5 LMR" C2 (µg/mL)
Sulfadiazine	22/01/2015	100	1271	10,8	100	10	Méthanol	1,080	93	10
Sulfapyridine	22/01/2015	100	1154	10,7	100	10	Méthanol	1,070	93	10
Sulfamethoxy-pyridazine	22/01/2015	100	1043	10,7	100	10	Méthanol	1,070	93	10
Sulfadoxine	22/01/2015	100	1069	10,8	100	10	Méthanol	1,080	93	10
Sulfadimethoxine	22/01/2015	100	1264	10,0	98	10	Méthanol	0,980	102	10
Sulfadimidine	22/01/2015	100	1038	10,2	100	10	Méthanol	1,020	98	10
Sulfamono-methoxine	22/01/2015	100	1037	10,0	100	10	Méthanol	1,000	100	10
Sulfamoxole	22/01/2015	100	800	10,1	100	10	Méthanol	1,010	99	10
Sulfaquinoxaline	22/01/2015	100	1272	10,2	96	10	Méthanol	0,979	102	10
Sulfachloro-pyridazine	22/01/2015	100	1238	10,2	100	10	Méthanol	1,020	98	10
Sulfathiazole	22/01/2015	100	1274	10,1	100	10	Méthanol	1,010	99	10
Sulfaguanidine	22/01/2015	100	1278	10,1	100	10	Méthanol	1,010	99	10
Sulfamethizole	22/01/2015	100	1275	10,1	98,9	10	Méthanol	0,999	100	10
Sulfamerazine	22/01/2015	100	1279	10,0	100	10	Méthanol	1,000	100	10
Sulfamethoxazole	22/01/2015	100	1276	10,2	100	10	Méthanol	1,020	98	10

Antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	Solvant	Concentration exacte C1 (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "Sulf mix 5 LMR" C2 (µg/mL)
Sulfacetamide	22/01/2015	100	1146	10,2	100	10	Méthanol	1,020	98	10
Sulfisoxazole	22/01/2015	100	1142	10,1	100	10	Méthanol	1,010	99	10
triméthoprime	22/01/2015	100	1291	10,3	100	10	Méthanol	1,030	97	10

(Suite tab 4)

**Tableau 5:** solution stock et 5LMR des pénicillines.

Antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	solvant	Concentration exacte C1 (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "Pénic mix 5 LMR" C2 (µg/mL)
Amoxicilline	22/01/2015	50	1239	10,0	100	10	Eau	1,000	50	5
Ampicilline	22/01/2015	50	1287	10,5	100	10	Eau	1,050	48	5
Pénicilline G	22/01/2015	50	726	10,1	100	10	Eau/Méthanol (V/V)	1,010	50	5
Cloxacilline	22/01/2015	3000	1270	10,5	98,5	10	Méthanol	1,034	2901	300
Dicloxacilline	22/01/2015	300	1294	10,2	100	10	Méthanol	1,020	294	30
Nafcilline	22/01/2015	300	1297	10,1	98,7	10	Méthanol	0,997	301	30
Oxacilline	22/01/2015	300	1295	10,1	100	10	Méthanol	1,010	297	30
Pénicilline V	22/01/2015	25	1144	10,9	98,9	10	Méthanol	1,078	23	2,5

**Tableau 6:** solution stock et 5LMR des macrolides.

Antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	Solvant	Concentration exacte C1 (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "Macrol mix 5 LMR" C2 (µg/mL)
Erythromycine	22/01/2015	200	1288	10,3	100	10	acétonitrile	1,030	194	20
Spiramycine	22/01/2015	250	1289	10,1	100	10	acétonitrile	1,010	248	25
Tilmicosine	22/01/2015	50	1143	10,0	85,2	10	acétonitrile	0,852	59	5
Tylosine	22/01/2015	100	1213	10,2	91,8	10	acétonitrile	0,936	107	10
Josamycine	22/01/2015	200	1010	10,2	100	10	acétonitrile	1,020	196	20
Lincomycine	22/01/2015	100	1266	10,3	100	10	acétonitrile	1,030	97	10
Tulathromycine	22/01/2015	100	1139	10,0	97,4	10	acétonitrile	0,974	103	10
Neospiramycine	22/01/2015	250	1133	10,0	100	10	acétonitrile	1,000	250	25
Tylvalosine	22/01/2015	50	1141	10,2	68,73	10	acétonitrile	0,701	71	5



**Tableau 7:** solution stock et 5LMR des tétracyclines.

Antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	Solvant	Concentration exacte C1 (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "Tetra mix 5 LMR" C2 (µg/mL)
Chlortétracycline	22/01/2015	100	1267	10,3	93,1	10	Méthanol	0,959	104	10
Oxytétracycline	22/01/2015	100	1070	10,1	97	10	Méthanol	0,980	102	10
Tétracycline	22/01/2015	100	1265	10,3	97,5	10	Méthanol	1,004	100	10
Doxycycline	22/01/2015	100	1290	10,8	100	10	Méthanol	1,080	93	10
4-epi-Chlortétracycline	22/01/2015	100	1041	10,0	97	10	Méthanol	0,970	103	10
4-epi-Oxytétracycline	22/01/2015	100	1023	10,1	97	10	Méthanol	0,980	102	10
4-epi-Tétracycline	22/01/2015	100	1024	10,2	97	10	Méthanol	0,989	101	10

Tableau 8: solution stock et 5LMR des quinolones.

Antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	Solvant	Concentration exacte C1 (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "Quinol mix 5 LMR" C2 (µg/mL)
Fluméquine	22/01/2015	200	998	5,1	100	50	NH4OH 2M / méthanol (4-96,v/v)	0,102	980	10
Difloxacin	22/01/2015	300	996	5,1	100	50	NH4OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,102	1471	15
Ciprofloxacine	22/01/2015	100	933	5,1	100	50	NH4OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,102	490	5
Enrofloxacin	22/01/2015	100	1296	5,0	100	50	NH4OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,100	500	5
Danofloxacin	22/01/2015	100	995	5,2	100	50	NH4OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,104	481	5
acide Nalidixique	22/01/2015	100	989	5,1	100	50	NH4OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,102	490	5
acide Oxolinique	22/01/2015	100	911	5,4	100	50	NH4OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,108	463	5
Sarafloxacin	22/01/2015	30	932	5,1	100	50	NH4OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,102	147	1,5

Antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	Solvant	Concentration exacte (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "Quinol mix 5 LMR" (µg/mL)
Marbofloxacin	22/01/2015	150	997	5,0	100	50	NH <sub>4</sub> OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,100	750	7,5
Norfloxacin	22/01/2015	100	990	3,5	100	50	NH <sub>4</sub> OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,070	714	5
Ofloxacin	22/01/2015	100	1149	5,5	100	50	NH <sub>4</sub> OH 2M/ méthanol (4-96,v/v)	0,110	455	5

(suite tab8 )

**C. Solutions standards intermédiaires mixtes (1 LMR)****C.1. Mixte tétracyclines + macrolides**

Dans un ballon jaugé de 5 ml mélanger 1 ml de chaque solution mixte 5 LMR de tétracyclines, macrolides et mettre au trait avec du méthanol.

**C.2. Mixte sulfamides + quinolones**

Dans un ballon jaugé de 5 ml mélanger 1 ml de chaque solution mixte 5 LMR de sulfamides et quinolones et mettre au trait avec du méthanol.

**C.3. Mixte pénicillines**

Dans ballon jaugé de 5 ml mélanger 1 ml de la solution mixte 5 LMR de pénicillines et mettre au trait avec de l'eau.

**D. Solutions stocks des Standards Internes (roxythromycine, norfloxacin-D5, sulfadimidine C<sup>13</sup>, déméclocycline, flucloxacilline) à une concentration de 1mg/ml**

Peser à +/- 10mg séparément chaque standard interne dans un ballon jaugé de 10 ml et mettre au trait avec du méthanol, sauf pour la flucloxacilline, utiliser de l'eau (tableau 9).

**D.1. Mixte Standards Internes à 5 LMR**

Dans un ballon jaugé de 10 ml, prélever x µl de chaque solution stock à +/- 1 mg/ml et mettre au trait avec du méthanol (tableau 9). Cette solution est stable 1 an au congélateur

**Tableau 9:** solution stock et de 5LMR des standards internes.

Standards Internes	Famille d'antibiotique	Date de préparation d'antibiotique	LMR (µg/L)	n° de composé	masse pesée (mg)	Pureté (%)	Volume (mL)	Concentration exacte (mg/mL)	Volume à pipeter (µL)	Concentration dans "SI mix 5 LMR" (ng/µL)
D5 norfloxacine	Quinolones	23/01/2015	100	799	5,9	100	10	0,590	169	10
flucloxacilline	Pénicillines	23/01/2015	100	855	10,2	100	10	1,020	98	10
sulfadimidine C <sup>13</sup>	Sulfamides	23/01/2015	100	861	10	100	10	1,000	100	10
déméclocycline	Tétracyclines	23/01/2015	100	1069	10,2	100	10	1,020	98	10
roxythromycine	Macrolides	23/01/2015	100	848	10	100	10	1,000	100	10

### D.1. Mixte standards internes 1 LMR

Dans un ballon jaugé de 10 ml, prélever 2 ml de la solution mixte des standards internes 5LMR et mettre au trait avec du méthanol. Cette solution est stable 1 an au congélateur.

### 2.3.2. Préparations des solutions à utiliser

#### -Tampon acide oxalique 0.1mM, 0.1% acide formique

Dans une éprouvette graduée de 1 L, ajouter 10 ml acide oxalique 10mM et 1 ml d'acide formique et mettre au trait avec de l'eau.

**-Acide oxalique 10 mM :** Dans un matras de 1 L, peser 1.26 g acide oxalique dihydraté et mettre au trait avec de l'eau.

**-Acétonitrile 0.1% acide formique :** Ajouter 1ml acide formique à 1L acétonitrile.

**-EDTA 0.1M :** Dans un matras de 100 mL, peser 4.04 g EDTA et mettre au trait avec de l'eau. Conserver à température ambiante.

**-Méthanol/eau (1/1, v/v) :** Mélanger 50ml méthanol avec 50 ml eau.

**-Méthanol/acétonitrile (7/3, v/v) :** Mélanger 70 ml de méthanol avec 30 ml d'acétonitrile.

**-Solution de déprotéinisation (éthanol : acide acétique, 96 :4 v/v) :** Mélanger 96mL d'éthanol avec 4mL d'acide acétique.

**-Solution composée d'acide formique (0.1% dans l'eau) et d'acide formique (0.1% dans l'acétonitrile) (98 :2) :** Mélanger 98mL d'acide formique 0.1% dans l'eau avec 2 mL d'acide formique 0.1% dans l'acétonitrile.

**- Solution NH<sub>4</sub>OH 2M/CH<sub>3</sub>OH (4-96, v/v) :** Mélanger 4mL de la solution NH<sub>4</sub>OH avec 96mL du méthanol.

### 2.3.3. Optimisation et validation de la méthode d'extraction

#### 2.3.3.1. Optimisation de la méthode d'extraction

L'institut ISP de Belgique a précédemment optimisée et validée une méthode pour l'extraction et la détection de 59 résidus d'antibiotiques dans la viande utilisant l'UPLC-MS/MS selon la commission Européenne (Commission decision, 2002). Bien que, pour utiliser cette méthode sur nos échantillons du lait nous devons tout d'abord l'optimiser. Alors, 36 antibiotiques qui ont les mêmes valeurs de LMR dans le lait et la viande, ou bien des valeurs de LMR plus basses dans le lait que la viande (Commission Regulation, 2010) parmi les 59 sont sélectionnés. La sélection de la meilleure méthode pour l'extraction des résidus d'antibiotiques dans le lait est basée sur la comparaison entre quatre protocoles d'extraction modifiés (tableau 10) dont trois (M1, M2 et M3) sont basées sur la méthode initiale de viande et M4 sur celle optimisée par Martins et al., (2014) et leurs procédures d'extraction sont détaillées en dessous. A partir de la comparaison entre les moyennes des rendements obtenus avec les quatre méthodes, la méthode 3 est sélectionnée comme la meilleure méthode qui sera validée et présentée dans la partie résultats et discussion (optimisation de la méthode d'extraction). Un échantillon du lait UHT acheté d'une supérette Belge est utilisé pour l'analyse par UPLC-MS/MS.

#### Méthode 1

Dans cette méthode les mêmes paramètres que la méthode initiale de la viande sont respectés, 3 g d'échantillons (un blanc et deux contrôles) sont pesés dans des tubes Falcon® de 50 mL. Puis, 150 µL de la solution mixte des standards internes à 1LMR (Commission Regulation, 2377/ 1990), 200 µL d'EDTA 0.1 M, 7 mL du mélange méthanol/acétonitrile et 3g de sulfate de sodium anhydre sont ajoutés. Parallèlement, 75µL de chaque solution mixte des standards à 1LMR (macrolides-tétracyclines), (sulfamides- quinolones) et (pénicillines), comme citées auparavant; sont ajoutés aux échantillons de contrôles afin d'obtenir des niveaux correspondants à 0.5 LMR. Après, les échantillons sont agités au vortex à la vitesse maximale pendant 1 minute et centrifugés à 10000 t/min pendant 10 minutes. Un volume de 5ml de surnageant est transvasé dans un tube de 10 mL et évaporé à sec à 40 °C sous azote. 300 µL d'eau MilliQ sont rajoutés dans les tubes après évaporation, Agités au vortex quelques secondes et transférés dans des cupules eppendorf de 1.5mL pour une ultracentrifugation à 12000t/min pendant 30 min. Le surnageant est filtré avec une seringue de 2 mL surmontée

d'un filtre de 0.2  $\mu\text{m}$  dans une fiole pour injection UPLC. Les extraits contenant les antibiotiques sont prêts pour l'analyse par UPLC-MS/MS.

### **Méthode 2**

Dans cette méthode un volume de 10g au lieu de 3g est utilisé. 10g d'échantillons (un blanc et deux contrôles) sont pesés et le reste de la procédure est exactement comme présenté dans la méthode 1.

### **Méthode 3**

Dans cette méthode les volumes des solvants et des standards utilisés sont adaptés avec le volume du lait. 10 g d'échantillons (un blanc et deux contrôles) sont pesés dans des tubes Falcon® de 50 mL. Ensuite, 500  $\mu\text{L}$  de la solution mixte des standards internes à 1LMR, 667  $\mu\text{L}$  d'EDTA 0.1 M, 23 mL du mélange méthanol/acétonitrile et 3g de sulfate de sodium anhydre sont ajoutés. Après, 250 $\mu\text{L}$  de chaque solution mixte des standards à 1LMR comme précédemment citées sont ajoutés aux échantillons de contrôles afin d'obtenir des niveaux correspondants à 0.5 LMR. Le reste de la procédure est exactement comme expliqué dans la méthode 1.

### **Méthode 4**

Un volume de 0.5g d'échantillons (un blanc et deux contrôles) est pesé dans des cupules eppendorf de 2 mL. Ensuite, 12.5  $\mu\text{L}$  de la solution mixte des standards internes à 1LMR, 30 $\mu\text{L}$  d'EDTA 0.1 M sont ajoutés. Subséquemment, 12.5  $\mu\text{L}$  de chaque solution mixte des standards à 1LMR sont ajoutés aux échantillons de contrôles afin d'obtenir des niveaux correspondants à 0.5 EU LMR. Le reste de la procédure est exactement comme décrit par Martins et al., (2014). Les échantillons sont agités au vortex pendant (10s) et équilibrés à l'abri de lumière pendant 10 min. Après, une solution de déprotéinisation (0.6ml d'éthanol: acide acétique, 96:4 v: v) est ajoutée. Les échantillons sont agités au vortex pour quelques secondes, congelés à (-18°C) pendant 30 min et après centrifugés à 12000 t/min pendant 30min. Finalement, 0.75mL de surnageant est transvasé dans une fiole pour injection UPLC et dans l'ordre de compléter le volume à 1.0 mL, une solution composée d'acide formique (0.1% dans l'eau) et d'acide formique (0.1%) dans l'acétonitrile (98 :2) est ajoutée. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  est injecté dans le système LC-MS/MS.



**Tableau 10:** Résumé de comparaison entre les protocoles des quatre méthodes d'extraction.

étapes d'extraction	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3	Méthode 4 (Martins et al, 2014)
1) Quantité d'échantillon	3g	10g	10g	0.5g
2) Type de récipient	50mL Falcon tube			2mL Eppendorf
3) Solution mixte des standards internes, 1LMR (EU2377/90)	150µL	150µL	500µL	12.5µL
4) EDTA, 0.1M	200µL	200µL	667µL	30µL
5) mixte methanol/acetonitrile	7mL	7mL	23mL	/
6) Sodium sulfate anhydride	3g	3g	3g	/
7) Solution mixtes des standards*	75µL	75µL	250µL	12.5µL
8) Agitation par vortex	1min			10s et équilibration pendant 10min à l'abri de lumière
9) Centrifugation	10000t/min, 10min à 4°C			/
10) Déprotéinisation	/			0.6mL  Ethanol/acide acétique (96/4)  Suivie par une courte agitation et incubation à -18°C pendant 30min

étapes d'extraction	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3	Méthode 4
11) Surnageant	5mL évaporé à sec à 40°C suivi par ajout de 300 µL d'eau MilliQ			/
12) Agitation et centrifugation	quelques secondes 12000t/min pendant 30min			
13) Surnageant	Tout le surnageant		0.75mL avec addition de 0.25mL Acide Formique 0.1% dans L'eau/ acide formique dans l'acétonitrile (98:2)	
14) Filtration	filtres 0.2µm			/

(suite tab 10)

\* solution standard mixtes contiennent: Sulfamides (sulfapyridine, sulfamethoxypridazine, sulfadoxine, sulfadimidine, sulfamonométhoxine, sulfaquinoxaline, sulfaquinoxaline, sulfamoxole, sulfachlorpyridazine, sulfadiméthoxine, sulfaquinoxaline, sulfathiazole, sulfaguandine, triméthoprime, sulfamerazine, sulfaméthoxazole, Sulfadiazine, sulfacetamide, sulfisoxazole), pénicillines (amoxicilline, ampicilline, pénicilline V, pénicilline G, dicloxacilline, cloxacilline, oxacilline, nafcilline) quinolones (fluméquine, difloxacin, sarafloxacin, ciprofloxacine, enrofloxacin, danofloxacin, acide nalidixique, marbofloxacine, norfloxacine, ofloxacine, acide oxolinique), macrolides (érythromycine, spiramycine, josamycine, clindamycine, lincomycine, neospyramycine, tilmicosine, tylosine, tylvalosine, tulathromycine), tétracyclines (doxycycline, oxytétracycline, 4-epi-chlorotétracycline, 4-epi-oxytétracycline, 4-epi-tétracycline, tétracycline, chlorotétracycline)

### 2.3.3.2. Validation de la méthode d'extraction

Une validation de la méthode choisie est réalisée pour tous les antibiotiques présentés dans le tableau 20 (partie résultats et discussion; validation de la méthode d'extraction) selon la commission européenne (Commission Decision, 2002) en déterminant: La spécificité/sélectivité, La capacité de détection CC $\beta$ , la linéarité et l'applicabilité. Le même échantillon de lait (confirmé négatif aux résidus d'antibiotiques lors l'optimisation) est utilisé comme échantillon blanc pour la validation.

Pour déterminer la spécificité de la méthode proposée, une série des extraits des échantillons blancs de lait (n=20) avec un échantillon de lait fortifié à 0.5 LMR est analysée par UPLC-MS/MS sur un seul jour. La spécificité est démontrée par l'absence de pics aux temps de rétention des analytes dans des échantillons extraits à blanc. Ces derniers sont considérés comme faux positifs lorsqu'ils répondent aux critères suivant: le rapport signal/bruit est supérieur ou égale à 3 (S/N=3), le temps de rétention relatif (RRT) de l'échantillon de lait blanc est équivalent à celui de l'échantillon de lait fortifié et ayant une aire supérieur à 1% de l'aire du pic de l'échantillon du lait fortifié pour toutes les molécules d'antibiotiques analysées. La sélectivité de la méthode est garantie par le suivi d'une transition multi-reaction monitoring (MRM) par molécule en UPLC-MS-MS et le temps de rétention relatif.

La Capacité de détection CC $\beta$  correspond à la concentration au-delà de laquelle on peut conclure que la substance est détectée avec une certitude de 95%. 20 blancs de lait sont fortifiés à un seul niveau de concentration, soit à la 0.5 LMR. Ces extraits sont analysés sur un seul jour avec une solution des standards à 1LMR. Les critères d'identifications sont: Premièrement, le temps de rétention relatif (RRT) de l'échantillon suspect doit être dans un range de  $\pm 2.5\%$  autour du RRT de la solution des standards soit:  $0.75 * RRT < RRT < 1.025 * RRT$  par comparaison avec le RRT du standard. Deuxièmement, le rapport du signal/bruit (S/N) de l'ion fille doit être supérieur ou égale à 10. Troisièmement, la concentration pour fixer la limite de détection, à savoir 0.5 LMR doit avoir au-moins 95% de vrais positifs avec un S/N > 10.

Afin d'obtenir une courbe linéaire de calibration à 5 points; une gamme de 5 solutions des standards (tableau 11) est injectée en même temps avec les échantillons de lait extraits par les 4 différentes méthodes d'extraction (tableau 10). Ces solutions sont préparées en utilisant trois mélanges des standards d'antibiotiques à 1LMR avec un volume spécifique pour chaque concentration. Les mélange des (Macrolides - Tétracyclines) et (Sulfamides - Quinolones) sont déposés dans des fioles à UPLC d'injection. Puis, un volume spécifique pour chaque

concentration de la solution des standards internes est ajouté et les solutions intermédiaires obtenues sont évaporées à la sécheresse sous azote à 40°C. Les volumes spécifiques du mélange des Pénicillines et de l'eau MilliQ sont ajoutés pour obtenir des solutions finales à 300µL avec les concentrations de 250, 500, 1000, 1500 et 2000 µg/L respectivement. La linéarité est évaluée en vérifiant le coefficient de corrélation de tous les antibiotiques utilisés pour la validation et qui doit être autour de 0.99. Parallèlement, l'applicabilité de la présente méthode est évaluée en analysant les (194) échantillons de lait collectés.

**Tableau 11:** Concentrations des solutions des standards d'antibiotiques utilisées pour obtenir la courbe de calibration. (µg/L)

Etapes de préparation et solutions utilisées	Différents niveaux de concentrations				
	1/4 LMR	1/2LMR	1LMR	1.5LMR	2LMR
Macrolides-Tétracyclines (µL)	37.5	75	150	225	300
Sulfamides-Quinolones (µL)	37.5	75	150	225	300
standards internes (µL)	150	150	150	150	150
volume Intermédiaire (µL)	225	300	450	600	750
Pénicillines (µL)	37.5	75	150	225	300
Eau MilliQ (µL)	262.5	225	150	75	0
volume Final (µL)	300	300	300	300	300
Concentration Finale (µg/L)	250	500	1000	1500	2000

### 2.3.4. Extraction des échantillons de lait à analyser

Pour extraire les résidus d'antibiotiques de 194 échantillons de lait collectés en Algérie, nous avons utilisé la méthode 3 optimisée et validée en cours de l'étude. Avant de commencer les étapes de l'extraction, il faut tout d'abord s'assurer de la bonne décongélation de lait et son homogénéisation. Chaque série à analyser doit comporter un échantillon blanc réactif (BR), un échantillon blanc matrice (témoin négatif), un échantillon fortifié (témoin positif), une solution des standards à 1LMR (avec les autres concentrations de calibration), de l'eau et les échantillons du lait à analyser. Ces échantillons sont préparés comme suit :

-Standard à 1 LMR: Dans une fiole UPLC, prélever 150 µl de solution mixte à 1 MRL de (Tétracyclines + Macrolides) et (sulfamides+ quinolones) et 150 µl de la solution mixte des standards internes SI à 1 LMR, évaporer à sec sous azote et rajouter 150 µl de la solution mixte de pénicillines à 1LMR et 150 µl d'eau.

-Traitement du blanc réactif (BR): Suivre la procédure d'extraction du lait par méthode 3, en n'utilisant que les réactifs (pas de matrice).

-Traitement du blanc matrice: Préparer un échantillon négatif et lui faire suivre la procédure d'extraction du lait par méthode 3 sans addition des solutions mixtes des standards.

-Traitement de l'échantillon fortifié (½ LMR): Préparer un échantillon négatif et ajouter 250 µl de chaque solution mixte à 1 LMR (Tétracyclines + Macrolides), (sulfamides+ quinolones) et pénicillines et 500 µl de la solution mixte des standards internes à 1 LMR.

-Traitement de l'échantillon du lait à analyser : Préparer un échantillon et lui faire suivre la procédure d'extraction du lait par méthode 3 sans addition des solutions mixtes des standards.

### 2.3.5. Le dosage par UPLC/MS-MS

L'analyse par UPLC est réalisée en utilisant un Acquity sample et solvant manager (Waters, Milford, MA, USA). La séparation chromatographique est achevée en utilisant une colonne Acquity pour UPLC C18 2.1×100mm 1.7µ (Waters, Millford, MA, USA) à 30°C avec une phase mobile composée de 0.1 mM acide oxalique, 0.1% acide formique comme solution A et acétonitrile 0.1% acide formique comme solution B à un flux constant de 0.4mL min<sup>-1</sup>. Le programme du gradient d'élution utilisé est initialement de 98% de la solution A diminuant à 2% pendant 10.5 min (0 -10.5 min). Après, la composition est retournée aux niveaux initial A:

B (98 : 2) dans un temps de (10.5-12.5). Le temps de run total est de 12.5 min. Ainsi, qu'un triple quadripôle spectromètre de masse (XEVO TQ MS) est utilisé (Waters, Millford MA, les USA), opérant dans l'ionisation électrospray positive (ESI), le mode MS/MS est utilisé pour la détection. Les données sont contrôlées et évaluées par le logiciel MassLynx (la version 4.1). La réaction choisie contrôlant le mode (MRM) est utilisée et les paramètres suivants sont appliqués: capillarité, 3kV; cône 15 V; extracteur, 3.00V; source température, 150°C; température de désolvation, 500°C, flux de gaz de cône, 80Lh-1; flux de gaz à désolvation, 1000Lh-1; le flux de gaz de collision, 0.16 ml/min, la résolution (LM1, HM1, LM2, HM2 où LM est la basse masse et HM est la haute masse, 2.7, 15, 2.8, 14.8; énergie d'ion (1 et 2), 0.3, 0.6; multiplicateur 546.52V. Les paramètres de transition de spectrométrie de masse, de tension de cône (V), d'énergie de collision (eV) pour tous les résidus d'antibiotiques analysés dans les échantillons de lait sont présentés dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Les paramètres de la spectrométrie de Masse utilisés pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait

Analyte	Transition	Tension de Cone (V)	Energie de Collision (eV)
Amoxicilline	366 > 114	10	20
ampicilline	350 > 106.1	30	20
Chlorotétracycline	479.1 > 302.8	30	40
cloxacilline	436.24 > 160.	30	10
dicloxacilline	469.9 > 160.1	30	10
enrofloxacin	360.4 > 341.9	30	20
érythromycine	734.4 > 576.6	30	20
fluméquine	262.1 > 244	30	20
marbofloxacin	363.26 > 72	30	20
Nafcilline	415 > 199	30	10
neospyramycine	699.4 > 174.2	30	20
Oxytétracycline+4-epi-Oxytétracycline	461.1 > 443.1	30	10
oxacilline	402.2 > 243.3	15	10

Analyte	Transition	Tension de Cone (V)	Energie de Collision (eV)
pénicilline G	335.1 > 176.1	30	10
spiramycine	843.6 > 174.4	30	40
sulfacetamide	215.2 > 156	30	10
sulfachloropyridazine	285 > 155.8	25	15
sulfadiazine	251 > 108	30	20
sulfadiméthoxine	311.1 > 156	30	20
Sulfadimidine	279.2 > 155.9	30	20
Sulfadoxine	311.2 > 155.9	30	20
Sulfaguandine	215.1 > 156	25	15
Sulfamerazine	265.1 > 155.9	30	20
Sulfaméthizole	271.1 > 107.8	30	20
sulfaméthoxazole	254.1 > 108.1	30	20
sulfaméthoxypyridazine	281 > 155.7	30	15
Sulfamonométhoxine	281.2 > 155.9	30	20
Sulfamoxole	268.2 > 155.9	30	10
Sulfapyridine	250.1 > 184	30	20
Sulfaquinoxaline	301.2 > 107.7	30	20
Sulfathiazole	256.1 > 107.7	30	30
sulfisoxazole	268.1 > 156.2	30	10
Tétracycline+4-epi-tétracycline	445.1 > 410.1	30	20
tilmicosine	869.8 > 174.1	65	45
Tylosine	916.6 > 127.2	30	40
triméthoprime	291.3 > 230.3	60	20

(Suite tab 12)

Les conditions et les étapes d'analyse des extraits des échantillons par UPLC-MS/MS sont détaillées en dessous:

-Les appareils y compris le PC restent toujours sous tension

- Chargement de la liste d'échantillons et du projet

-Création d'une nouvelle liste d'échantillons à analyser

-**Installation de la colonne UPLC** : il faut placer la colonne C18 2.1×100mm 1.7μ spécifique aux multi- résidus d'antibiotiques.

-**Pompe binaire** : Installation des bouteilles contenant les composants de la phase mobile comme suit:

- vanne A1 : 0.1 mM acide oxalique (+ 0.1 % acide formique)

- vanne B1 : acétonitrile (+ 0.1 % acide formique)

- vanne A2 : eau/acétonitrile (90/10, v/v)

- vanne B2 : acétonitrile pur

-**Allumage de MS tune**: XEVO TQ MS triple quadripôle mass spectromètre est utilisé. Il faut s'assurer que le mode d'ionisation est bien en electrospray positif (ES+)

-**Purge des lignes** : les solutions A1 et B1 sont utilisées pour purger les lignes de toutes impuretés présentes dans le circuit pendant 5min.

- **Conditionnement de la colonne** :

Il faut s'assurer que la température de la colonne est de 30°C, fixer le débit à 0.4mL/min et les pourcentages des solutions A1 à 98% et B1 à 2% et faites lancer le conditionnement. Il faut attendre que la pression se stabilise (environ 10000 psi) et passer au démarrage de la séquence.

-**Démarrage d'une séquence** :

Avant de démarrer une séquence il faut s'assurer que tout est en ordre pour la liste qui fait l'objet d'une injection et les extraits des échantillons à analyser. En premier lieu il faut injecter deux fois la solution du standard d'antibiotique pour stabiliser les temps de rétention avant de lancer l'analyse et temps de run est de 12.5 min (tableau 13)



**Tableau 13:** programme du gradient d'éluion

Temps	A1%	B1%	Flux ml/min	Curve
0	98	2	0.4	
10	35	65	0.4	6
10.5	98	2	0.4	6

- **Rinçage** : A la fin de chaque analyse il faut mettre de l'eau pour rincer la colonne pendant 21 min.

-**Collecte et traitement des données** : les données sont contrôlées et évaluées par le logiciel MassLynx (version 4.1). Les chromatogrammes sont vérifiés et une réintégration des pics obtenus aux temps de rétention spécifiques pour toutes les molécules d'antibiotiques recherchées pour chaque échantillon analysé est réalisée.

### 2.3.6. L'évaluation de la stabilité des antibiotiques dans le lait

Comme le lait utilisé pour la production du lben est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation à une température ambiante pendant 24h à 48h selon la saison, nous avons essayé de chercher si les antibiotiques restent stables dans différentes conditions de conservation comme la durée et la température. Par conséquent, l'échantillon du lait utilisé comme matériel d'analyse est le même échantillon utilisé lors l'optimisation. Il est utilisé comme contrôle négatif (n=2), ou enrichi (n =3). L'enrichissement est fait à 0.5 LMR comme prescrit pour des matrices de viande (Commission Regulation, 1990) avec les mélanges des solutions standards d'antibiotiques des sulfamides, des pénicillines, des quinolones, des macrolides et des tétracyclines. Les échantillons sont extraits selon la méthode 3 et stockés à des températures de conservation différentes (4°C, 21 °C et -20°C) et testés à un temps différent (les jours 0, 2, 7, 30,60 et 90). L'analyse est exécutée utilisant LC-MS/MS. D'abord les valeurs initiales sont déterminées le premier jour d'extraction (le jour 0). Après cela, les échantillons stockés à 4 et à 21°C sont analysés le deuxième jour j2 et le septième jour j7 de stockage. 6 échantillons supplémentaires fortifiés et qui sont conservés à 21°C pendant 7 jours sont placé directement à -20°C et analysés après 1mois, 2 mois et 3 mois de conservation. Certaines de ces conditions de stockage ont surestimé le transport des échantillons de l'Algérie à la Belgique aussi bien que des pratiques possibles en Algérie. Ces données ont aussi servi pour l'évaluation de la stabilité des antibiotiques.

### 3. L'analyse Statistique

Afin de choisir la méthode d'extraction la plus appropriée; les méthodes analytiques sont comparées sur la base des rendements suffisants pour la détection et seulement pour les antibiotiques ayant des niveaux inférieurs de LMR dans le lait que dans la viande. Le dernier est défini comme le rapport de LMR dans le lait sur LMR dans la viande inférieur ou égal à 0.5. De plus, l'analyse statistique des résultats de rendement obtenus avec les quatre méthodes est exécutée appliquant le test ANOVA pondéré à deux facteurs avec répétition ( $n=2$ ) utilisant S-Plus 8.0 pour Linux (Tibco, Palo Alto, CA, les États-Unis). Le premier facteur est la méthode utilisée et le deuxième est le type d'antibiotique. En même temps, l'interaction entre ces deux facteurs est aussi étudiée. Comme cette dernière est significative, la comparaison entre les quatre méthodes est faite par chaque antibiotique et corrigée pour le test d'hypothèse simultané selon Sidak (1967).

Un modèle linéaire généralisé pour des données binomiales distribuées est convenable pour modeler la fréquence des résultats positifs de l'UPLC-MS/MS et Delvotest SP-NT utilisant le lien de logique. Ces résultats sont contrastés entre les différents types de lait rassemblés aux fermes et aux points de vente. Particulièrement le type de lait est considéré comme un facteur fixe, tandis que, la ferme et les points de vente sont des aléatoires. Aussi, la comparaison entre les différents types de lait est évaluée et les valeurs de P sont corrigées pour le test d'hypothèse simultané, selon Tukey. Pour des raisons de corrélation, les résultats des résidus examinés (sans LMR et non-autorisé) utilisant UPLC-MS/MS sont considérés comme positifs.

L'accord entre les deux tests est calculé utilisant kappa de Cohen et sa valeur de P associée. De plus, comme le Delvotest SP-NT manque de spécificité, une liste d'antibiotiques est mise contenant les résultats positifs de l'UPLC-MS/MS et ceux pour lesquels il y a plus de négatifs que positifs avec Delvotest SP-NT.

# **Chapitre IV : Résultats et discussion**

## 1. Résultats des questionnaires utilisés pour la collecte des données auprès des fermes et points de ventes :

### ➤ Fermes A et B

Le changement de la voie d'administration peut modifier la concentration d'antibiotique retrouvée dans le lait et la durée de son élimination. D'une manière générale, la voie mammaire entraîne une durée d'excrétion beaucoup plus longue que la voie intramusculaire pour un même produit et sa concentration dans le lait est beaucoup plus importante (Brouillet, 1994 ; Fabre et al., 2006). Cependant, les voies parentérales sont également sources de contamination du lait et ne doivent pas être négligées en raison des hautes doses habituellement utilisées (Labie, 1981). Sur terrain, les vétérinaires ou bien les praticiens des deux fermes possèdent des registres dans lesquelles tous traitements appliqués sur les vaches sont enregistrés. Les antibiotiques sont administrés aux vaches malades par deux voies principales, soit par injection intra- mammaire ou bien intramusculaire. Les familles d'antibiotiques les plus utilisées par les vétérinaires des deux fermes sont: Les pénicillines, les tétracyclines, les macrolides et les sulfamides dont le délai d'attente pour une livraison du lait après traitement varie de 2 à 7 jours (tableau 14).

**Tableau 14:** Exemple de la fiche de renseignement de certains prélèvements provenant des vaches traitées.

Numéros de vache	date de traitement	date de prélèvement	Durée d'attente	Voie de traitement	Antibiotiques utilisés	Nom de Ferme
06004	09/12/2013	16/12/2013	7jours	injection IM	Oxyspein (oxytétracycline)	B
06004	12/11/2013	20/11/2013	2jours	injection IM	Sulfaprim (sulfadiazine avec triméthoprime)	B
06004	21/11/2013	02/12/2013	7jours	injection IM	Oxytétracycline	B
14914	7 /11/2013	13/11/2013	7jours	injection IM	Terramycine	A

Selon l'enquête effectuée par Boultif, (2015) à Constantine, les antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites par voie intra-mammaire sont par ordre décroissant: les tétracyclines (55%), les bêta-lactamines (33%), les macrolides (9.67%) et enfin les sulfamides (3.22%). Ainsi, pour le traitement des mammites par voie générale, presque les mêmes molécules sont retrouvées: les bêta-lactamine (46.5%), les tétracyclines (26%), les macrolides (22.5%) et enfin les sulfamides (8.69 %). Effectivement, pour le traitement des pathologies respiratoires sont: les tétracyclines (44%), les bêta-lactamines (43,5 %), les macrolides (43%), les

céphalosporines (22%). En ce qui concerne le délai d'attente, tous les vétérinaires interrogés indiquent que les éleveurs ne respectent presque pas les délais d'attente préconisés, au cours des traitements antibiotiques instaurés.

➤ **Points de ventes**

La plupart des vendeurs ignorent les origines de leur lait. D'autres ont mentionné qu'il provient des éleveurs des vaches privés, des collecteurs de lait privés, des distributeurs des usines de lait (tel que usine SAFIA de Guelma et usine inconnue de Soukahras) et des fermes privées ou étatiques à Guelma.

## 2. Résultats de l'analyse de résidus d'antibiotiques par test d'inhibition microbiologique Delvotest SP-NT

### 2.1. Résultats des échantillons collectés des deux Fermes A et B

Parmi les 127 échantillons analysés, nous avons constaté que 34 échantillons ont été trouvés positifs à un pourcentage de (26.77%), 59 ont été trouvés négatifs à un pourcentage de (46.45%) et 34 ont été considérés comme douteux avec un pourcentage de (26.77%). Les résultats des différents types de lait analysés pour les deux fermes sont détaillés dans le tableau suivant (tableau 15).

**Tableau 15:** Les résultats obtenus avec Delvotest SP-NT pour chaque type de lait analysé collecté des deux fermes.

Fermes	Types de lait	Positifs	négatifs	douteux
Ferme A	Lait de vaches saines	8	7	13
	Lait de vaches traitées	6	2	0
	Lait de Tank	1	16	0
Ferme B	Lait de vaches saines	7	19	18
	Lait de vaches traitées	10	5	3
	Lait de Tank	2	10	0
Total		34	59	34
Pourcentage (%)		26.77	46.45	26.77

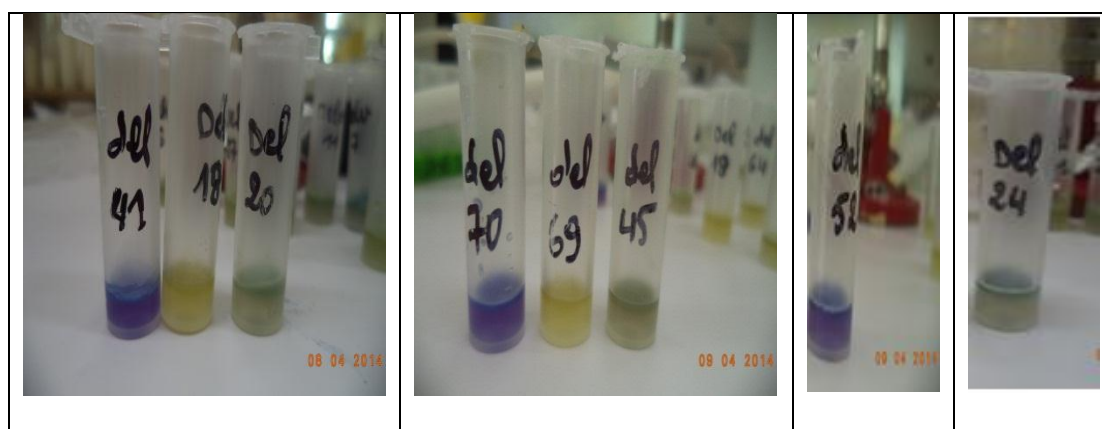
### 2.2. Résultats des échantillons collectés à partir des points de vente

L'analyse de 27 échantillons de lben et de lait de vache cru collectés à partir de plusieurs points de vente a révélé que 5 échantillons ont été trouvés positifs à un pourcentage de (18.51%), 21 ont été trouvés négatifs à un pourcentage de (77.77%) et qu'un seul échantillon a été considéré comme douteux avec un pourcentage de (3.70%) (tableau 16).

**Tableau 16:** Les résultats de Delvotest SP-NT obtenus pour les échantillons collectés des différents points de vente.

Points de vente	Lait de vache cru	Lait de vache fermenté (Iben)
Douteux	0	1
Négatif	10	11
Positif	2	3
Total	12	15

Après que l'échantillon de lait soit déposé sur la gélose des ampoules Delvotest SP-NT, une incubation est parcourue pendant 3h à  $64^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Durant l'incubation; le métabolisme microbien aboutira à un changement de pH et par conséquent un changement de la couleur violette en jaune. Donc, une ampoule jaune après l'incubation indique un échantillon négatif. En revanche, si l'échantillon contient suffisamment hautes concentrations de substances inhibitrices, la couleur reste pourpre indiquant un résultat positif (Stead et al., 2008). Lorsque la couleur est intermédiaire, le résultat est considéré douteux (figure 11).



**Figure 11:** Exemples des résultats positifs (mauve), négatifs (jaune) et douteux après analyse par Delvotest SP-NT

La fréquence des résultats positifs obtenus pour chaque type du lait testé par Delvotest SP-NT, est calculée en utilisant le test statistique « un modèle généralisé pour des données binomiales distribuées utilisant le lien de logit » ainsi qu'une comparaison entre ces résultats est effectuée selon Tukey. (tableau 17).

**Tableau 17:** Comparaison entre les résultats des différents types de lait analysés par Delvotest SP-NT.

	Lait de tank	Lait de vaches saines	Lait de vaches traitées	Lait de vache cru points de vente	Lait de vache fermenté points de vente (Lben)
Delvotest négatif	26	26	7	10	11
Delvotest douteux	0	31	3	0	1
Delvotest positif	3	15	16	2	3
% Delvotest positif	10.3 <sup>b</sup>	20.8 <sup>b</sup>	61.5 <sup>ac</sup>	16.7 <sup>bc</sup>	20 <sup>bc</sup>

Les groupes avec les mêmes lettres en haut ne diffèrent pas significativement au niveau de 0.05.

Parmi les 154 échantillons analysés dans cette étude, 39 ont été trouvés positifs à un pourcentage de 25.3% du total. A partir des résultats présentés dans le tableau ci-dessus, nous avons constaté que les niveaux les plus élevés de contamination par les résidus d'antibiotiques sont observés dans les échantillons du lait collectés à partir des vaches traitées (61.5%), suivi par le lait individuel des vaches saines et le lait du lben collecté auprès des points de vente. Tandis qu'une faible contamination a été marquée dans les échantillons de lait de vache cru (points de vente) et celui de tank. Par conséquent, une différence hautement significative a été notée avec ( $P < 0.01$ ) entre le groupe du lait de vaches traitées et ceux des vaches saines et de collecte (tank).

Le contrôle d'un grand nombre d'échantillons du lait pour la présence de résidus d'antibiotiques à des niveaux conformément à la législation communautaire exige le prix bas des méthodes d'analyse. En pratique, il est principalement exécuté utilisant des méthodes de dépistage microbiologiques, à cause de leur haute rentabilité comparée à la détection physico-chimique. En général, ces méthodes peuvent être utilisées: sans aucune formation spéciale, ne dépendent pas d'équipement spécialisé et ciblent un large spectre de résidus antimicrobiens dans une analyse à la fois (Pikkemaata et al., 2009).

Les tests les plus commercialisés et largement utilisés sont les tests d'inhibition microbiologique tels que Delvotest SP-NT, Copan Test, Charm Farm-960 Test et autres (Ramirez et al., 2003 ; Žvirdauskienė et Šalomskienė, 2007). Dans cette étude, Delvotest SP-NT a été utilisé pour l'évaluation de résidus d'antibiotiques dans des échantillons du lait



rassemblés à Guelma (Algérie). C'est un nouveau test qui a été développé sur la base du Delvotest SP et Delvotest Milk Control Stations (MCS) mais avec une incorporation précoce des nutriments dans l'agar. Ainsi, qu'il consiste en ampoules de gélose ou des microplaques contenant les spores de *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* et la substance nutritive. Lorsque le lait est déposé sur gélose et les ampoules sont incubées, les spores germent et produisent l'acide carbonique. Ce dernier force l'indicateur pourpre de bromocresol dans l'ampoule à changer la couleur de pourpre à jaune. En revanche, la présence d'agents antimicrobiens inhibe la croissance de bactéries et la couleur de la gélose dans l'ampoule reste pourpre. Ce test peut détecter une vaste gamme de substances antimicrobiennes à des niveaux de concentration différents (Le Breton et al., 2007).

Comme la limitation principale de ceci et d'autres essais microbiens semblables, le manque de spécificité est d'habitude assumée (Bilandzic et al., 2011). Particulièrement, pour une lecture visuelle de Delvotest SP-NT, des couleurs pourpres et jaunes sont faciles à déterminer. Cependant, une évaluation visuelle d'échantillons contenant des concentrations intermédiaires d'antibiotiques est plus difficile, même pour les techniciens expérimentés ce qui rend le jugement visuel de la réaction colorée comme dans Delvotest SP-NT subjectif (Suhren et Luitz, 1995; Stead et al., 2008). Dans tels échantillons, le test montre souvent un nuage de pourpre dans une couleur de jaune indiquant un résultat positif suspect. De plus, les différents types de lait et les différents modes d'action de composés antimicrobiens peuvent mener aux couleurs différentes dans le test, faisant l'interprétation plus difficile (Stead et al., 2008). À son tour, ceci rend Delvotest SP-NT moins approprié pour des analyses décisives laissant la place pour des résultats discutables. Une autre explication pourrait être que des réactions fausses positives avec Delvotest SP-NT peuvent arriver dans des échantillons de lait des vaches qui ont été récemment en vêlage en raison du fait que les inhibiteurs naturels et la traite incomplète pourraient être responsables de la réaction positive (Hillerton et al., 1998).

Peu d'études ont été exécutées en Algérie sur la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait. Hakem et al., (2012) n'ont trouvé aucune contamination dans le lait cru collecter de deux fermes laitières à Mitidja en utilisant Delvotest SP NT. Cependant, dans la présente étude, autour de 10% des échantillons de lait de tank et 20% des échantillons du lait de vaches non traitées ont été trouvés positifs. Ce dernier est plus haut que la fréquence de contamination à Alger (9.87%) indiqué par Ben Mahdi et Ouslimani, (2009). D'autres auteurs, Zinedine et al., (2007) au Maroc, Tarzaali et al., (2008) à Mitidja, Aggad et al., (2009) à l'ouest de l'Algérie et Titouche et al., (2013) à Tizi-Ouzu, ont rapporté des fréquences des échantillons du lait positifs plus supérieures (57%, 89%, 29% et 46%, respectivement). De même, les fréquences

(40%) et (50%) des échantillons positifs du lait de tank dans une étude en Serbie (Petrovic et al., 2008) et une autre au Bénin (Mensah et al., 2014b) successivement sont supérieures à la nôtre. Aussi, nos résultats obtenus pour le lait de vache cru des points de vente sont comparables avec ceux trouvés dans une étude en Iran (19.78%) (Aalipour et al., 2015). Néanmoins, notre niveau de contamination du lait de vache fermenté (lben) commercialisé est inférieur à celui atténué pour le lait du raib (50%) dans l'étude de Zinedine et al., (2007) au Maroc.

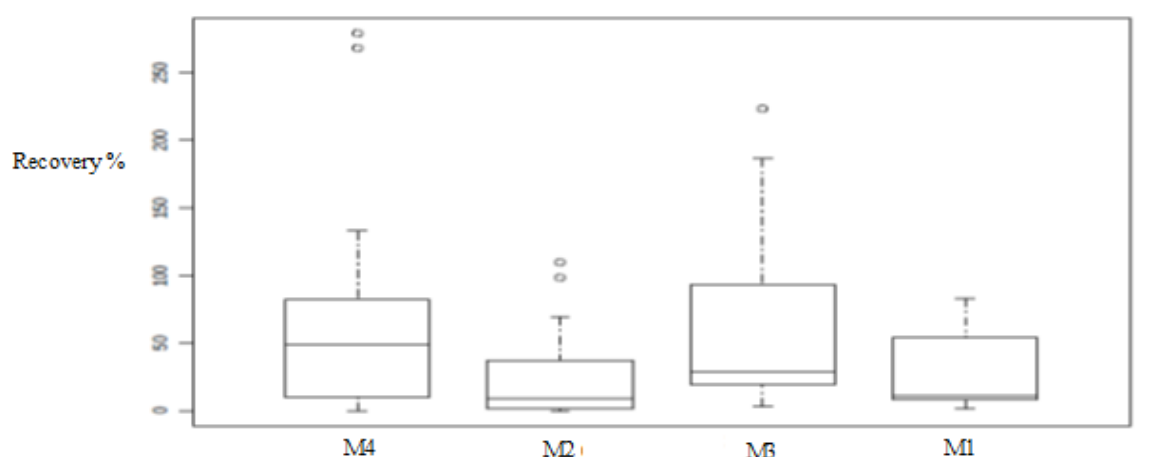
Comme, Delvotest SP-NT et les autres méthodes microbiologiques utilisées pour le premier dépistage de la présence de résidus d'antibiotiques ne donnent pas un résultat définitif sur l'identité et la quantité de l'antibiotique présent (Holstage et al., 2002 ; Appicciafuoco et al., 2015), cela rend ces méthodes moins spécifiques et exigent donc l'utilisation d'autres méthodes beaucoup plus complexes. L'une de ces techniques qui a été choisie est l'UPLC-MS/MS.

### 3. Résultats de l'analyse multi-résidus d'antibiotiques dans le lait par UPLC-MS/MS

#### 3.1. Résultats de l'optimisation et validation de la méthode d'extraction

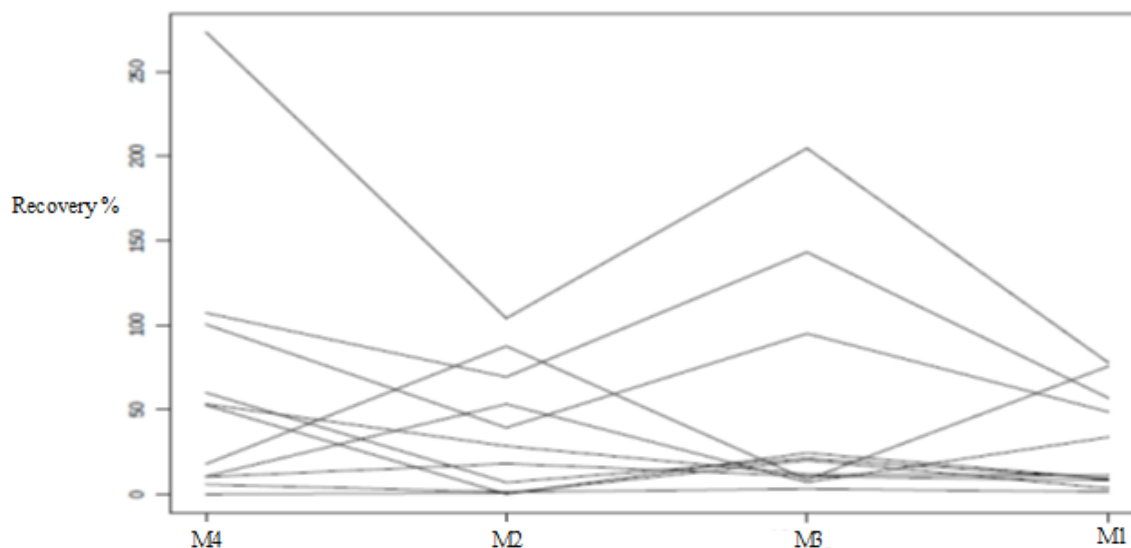
##### 3.1.1. Optimisation de la méthode d'extraction

La principale condition pour une méthode de détection fiable est de détecter les substances autorisées au-delà des limites LMR, et interdites à des niveaux de MRPL (la limite minimale requise de performance) en minimisant les résultats faux négatifs. Les méthodes doivent être spécifiques et sensibles assez pour détecter des niveaux bas, prenant en compte la complexité d'obtenir une bonne récupération de tous les composés avec des propriétés physicochimiques distinctes (Freitas et al., 2013). Selon la commission décision, (2002), le rendement (recovery en anglais) est l'un des exigences générales des méthodes analytiques. C'est pour cette raison et afin de sélectionner la meilleure méthode pour l'extraction des résidus d'antibiotiques dans le lait; les moyennes des rendements des quatre méthodes ont été comparées et une évaluation statistique des résultats a été utilisée. La comparaison avec ANOVA a été limitée aux antibiotiques (11 antibiotiques) qui ont une limite dans le lait inférieure à celle dans la viande (le rapport entre LMR est inférieur ou égale à 0.5). A partir de l'exploration graphique (figure 12), nous avons constaté que les deux méthodes M4 et M3 ont donné des rendements qui sont supérieurs aux autres méthodes M2 et M1. Par conséquent, il est important de contrôler si ces différences s'expriment pour tous les antibiotiques. Si c'est le cas, on peut comparer les méthodes par antibiotiques. Sinon, on doit se limiter à une comparaison entre les méthodes par chaque antibiotique.



**Figure 12:** Exploration graphique de rendement (recovery) par méthode, tous les antibiotiques confondus.

Les lignes dans le graphe ci-dessous (figure 13) connectent les moyennes qui correspondent à la même molécule d'antibiotique. Seulement si les lignes sont parallèles, il n'y a pas d'interaction.



**Figure 13:** Elaboration graphique de rendement par méthode et antibiotique

A partir du graphe nous avons constaté qu'il y'a une interaction, donc la comparaison entre les méthodes doit être faite par antibiotique. En plus, nous avons réalisé un test d'interaction en utilisant ANOVA pour une confirmation (tableau 18). Afin de réaliser l'analyse de deux facteurs, il y'a trois facteurs à considérer: les deux facteurs même (c'est-à-dire, antibiotique et méthode) en plus, l'interaction entre les deux facteurs. Si l'interaction est significative (c'est-à-dire, la valeur P est inférieure à 0.05), les valeurs P des facteurs principaux ne devraient pas être interprétés: il faut comparer les groupes d'un facteur par groupe de l'autre facteur.

**Tableau 18 :** Statistique de confirmation avec ANOVA

Facteur	Valeur P
Méthode	0
Antibiotique	0
Interaction entre méthode et antibiotique	0

Comme il y a eu des interactions hautement significatives entre les deux facteurs (méthodes et antibiotiques), les méthodes ont été comparées entre elles pour chacun des antibiotiques sélectionnés séparément (tableau 19). Parmi les résultats de comparaison obtenus, les différences majeures ont été observées entre deux groupes de méthodes. Particulièrement, parmi les 11 antibiotiques comparés, les rendements de 8 (méthode 1 contre méthode 4) et 7 (méthode 2 contre méthode 3) ont présenté une différence significative ( $p < 0.05$ ) (plus de détail est présenté dans l'annexe 01). Ce résultat peut être expliqué par les différences analytiques des méthodes. La méthode 3 a présenté des niveaux de rendement proches de 100% et plus supérieurs que ceux des autres méthodes. Dans un second lieu, les rendements les plus bas ont été comparés entre les méthodes pour confirmer que la méthode finale puisse détecter tous les antibiotiques sélectionnés. Nous avons noté que la méthode 3 a donné des niveaux supérieurs des rendements pour l'érythromycine et le nafcilline par rapport aux autres méthodes et les rendements des autres substances sont acceptables pour des raisons de dépistage (figure 14). C'est pour cette raison la méthode 3 est choisie comme la meilleure méthode d'extraction qui sera validée et utilisée au cours de cette étude.

**Tableau 19:** Tous les paramètres utilisés pour la comparaison entre quatre méthodes (M1, M2, M3 et M4) et la sélection finale de la méthode choisie.

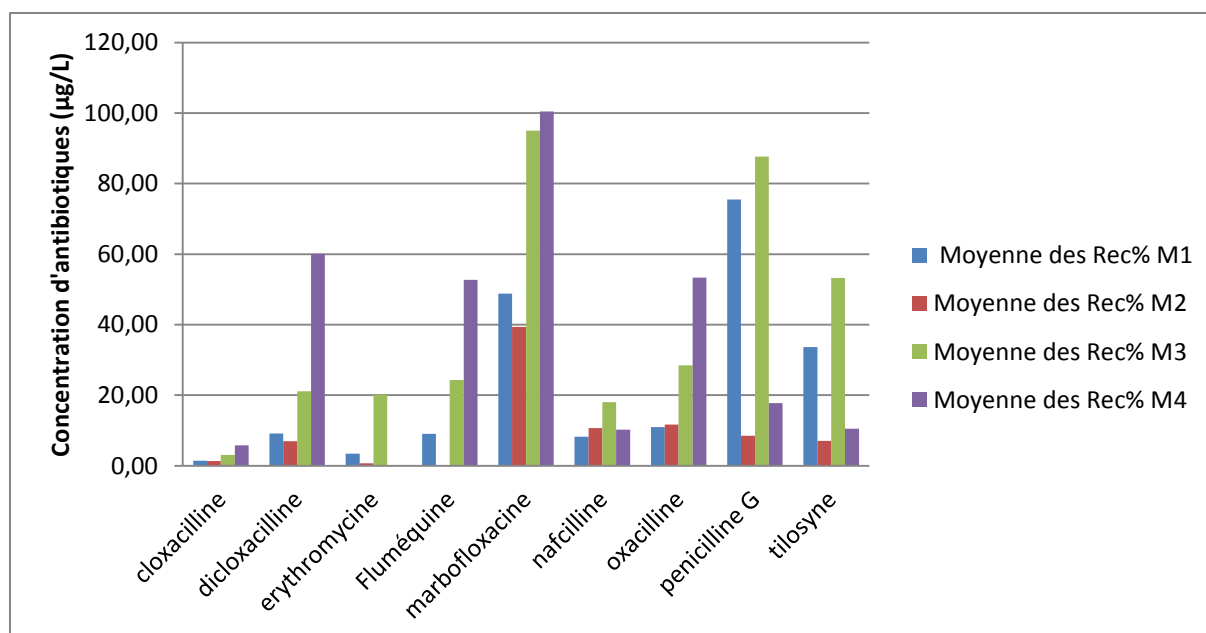
Groupe et type d'antibiotique	Concentration fortifiée (µg/L)	Moyenne Rec% ± STDEV M1	Moyenne Rec% ± STDEV M2	Moyenne Rec% ± STDEV M3	Moyenne Rec% ± STDEV M4	LMR lait (µg/L)	LMR viande (µg/L)	LMR lait/LMR viande
Macrolides		35,65 ± 2,72	24,50 ± 8,54	73,66 ± 8,33	79,20 ± 6,51			
Érythromycine	2000	3,40 <sup>ab</sup> ± 0,98	0,67 <sup>a</sup> ± 0,35	20,10 <sup>b</sup> ± 3,77	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	40	200	0,2
Neospyramycine	2500	18,78 ± 1,33	22,14 ± 1,10	70,31 ± 11,95	102,99 ± 3,17	200	200	1
Spiramycine	2500	25,96 ± 3,06	29,07 ± 1,18	53,17 ± 4,80	37,45 ± 2,02	200	200	1
Tilmicosine	500	96,42 ± 2,34	63,54 ± 39,90	171,49 ± 11,93	245,02 ± 27,02	50	50	1
Tylosine	1000	33,69 <sup>a</sup> ± 5,89	7,08 <sup>b</sup> ± 0,16	53,23 <sup>a</sup> ± 9,22	10,55 <sup>b</sup> ± 0,35	50	100	0,50
Pénicillines		34,36 ± 2,10	30,36 ± 1,87	72,33 ± 9,17	75,42 ± 7,91			
Amoxicilline	500	57,08 <sup>a</sup> ± 4,54	69,32 <sup>a</sup> ± 0,38	143,26 <sup>b</sup> ± 25,38	107,28 <sup>c</sup> ± 35,83	4	50	0,08
Ampicilline	500	78,19 <sup>a</sup> ± 7,09	104,03 <sup>a</sup> ± 7,99	204,73 <sup>b</sup> ± 26,17	273,58 <sup>c</sup> ± 7,65	4	50	0,08
Cloxacillin	30000	1,43 <sup>a</sup> ± 0,12	1,31 <sup>a</sup> ± 0,03	3,05 <sup>a</sup> ± 0,21	5,76 <sup>a</sup> ± 0,49	30	300	0,1
Dicloxacilline	3000	9,13 <sup>a</sup> ± 0,44	6,96 <sup>a</sup> ± 0,09	21,14 <sup>ab</sup> ± 2,80	60,03 <sup>b</sup> ± 5,54	30	300	0,1
Nafcilline	3000	8,23 <sup>a</sup> ± 0,20	10,69 <sup>a</sup> ± 0,12	18,07 <sup>a</sup> ± 0,39	10,23 <sup>a</sup> ± 0,31	30	300	0,1
Oxacilline	3000	10,99 <sup>a</sup> ± 0,86	11,72 <sup>a</sup> ± 0,27	28,44 <sup>ab</sup> ± 1,39	53,30 <sup>b</sup> ± 2,03	30	300	0,1
Pénicilline G	500	75,48 <sup>a</sup> ± 1,44	8,46 <sup>b</sup> ± 4,25	87,64 <sup>a</sup> ± 7,85	17,76 <sup>b</sup> ± 3,53	4	50	0,08
Quinolones		37,05 ± 2,20	26,58 ± 1,62	76,52 ± 1,74	83,07 ± 13,94			
Enrofloxacin	500	53,28 ± 3,60	40,40 ± 1,90	110,21 ± 1,22	95,99 ± 19,05	100	100	1
Fluméquine	1000	9,05 <sup>a</sup> ± 1,45	0,00 <sup>b</sup> ± 0,00	24,33 <sup>a</sup> ± 0,70	52,72 <sup>c</sup> ± 9,48	50	200	0,25
Marbofloxacin	750	48,80 <sup>a</sup> ± 1,55	39,32 <sup>a</sup> ± 2,94	95,02 <sup>b</sup> ± 3,29	100,49 <sup>b</sup> ± 13,30	75	150	0,5
Sulfamides		34,80 ± 1,32	29,49 ± 2,52	94,58 ± 6,43	99,73 ± 9,82			
Sulfacetamide	1000	18,54 ± 1,36	14,02 ± 1,57	35,42 ± 8,03	20,53 ± 2,80	100	100	1
Sulfachloropyridazine	1000	38,38 ± 0,48	26,78 ± 3,87	108,43 ± 0,11	132,90 ± 3,87	100	100	1
Sulfadiazine	1000	25,49 ± 2,58	24,09 ± 0,89	58,88 ± 0,63	65,94 ± 3,54	100	100	1
Sulfadiméthoxine	1000	14,31 ± 1,46	7,10 ± 0,40	41,56 ± 1,33	85,52 ± 2,47	100	100	1
Sulfadimidine	1000	39,33 ± 0,21	38,29 ± 1,55	114,46 ± 7,31	123,00 ± 9,00	100	100	1

Groupe et type d'antibiotique	Concentration fortifiée (µg/L)	Moyenne Rec% ± STDEV M1	Moyenne Rec% ± STDEV M2	Moyenne Rec% ± STDEV M3	Moyenne Rec% ± STDEV M4	LMR lait (µg/L)	LMR viande (µg/L)	LMR lait/LMR viande
Sulfadoxine	1000	30,31 ± 0,74	16,97 ± 2,60	82,33 ± 0,96	153,84 ± 1,11	100	100	1
Sulfaguanidine	1000	18,64 ± 0,12	14,25 ± 0,14	39,51 ± 7,71	26,60 ± 10,07	100	100	1
Sulfamerazine	1000	9,70 ± 1,57	7,65 ± 0,11	39,23 ± 1,08	89,31 ± 11,19	100	100	1
Sulfamethizole	1000	42,44 ± 0,80	55,31 ± 7,74	92,82 ± 1,55	84,97 ± 4,78	100	100	1
Sulfamethoxazole	1000	43,95 ± 6,02	18,70 ± 3,82	127,40 ± 4,92	161,97 ± 15,02	100	100	1
Sulfamethoxyridazine	1000	43,94 ± 0,02	51,72 ± 1,76	140,44 ± 5,21	165,70 ± 12,54	100	100	1
Sulfamonométhoxine	1000	42,22 ± 1,56	50,56 ± 0,46	148,67 ± 9,67	174,34 ± 7,26	100	100	1
Sulfamoxole	1000	38,61 ± 1,46	19,51 ± 2,34	80,30 ± 10,71	100,31 ± 23,38	100	100	1
Sulfapyridine	1000	29,02 ± 0,68	31,62 ± 2,64	89,32 ± 6,45	101,35 ± 18,40	100	100	1
Sulfaquinoxaline	1000	13,64 ± 0,32	10,28 ± 2,07	28,72 ± 5,89	79,34 ± 14,84	100	100	1
Sulfathiazole	1000	36,39 ± 1,95	39,05 ± 0,88	88,64 ± 5,73	41,14 ± 21,28	100	100	1
Sulfisoxazole	1000	55,57 ± 0,80	29,05 ± 2,59	168,29 ± 12,57	62,20 ± 4,43	100	100	1
Triméthoprim	1000	86,00 ± 1,57	75,98 ± 9,94	217,95 ± 25,88	126,27 ± 10,81	50	50	1
Tétracyclines		25,73 ± 0,54	21,89 ± 17,13	73,50 ± 12,79	52,61 ± 7,69			
Chlorotétracycline	1000	18,87 ± 0,49	21,77 ± 9,36	30,30 ± 6,29	35,67 ± 6,17	100	100	1
Oxytétracycline+ 4-Epi-Oxytétracycline	1000	32,79 ± 0,77	22,24 ± 23,07	108,49 ± 15,90	48,16 ± 2,89	100	100	1
Tétracycline+ 4-Epi-Tétracycline	1000	25,53 ± 0,36	21,67 ± 18,97	81,72 ± 16,19	74,02 ± 14,00	100	100	1

(suite tab 19) Une même lettre signifie que les groupes ne diffèrent pas significativement au niveau de 0.05.

STDEV: Standard Déviation, Rec: Rendement (Recovery).

\*La concentration estimée a été basée sur la courbe de calibration obtenue avec 5 différentes concentrations des standards (250, 500, 1000, 1500 and 2000 µg/L) après détection de l'ion de quantification dans le spectre SM. Quatre méthodes sont utilisées (n=2) et les échantillons contrôle du lait sont fortifiés à une concentration finale de 500 µg/L.



**Figure 14:** Diagramme présentant une comparaison entre les quatre méthodes pour les antibiotiques qui ont des rendements plus bas.

### 3.1.2. Validation de la méthode d'extraction

La validation de la méthode d'extraction optimisée est réalisée selon la directive Européenne (Commission Décision, 2002). La spécificité est définie par cette commission comme la capacité d'une méthode à discerner l'analyte mesuré d'autres substances. Cette caractéristique est essentiellement une fonction de la technique de mesure décrite, mais peut varier selon la classe du composé ou de la matrice. Les résultats obtenus (tableau 20) présentent qu'à l'exception de l'ampicilline, dicloxacilline, fluméquine, érythromycine, tylosine et sulfisoxazole pour lesquels un échantillon sur 20 a été caractérisé par l'apparition de pic aux temps de rétention des analytes résultant en 5% de faux positifs; aucun pic n'a été observé aux mêmes temps de rétention des autres antibiotiques vétérinaires cibles, indiquant qu'il n'y avait aucun signal faux induit par composé matriciel dans les échantillons (Han et al., 2015).

Il est cité dans la Décision (Commission Decision, 2002) que la capacité de détection ( $CC\beta$ ) est la plus petite teneur en substance pouvant être détectée, identifiée et/ou quantifiée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur  $\beta=5\%$ . Dans le cas des substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée, la capacité de détection est la concentration la plus faible à laquelle une méthode peut détecter des échantillons véritablement contaminés avec une certitude statistique de  $1 - \beta$ . Dans le cas des substances pour lesquelles une limite autorisée est fixée, cela signifie que la capacité de détection est la concentration à laquelle la méthode



peut détecter des concentrations à la limite autorisée avec une certitude statistique de  $1 - \beta$ . Ainsi, si la Concentration cible de détection est fixée à la moitié de la limite (par exemple à 1/2 MRL); l'apparition d'un seul échantillon faux négatif ou bien l'absence totale des résultats faux négatifs suite à l'analyse d'au moins 20 échantillons de contrôle est suffisant pour démontrer que  $CC\beta$  est moins que la LMR et inférieure ou égale à la 1/2 LMR (Community reference laboratories, 2010). Les résultats obtenus (tableau 20) ont montré que dans tous les 20 échantillons fortifiés à 0.5 LMR, aucun résultat faux négatif n'a été enregistré et la Capacité de détection  $CC\beta$  a été 50% de la LMR pour toutes les molécules d'antibiotiques analysés.

**Tableau 20:** limites Maximales des résidus (MRL\*),  $CC\beta$  et le nombre des échantillons analysés pour chaque antibiotique utilisé pour la validation de la méthode choisie.

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques	LMR lait ( $\mu\text{g/L}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g/L}$ )	Détection	
				$CC\beta$ échantillon fortifié	échantillon blanc
<b>Pénicilline</b>	Amoxicilline	4	2	20/20	20/20
	Pénicilline G	4	2	20/20	20/20
	Ampicilline	4	2	20/20	19/20
	Cloxacilline	30	15	20/20	20/20
	Dicloxacilline	30	15	20/20	19/20
	Nafcilline	30	15	20/20	20/20
	Oxacilline	30	15	20/20	20/20
<b>Quinolones</b>	Enrofloxacin	100	50	20/20	20/20
	Marbofloxacin	75	37.5	20/20	20/20
	Fluméquine	50	25	20/20	19/20
<b>Macrolides</b>	Erythromycine	40	20	20/20	19/20
	Spiramycine	200	100	20/20	20/20
	Tilmicosine	50	25	20/20	20/20
	Tylosine	50	25	20/20	19/20
	Neospiramycine	200	100	20/20	20/20

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques	LMR lait (µg/L)	CCβ (µg/L)	Détection	
				CCβ échantillon fortifié	échantillon blanc
<b>Tétracyclines</b>	Chlortétracycline	100	50	20/20	20/20
	Oxytétracycline+4-epi-Oxytétracycline	100	50	20/20	20/20
	Tétracycline+4-epi-Tétracycline	100	50	20/20	20/20
<b>Sulfamides</b>	Sulfadiazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfapyridine	100	50	20/20	20/20
	Sulfamethoxy pyridazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfadoxine	100	50	20/20	20/20
	Sulfadiméthoxine	100	50	20/20	20/20
	Sulfadimidine	100	50	20/20	20/20
	Sulfamonométhoxine	100	50	20/20	20/20
	Sulfamoxole	100	50	20/20	20/20
	Sulfaquinoxaline	100	50	20/20	20/20
	Sulfachloropyridazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfathiazole	100	50	20/20	20/20
	Sulfamerazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfaméthoxazole	100	50	20/20	20/20
	Sulfacetamide	100	50	20/20	20/20
	Sulfisoxazole	100	50	20/20	19/20
	Triméthoprime	50	25	20/20	20/20
	Sulfaguanidine	100	50	20/20	20/20
	Sulfaméthizole	100	50	20/20	20/20

\* LMR (EU 37/2010) (suite tab 20)

Une courbe linéaire de calibration a été obtenue à partir des cinq concentrations utilisées. La droite de régression est établie pour les surfaces du pic en fonction des concentrations des dilutions correspondantes. Le coefficient de corrélation  $r^2$  a été  $\geq 0.80$  pour toutes les substances d'antibiotiques analysées (annexe 02). L'applicabilité de cette méthode a été satisfaisante pour l'analyse de cent quatre-vingt-quatorze (194) échantillons de lait collectés à Guelma. Parmi lesquels, 127 échantillons ont été trouvés positifs vis-à-vis la présence de résidus d'antibiotiques. Les résultats obtenus seront présentés dans la partie résultats de l'analyse des échantillons.

### 3.2. Résultats de l'analyse des échantillons de lait collectés par UPLC-MS/MS

127 ont été trouvés positifs à un pourcentage de (65.5%) (tableau 21). À partir de l'analyse statistique des résultats avec « un modèle généralisé pour des données binomiales distribuées utilisant le lien de logit », nous remarquons que les fréquences les plus élevées des résultats positifs ont été obtenues pour le lait collecté auprès des points de vente. Dont, chaque échantillon collecté de lait cru est contaminé suivi par le lait fermenté. Ainsi, les échantillons collectés auprès des fermes ont également présenté des pourcentages élevés de contamination citons successivement : le lait de vaches traitées, le lait de vaches saines et le lait de tank.

**Tableau 21** : Comparaison des résultats obtenus par UPLC-MS/MS entre les différents types de lait analysés

	UPLC-MS/MS conform	UPLC-MS/MS non conform	% UPLC-MS/MS positifs
Lait de collecte	16	19	54 <sup>a</sup>
Lait de vaches saines	41	58	59 <sup>a</sup>
Lait de vaches traitées	7	15	68 <sup>a</sup>
Lait de vache cru points de vente	0	18	100 <sup>a</sup>
Lait de vache fermenté (lben) points de vente	3	17	85 <sup>a</sup>

Groupe avec une même lettre près du pourcentage ne diffèrent pas significativement au niveau de 0.05.

Cette méthode nous a rapporté un nombre important d'échantillons positifs et les résultats obtenus ont révélé qu'un seul échantillon de lait puisse contenir un résidu d'antibiotique ou plus (tableau 22). L'UPLC-MS/MS semble être une méthode très importante lorsqu'elle nous a permis de déceler non seulement la présence de résidus d'antibiotiques à des niveaux supérieurs ou beaucoup plus supérieurs à la LMR, mais aussi la présence des molécules

interdites d'utilisation chez les animaux produisant du lait destiné à la consommation humaine selon la commission Européenne (Commission Regulation, 2010).

**Tableau22** : Nombre des échantillons de lait positifs par antibiotique analysé.

Groupe et type d'antibiotique	LMR* dans lait (µg/L)	L COL	LVS	LVT	LVC D	LVFD
Macrolides						
Erythromycine	40	0	0	1	0	0
Neospyramycine	200	0	0	0	0	0
Spiramycine	200	0	0	1	0	0
Tilmicosine	50	2	3	2	7	3
Tylosine	50	0	0	1	0	0
Josamycine	ND	0	2	1	0	1
Tulathromycine	Interdit	0	0	1	0	0
Tylvalosine	ND	0	0	1	6	2
Pénicillines						
Amoxicilline	4	6	15	6	11	13
Ampicilline	4	5	22	0	3	0
Cloxacilline	30	0	0	0	0	0
Dicloxacilline	30	0	0	0	0	0
Nafcilline	30	0	0	0	1	0
Oxacilline	30	1	1	0	5	0
Pénicilline G	4	0	2	0	1	0
Quinolones						
Enrofloxacin	100	0	0	0	1	0
Fluméquine	50	0	0	0	0	0
Marbofloxacin	75	0	0	0	0	0
Danofloxacin	30	4	9	5	0	0
Acide oxolinique	Interdit	0	0	0	0	1
Difloxacin	Interdit	0	0	0	0	0
Sulfamides						
Sulfacetamide	100	0	0	0	0	0
Sulfachloropyridazine	100	0	1	0	0	0
Sulfadiazine	100	1	15	4	0	0
Sulfadiméthoxine	100	0	0	0	0	0
Sulfadimidine	100	0	0	0	0	0
Sulfadoxine	100	0	0	0	0	0
Sulfaguanidine	100	0	1	0	0	0
Sulfamerazine	100	0	0	0	0	2

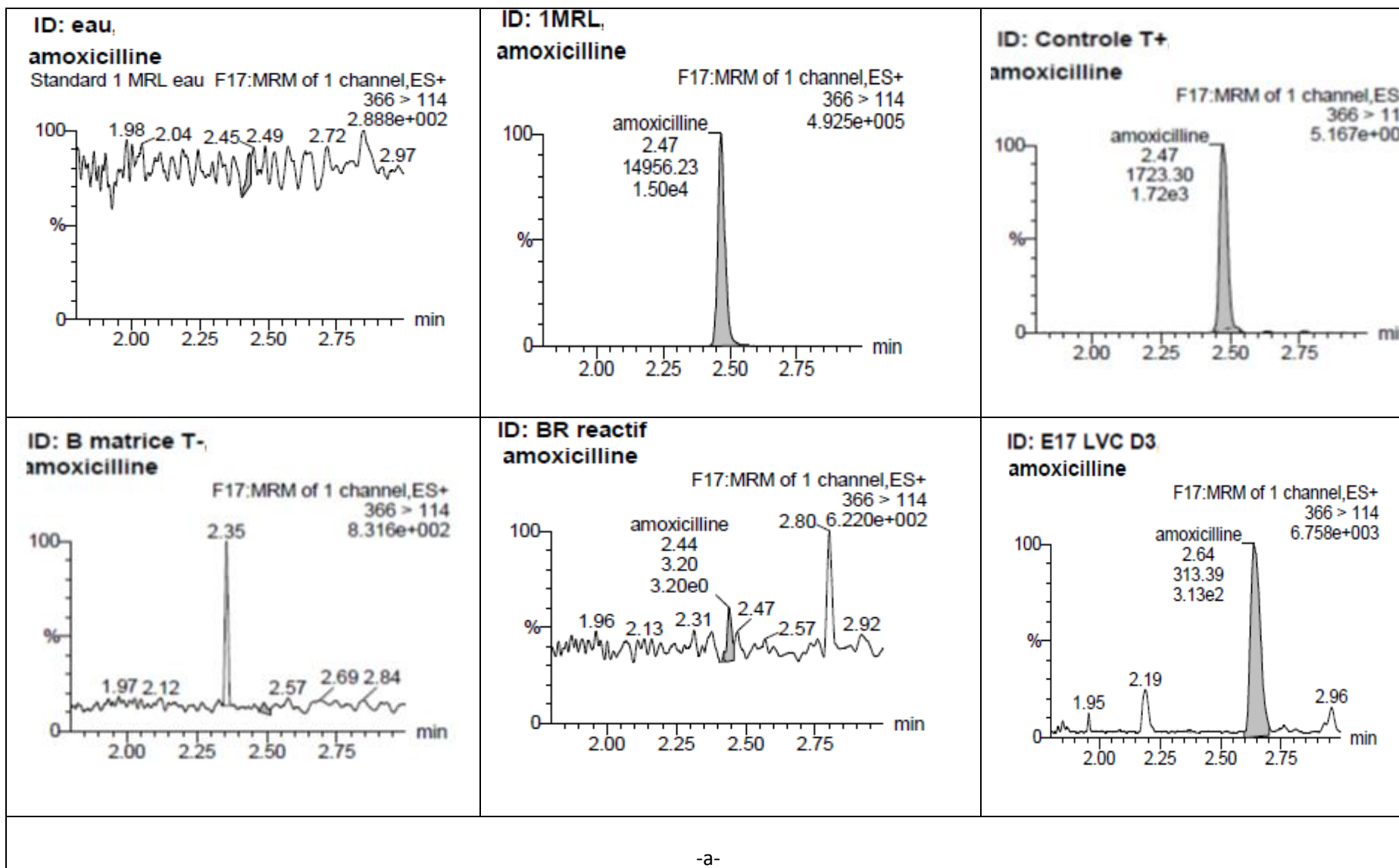
Groupe et type d'antibiotique	LMR* dans lait ( $\mu\text{g/L}$ )	L COL	LVS	LVT	LVC D	LVFD
Sulfamethizole	100	0	0	0	0	1
Sulfamethoxazole	100	0	0	0	0	0
Sulfamethoxy-pyridazine	100	0	0	0	0	0
Sulfamonométhoxine	100	0	0	0	0	0
Sulfamoxole	100	0	0	0	1	2
Sulfapyridine	100	0	0	0	0	0
Sulfaquinoxaline	100	0	0	0	0	0
Sulfathiazole	100	0	2	0	0	0
Sulfisoxazole	100	0	0	0	0	0
Triméthoprim	50	3	7	5	6	2
Tétracyclines						
Chlortétracycline	100	0	0	0	0	0
Oxytétracycline+ 4-Epi-Oxytétracycline	100	5	7	3	6	11
Tétracycline+ 4-Epi-Tétracycline	100	0	0	0	0	0
Doxycycline	Interdit	0	0	0	2	0

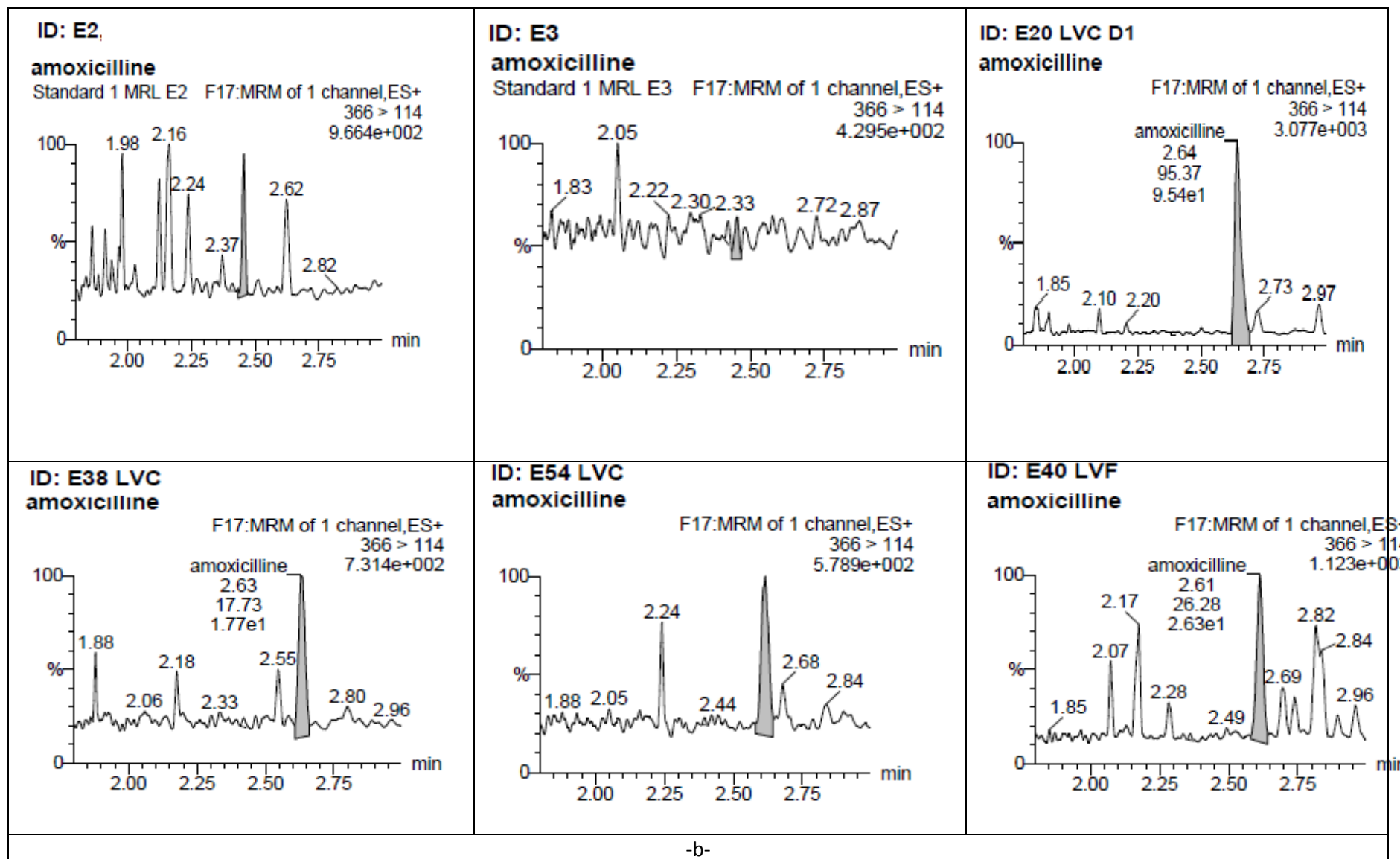
(Suite tab 22) \* LMR (EU 37/2010)

Abréviations : LCOL Lait de collecte (tank) ; LVS Lait de Vache Saine ; LVT Lait de vache Traitée ; LVC D Lait de Vache Cru Distributeur (point de vente) et LVFD Lait de Vache Fermenté Distributeur (point de vente).  
ND : Non définie.

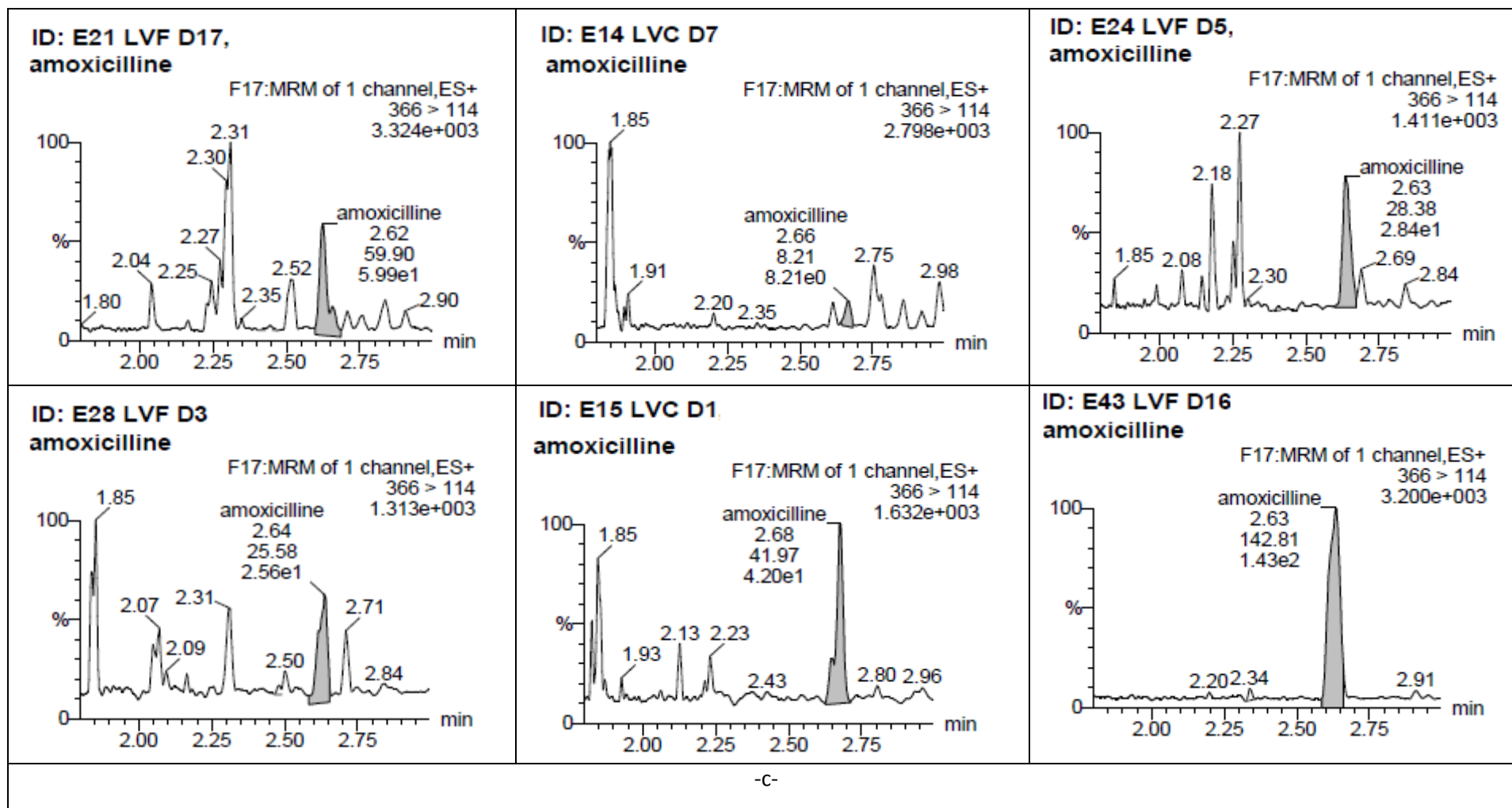
Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne, ce mélange doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injectés se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leur vitesse de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Chaque soluté est alors soumis à une force de rétention, exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité, due à la phase mobile. Ces composés séparés vont subir une ionisation (ESI) et une collision est induite dans le spectromètre de masse pour obtenir une fragmentation caractéristique de l'ion sélectionné. Un détecteur placé à la sortie couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé, il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic. Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance.

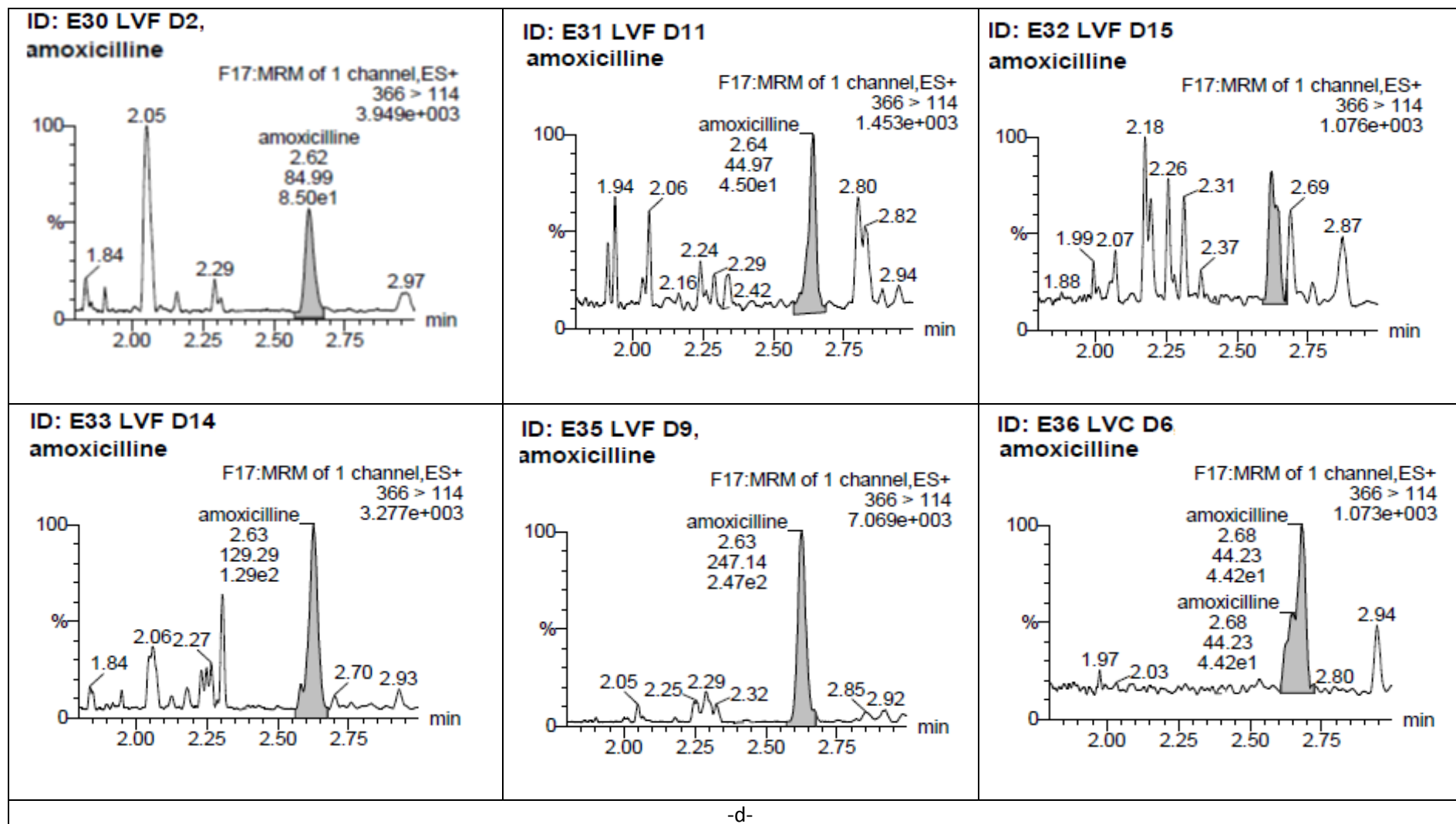
L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté (Boultif, 2015). A partir des résultats obtenus (tableau 22) pour les échantillons des différents types de lait analysés, nous avons constaté que les pénicillines sont les antibiotiques les plus détectés, suivis par les sulfamides, les macrolides, les tétracyclines et les quinolones respectivement. Les figures ci-dessous (15, 16, 17, 18, 19) regroupent des exemples des chromatogrammes de l'eau, de la solution des standards à 1LMR, du blanc réactif, du témoin positif, témoin négatif, et des échantillons trouvés positifs pour un seul antibiotique possédant de LMR par chaque famille. Les mêmes chromatogrammes sont présentés pour l'antibiotique représentant des antibiotiques qui ne possèdent pas de LMR (figure 20) et ceux des trois antibiotiques interdits (figure 21). L'antibiotique choisi est celui présent dans un grand nombre d'échantillons. L'eau milli-Q est utilisée au début et à la fin de chaque série d'analyse pour s'assurer de l'élimination de toutes traces et impuretés des analyses ultérieures qui persistent dans la tuyauterie de l'UPLC-MS/MS et pour éviter la survenue d'artéfacts sur les chromatogrammes. Ainsi, la solution des standards à 1LMR est injectée au début, au milieu et à la fin de chaque analyse pour fixer les temps de rétention des antibiotiques présents et confirmer le bon fonctionnement de l'appareil. Le chromatogramme du témoin positif identifie l'échantillon de lait fortifié (T+) à 0.5 LMR. On observe la présence d'un pic qui permet d'identifier la molécule recherchée au temps de rétention spécifique pour chaque antibiotique analysé. Le temps de rétention est considéré ainsi comme le seul point d'identification caractéristique de la molécule (Boultif, 2015). Contrairement, dans le chromatogramme d'un lait exempt d'antibiotique (T-), aucun pic n'est décelé au temps de rétention sur le profil chromatographique. Pour les échantillons E, l'interprétation de leurs résultats est basée sur 5 critères (Commission decision, 2002) qui sont : Le rapport signal/bruit (S/N) de la transition ionique est supérieur à 10, La différence chromatographique du temps de rétention relatif (RRT) est autour 2.5% du temps de rétention relatif du même pic de l'échantillon de lait fortifié, l'aire de l'échantillon analysé est supérieure à celle de l'échantillon fortifié et la concentration de l'échantillon analysé est supérieure à la LMR et au niveau de détection (LOD) autrement dit la concentration du témoin négatif. Pour les antibiotiques qui ne possèdent pas de LMR ou bien ceux que se sont interdits, la valeur de LMR est fixée à zéro. À l'origine, 194 échantillons de lait ont été testés pour 43 résidus d'antibiotiques différents (tableau 22). Nous avons considéré un échantillon de lait confirmé positif si un de ces antibiotiques est trouvé à une concentration au-dessus de la LMR ou bien à la LOD pour ceux qui sont interdits ou qui ne possèdent pas de LMR (CMV, 2015).



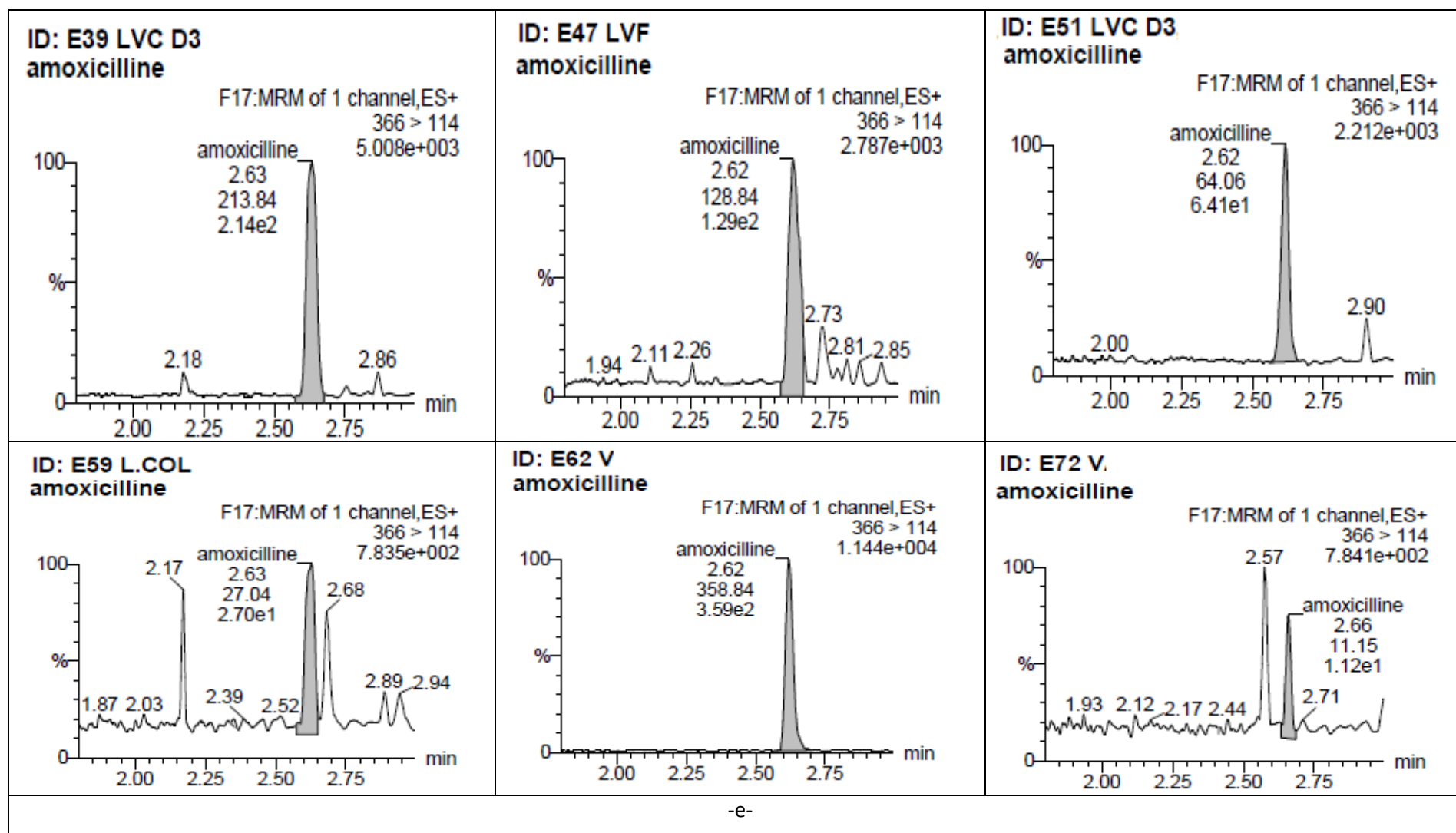


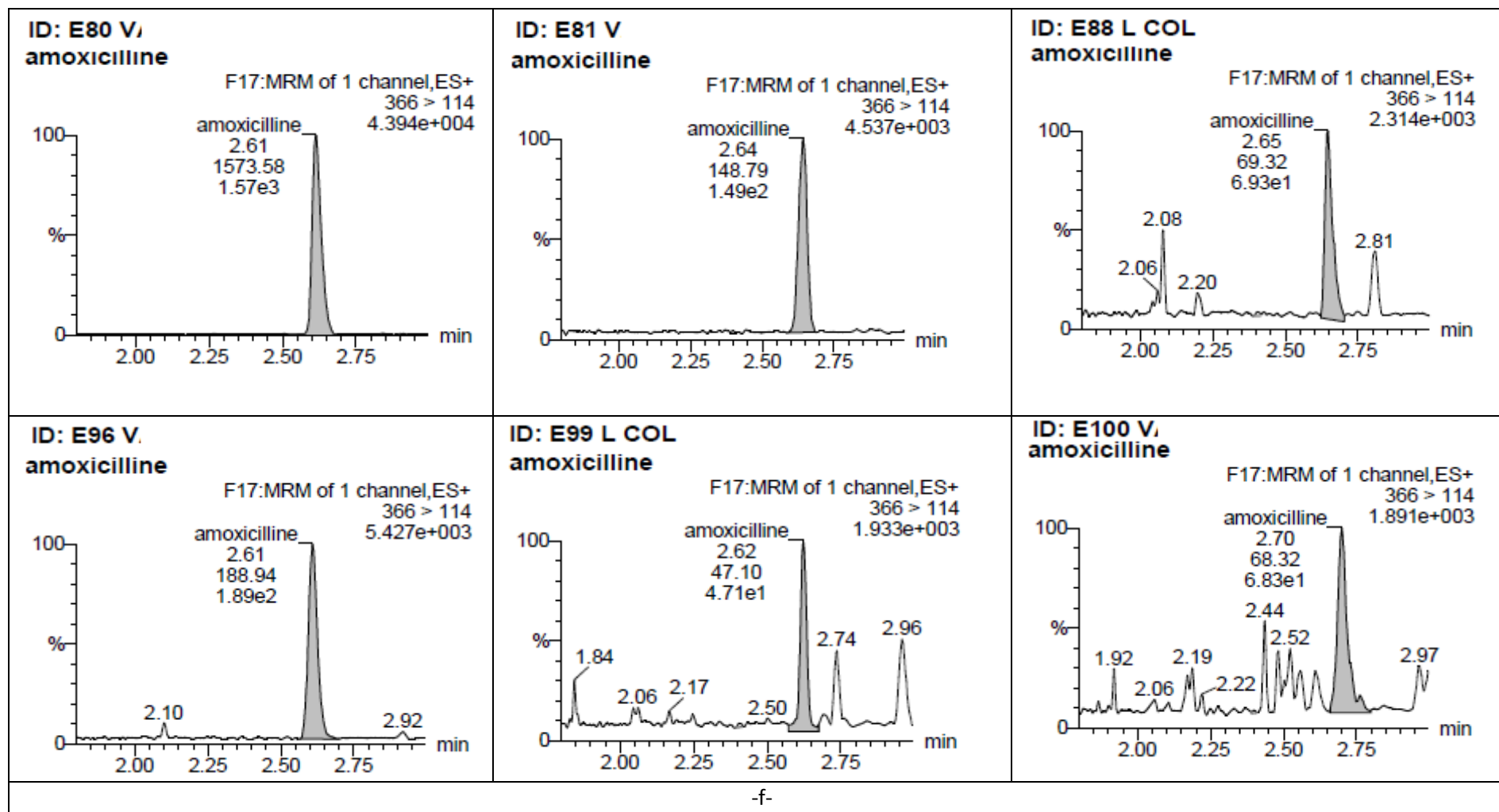


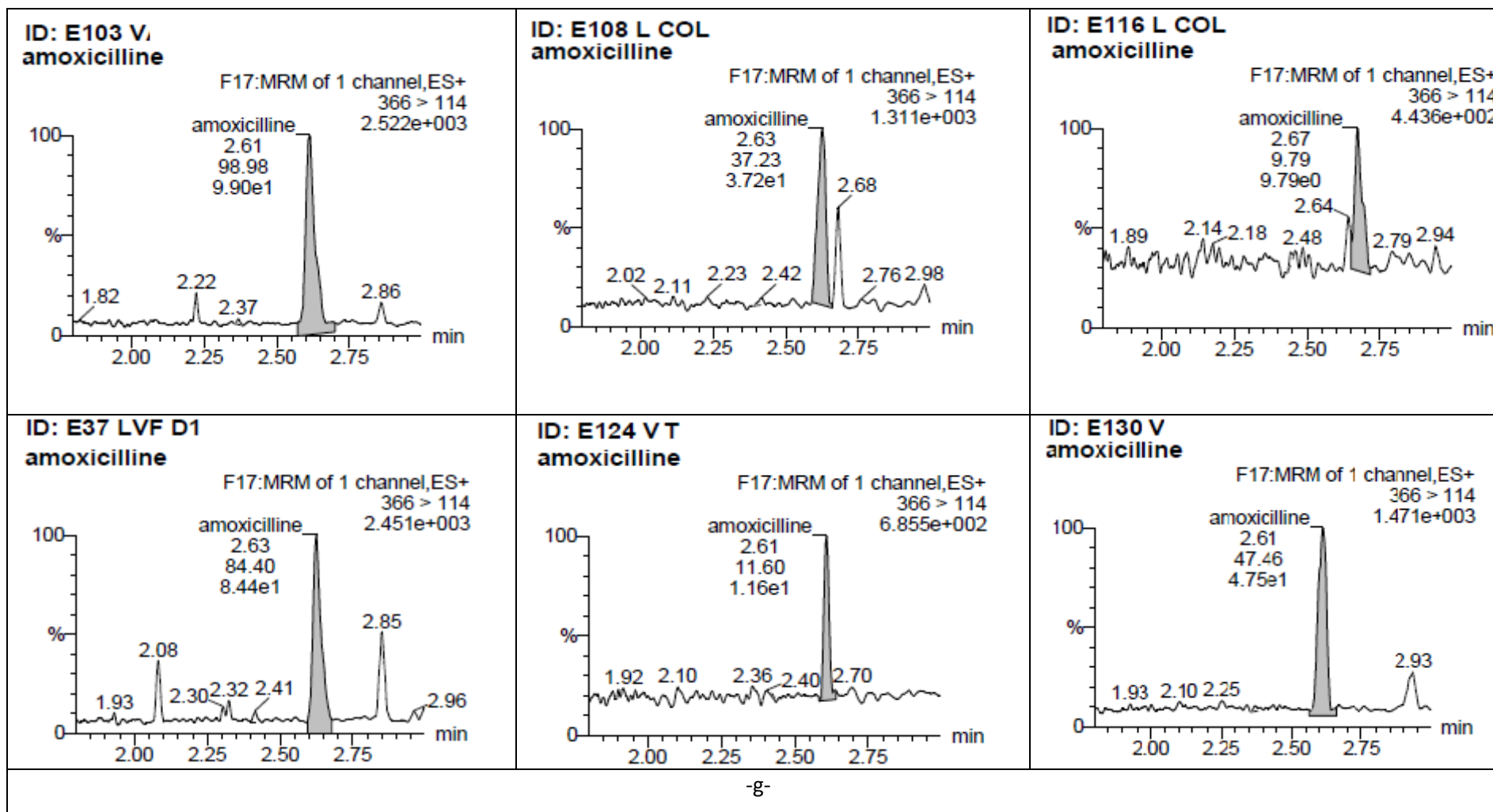


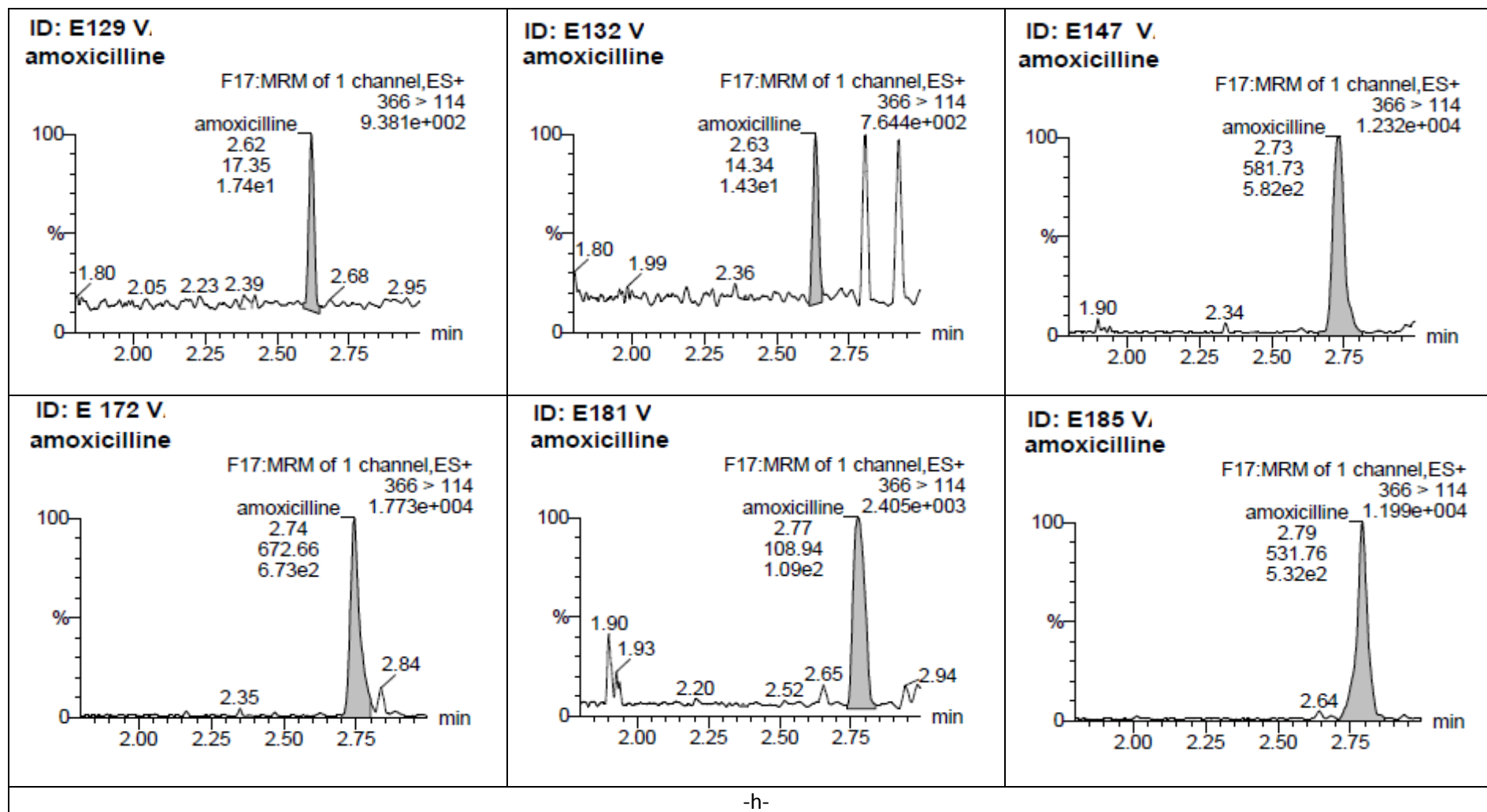


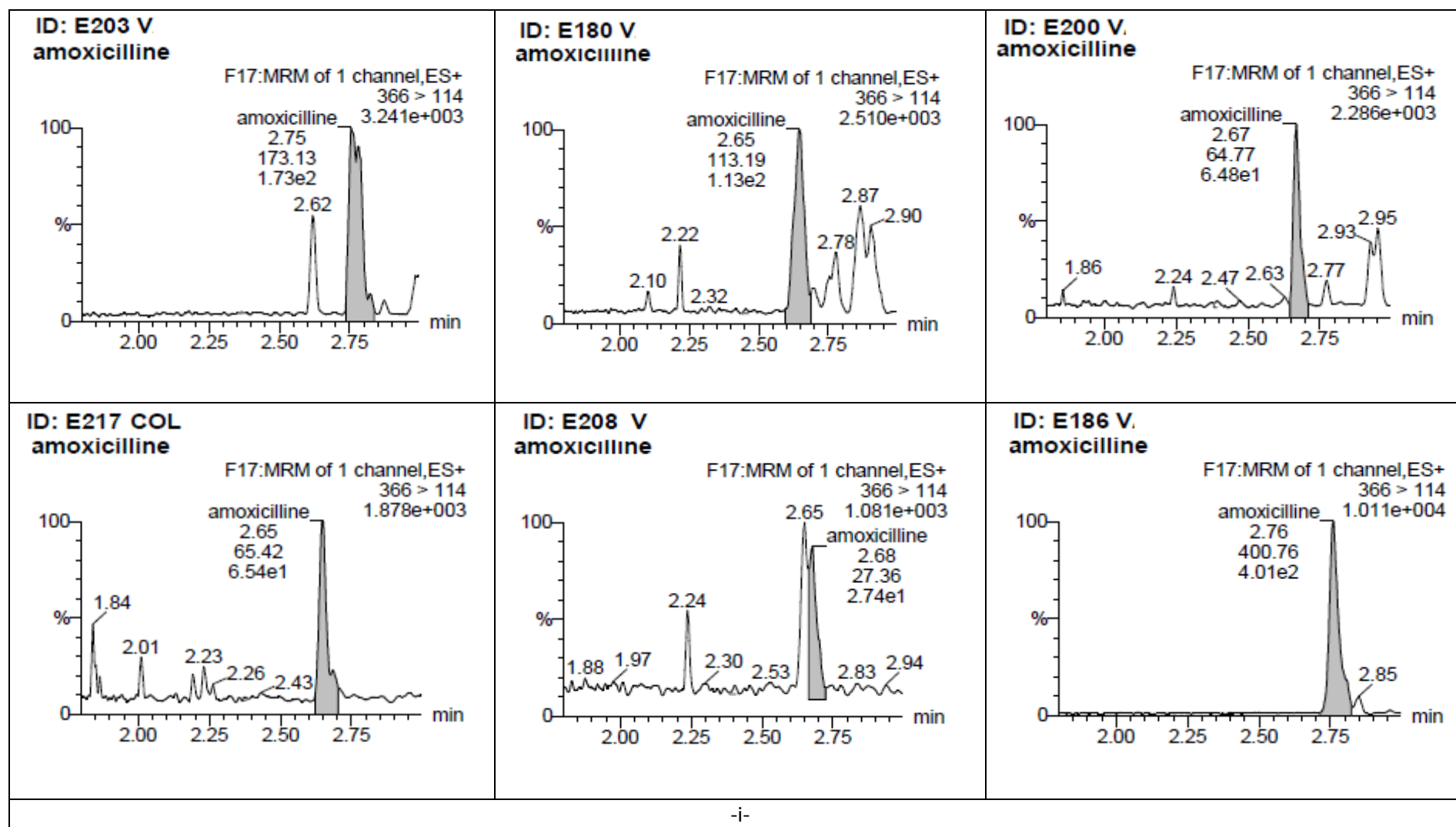
-d-

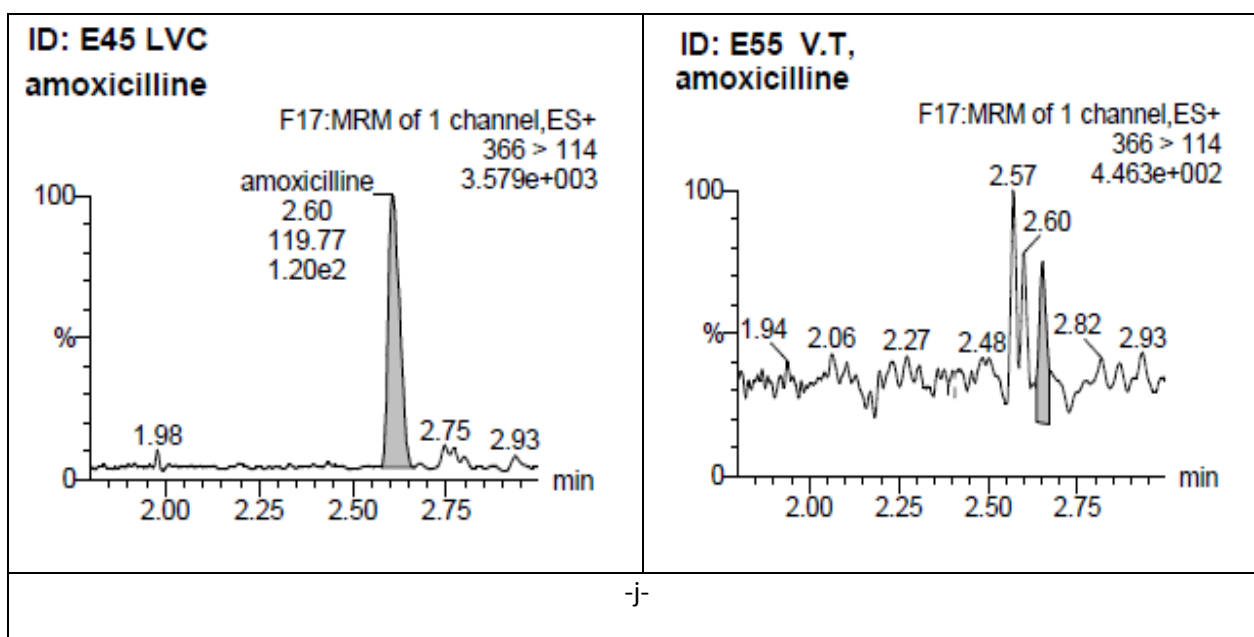








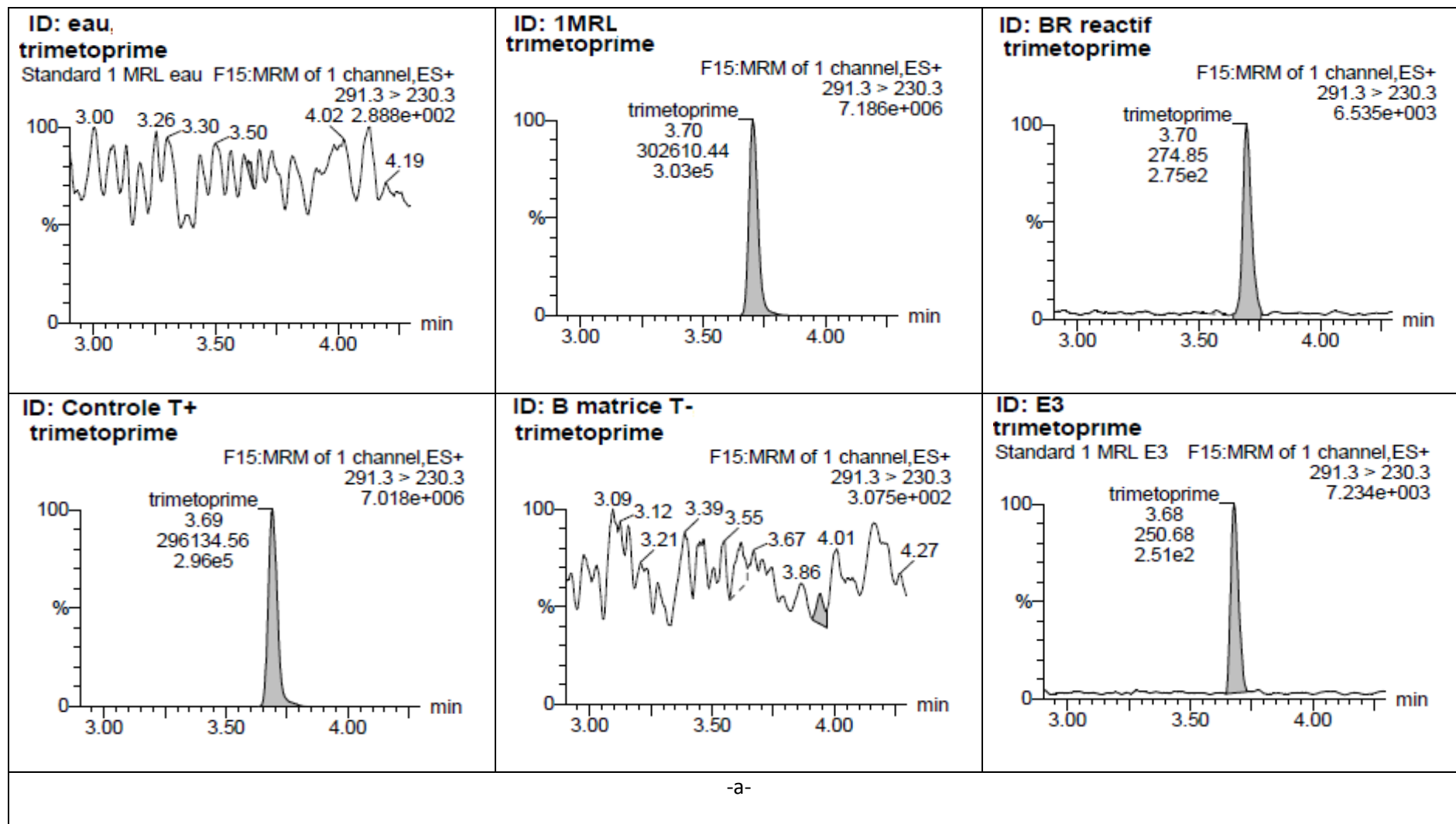


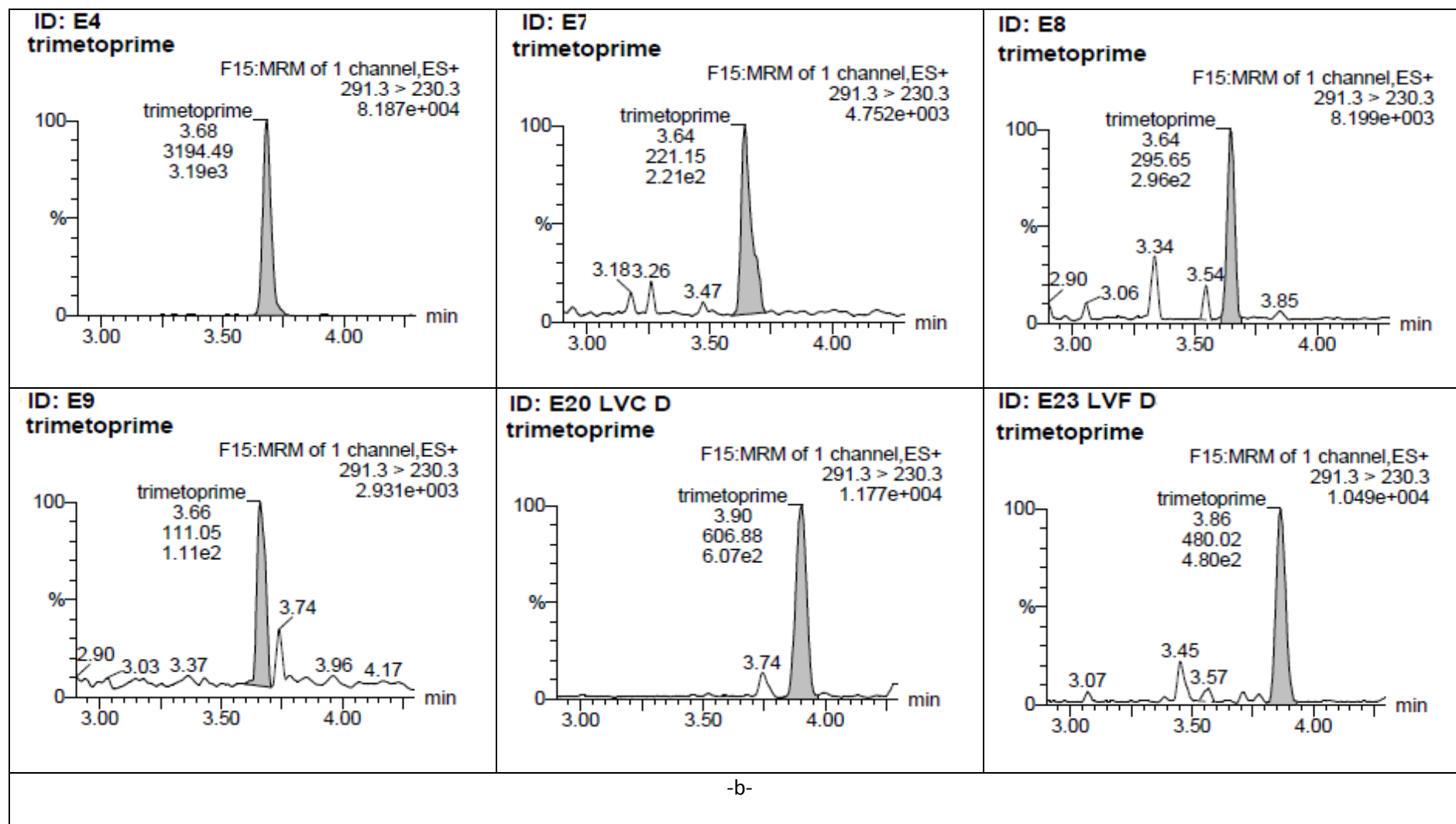


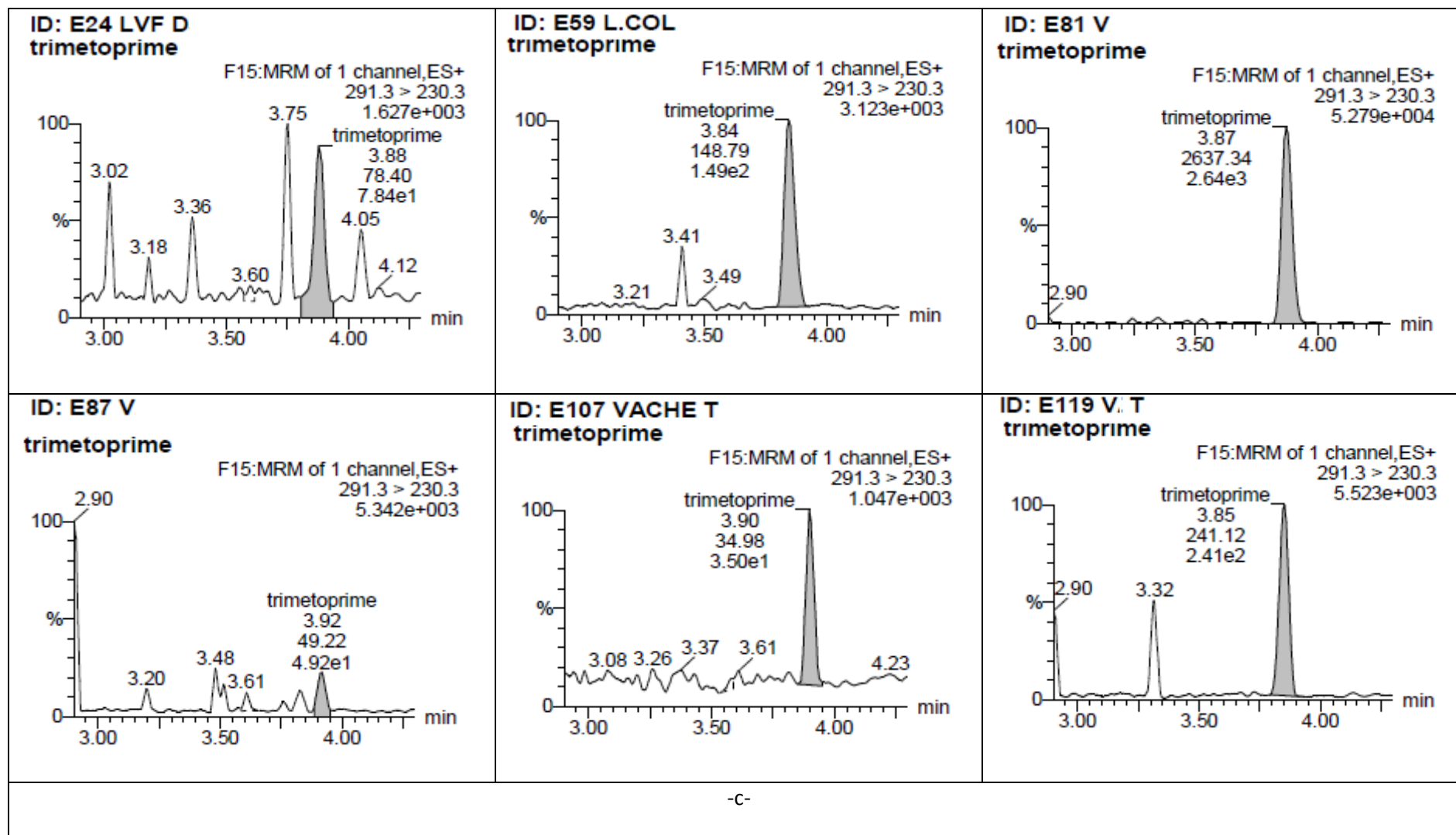
**Figure 15** : Chromatogrammes –a, b, c, d, e, f, g, h, i, j- des résultats obtenus de l'eau, de la solution ILMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et des échantillons trouvés positifs (E) pour l'amoxicilline représentant des pénicillines.

Les résultats obtenus par cette étude ont confirmé que les pénicillines (figure 15) sont le principal groupe d'antibiotiques détecté dans les échantillons de lait. Ceci reflète l'utilisation fréquente de médicaments chimiothérapeutiques pour le traitement et la prévention des maladies spécifiques dans le bétail laitier et l'utilisation des infusions intra-mammaire contenant les bêta-lactames pour le traitement des mammites (Petrovic et al., 2008 ; Rama et al., 2016). 47,42% des échantillons analysés ont été détectés positifs à cette famille d'antibiotiques. Nos résultats sont confirmés par ceux rapportés par Ben-Mahdi et Ouslimani, (2009) à Alger et Titouche et al., (2013) à Tizi-Ouzu ; qui ont utilisé des méthodes microbiologiques pour la détection des résidus d'antibiotiques et déclarent que les résidus de pénicilline et/ou tétracyclines étaient à l'origine de la contamination de 97.33 % et de 88.75% des échantillons de lait positifs successivement. Au Kosovo, Rama et al., (2016) ont trouvé que les bêta-lactames ont été détectés à un pourcentage de 30.18% des échantillons analysés. Au Pakistan, Khaskheli et al., (2008) ont trouvé à l'aide d'une méthode microbiologique qualitative avec *Bacillus subtilis* que 36.5% des échantillons de lait de vache cru sur marché sont contaminés par les bêta-lactames. Tandis que, Pogurschi et al., (2015) en Roumanie ont trouvé que les bêta-lactames ont été détectés seulement à un pourcentage de 18.18% sur un total de 66 échantillons analysés positifs.

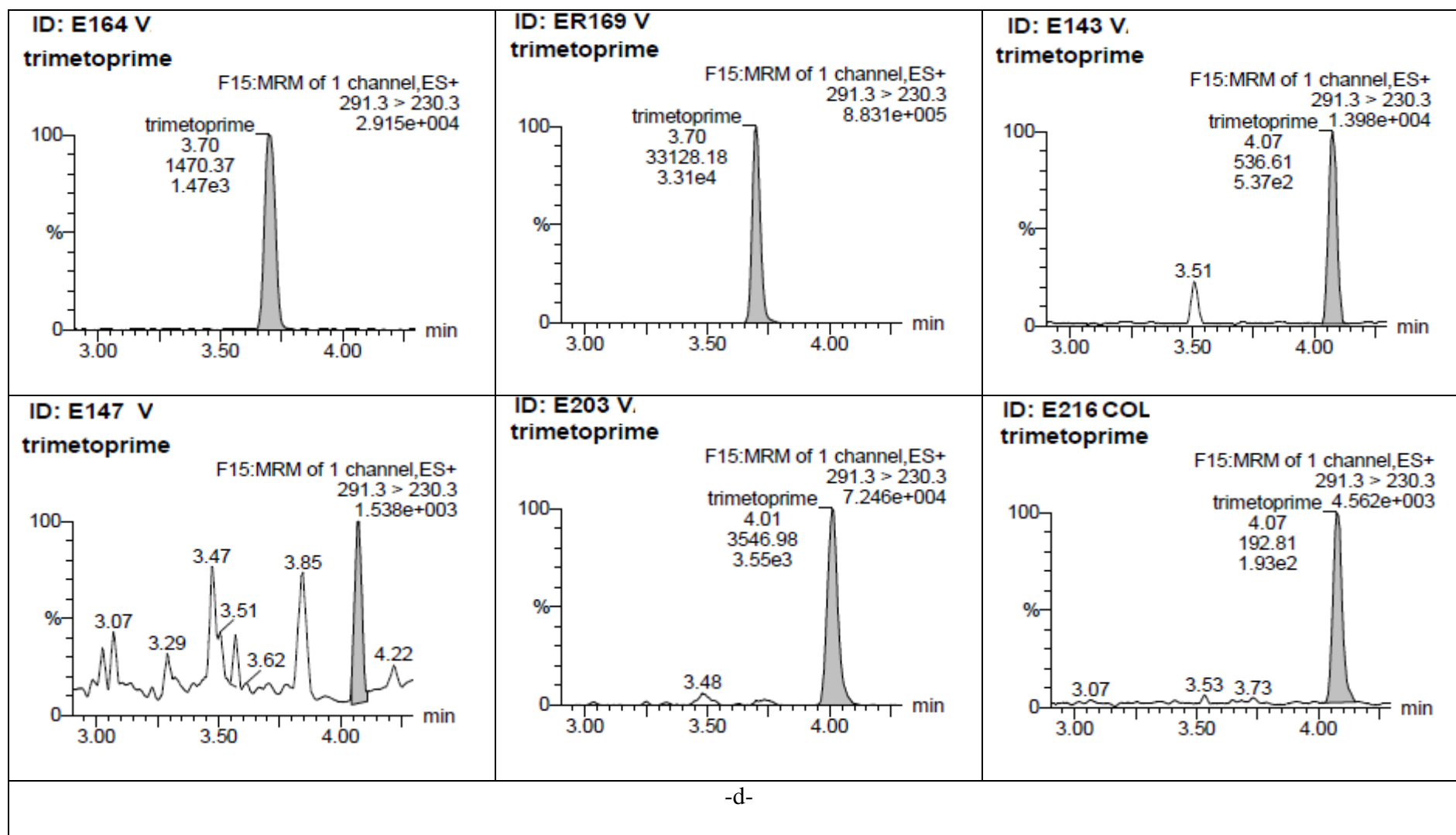


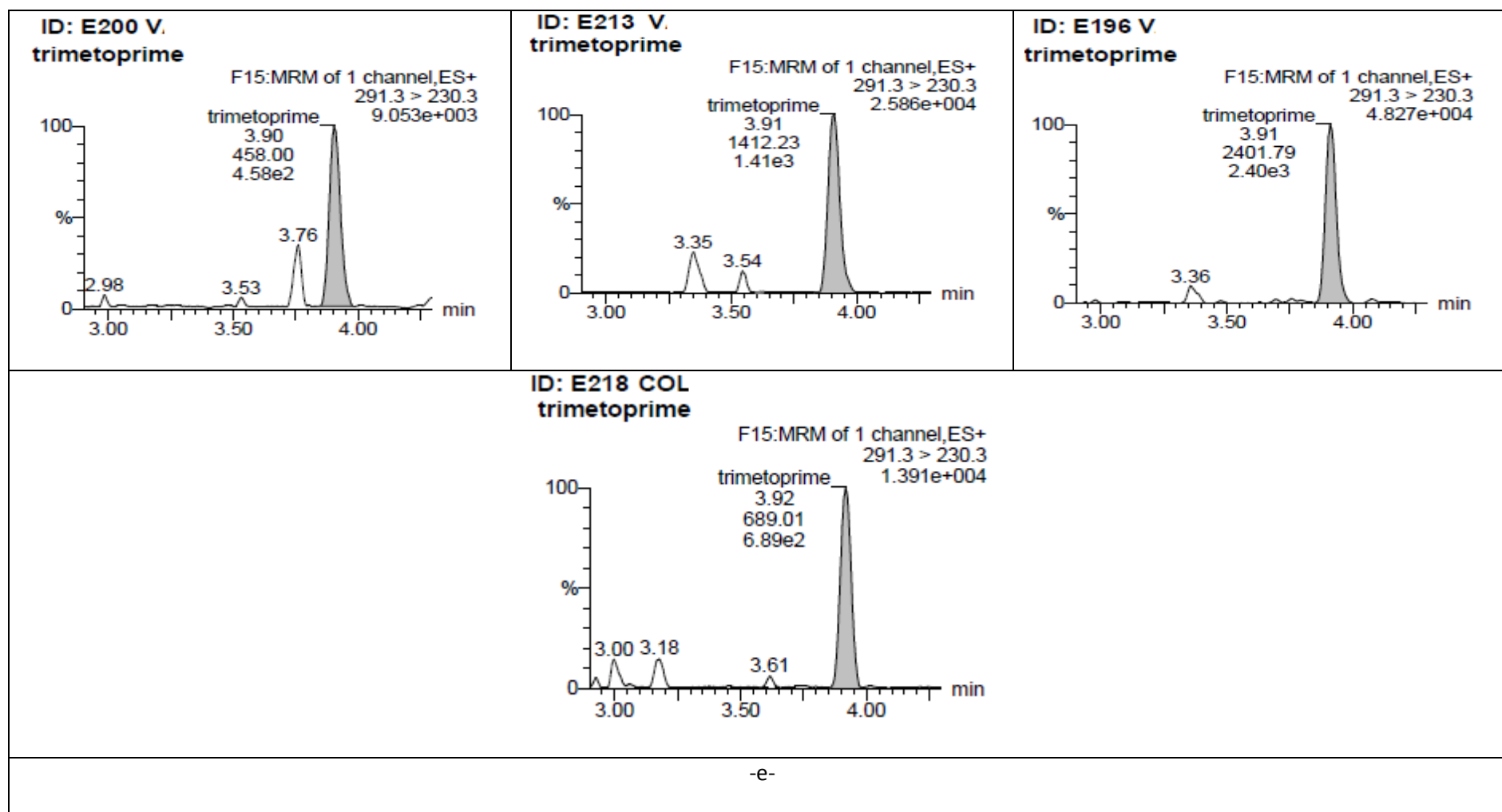






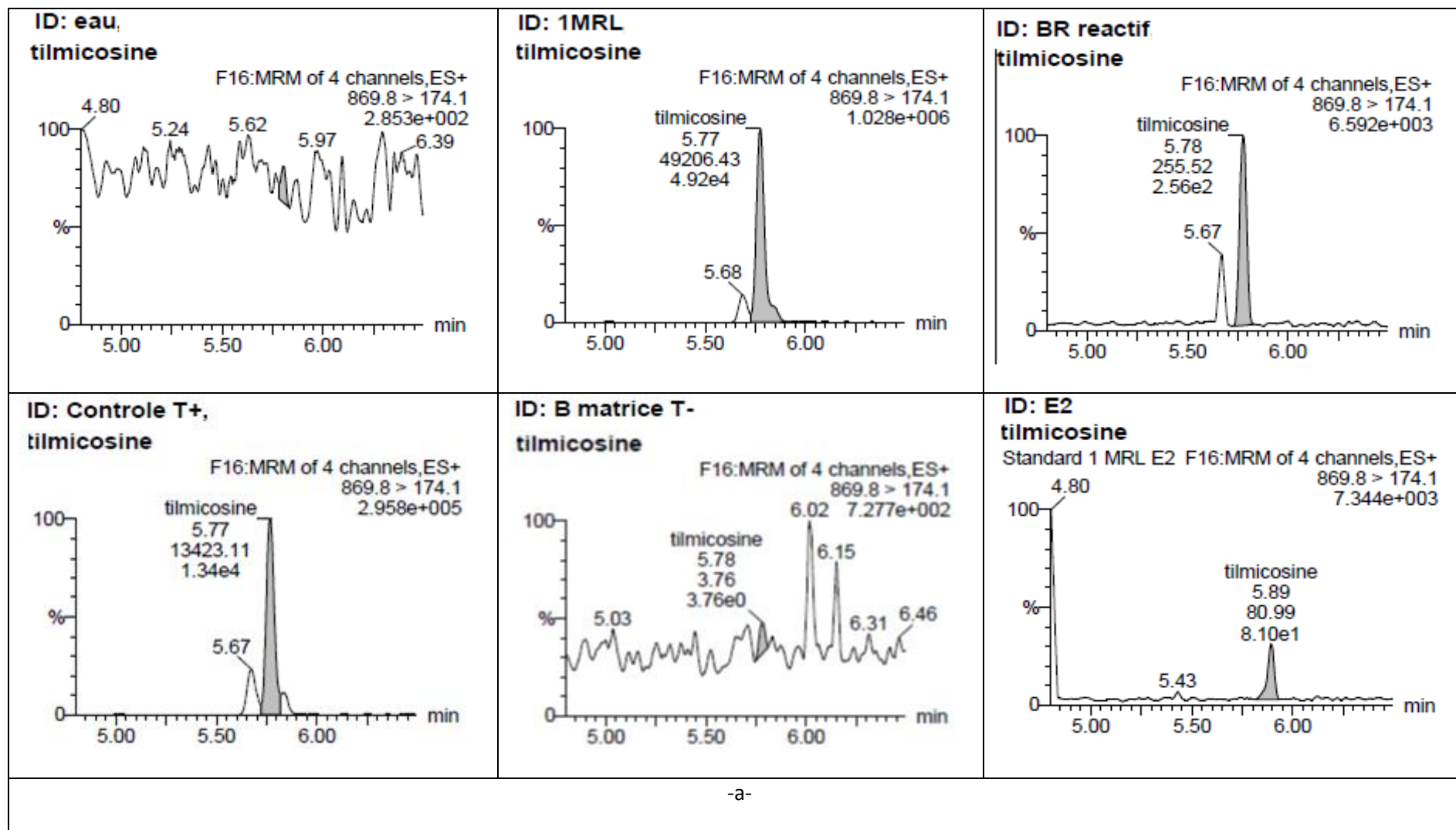
-C-

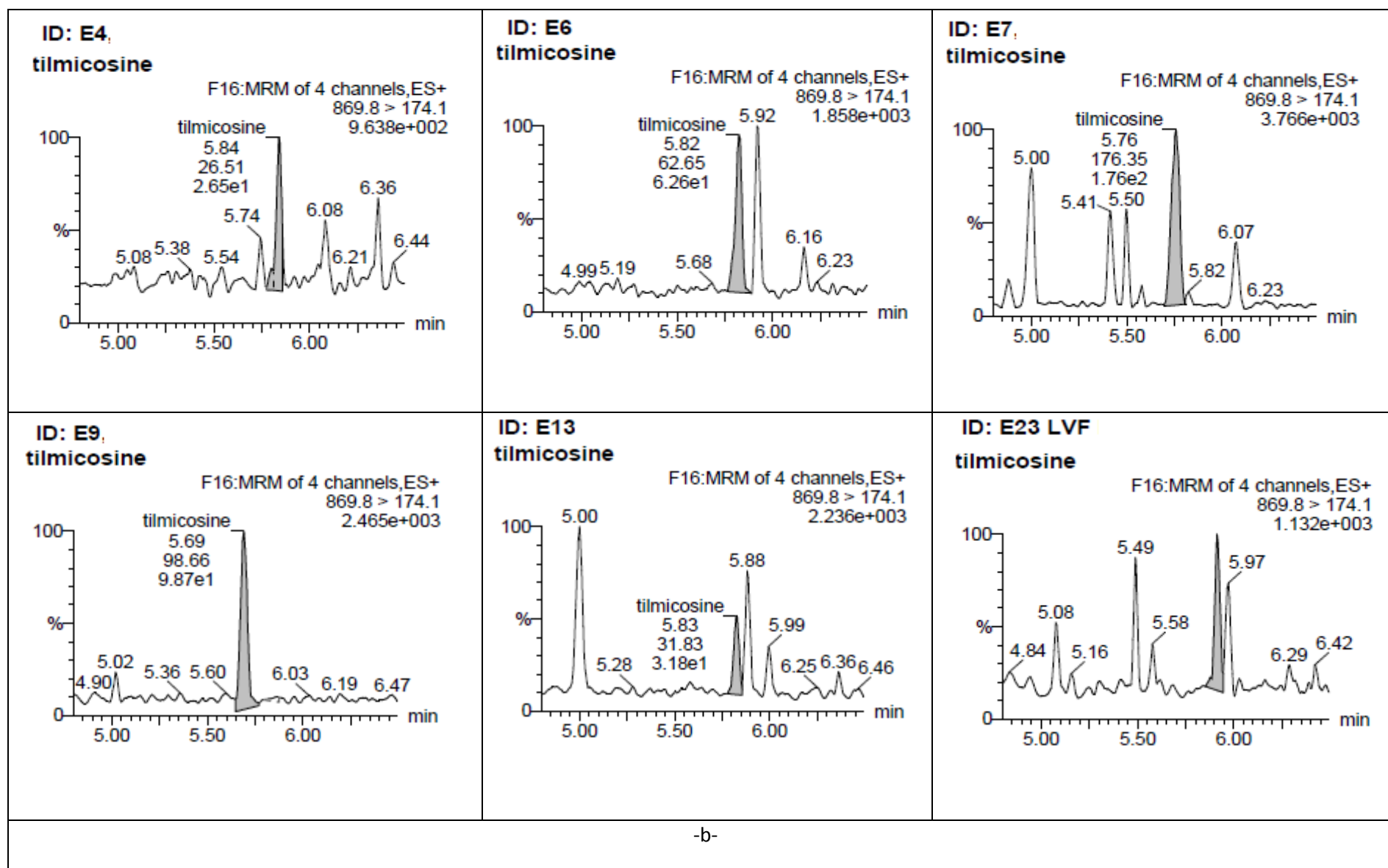




**Figure 16 :** Chromatogrammes –a, b, c, d, e- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour triméthoprimé représentant des sulfamides.

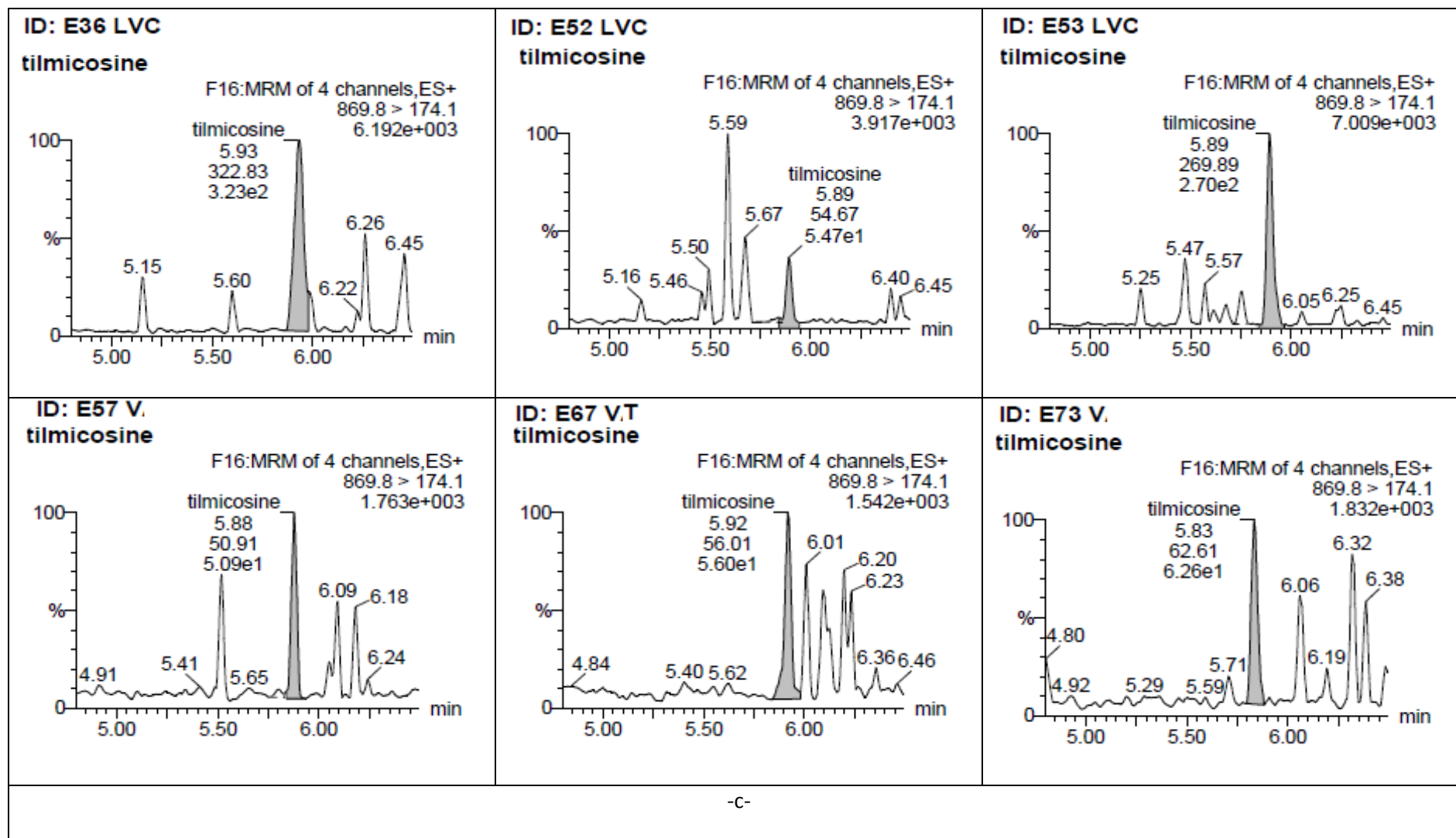
Dans l'industrie laitière, les grandes quantités de lait sont contrôlées quotidiennement pour la présence de sulfamides (figure 16) (Nebot et al., 2013). Sulfadiazine, sulfadimidine, sulfamethoxazole, sulfadoxine et sulfadiméthoxine sont les plus importants et jouent un rôle important en médecine vétérinaire comme médicaments efficaces pour les maladies bactériennes et protozoaires et comme promoteurs de croissance (Bilandzic et al., 2011). Les sulfamides sont souvent abusés parce qu'ils sont peu coûteux et aisément disponibles et leur présence à une concentration au-dessus de la valeur limite est un danger potentiel à la santé humaine (Granja et al., 2012 ; Meng et al., 2015). Parallèlement, le Comité pour des Médicaments Vétérinaires considère que la somme de toutes les substances appartenant à ce groupe dans le lait bovin ne devrait pas excéder 100 mg/ kg (Bilandzic et al., 2011). Dans cette étude, 26,80% du total des échantillons analysés sont trouvés positifs à cette famille d'antibiotiques et nos résultats sont supérieurs à 5% et 2% rapportés par Titouche et al., (2013) et Nebot et al., (2013) successivement. Simultanément, Zhang et al., (2014) en Chine ont trouvé que 20.2% des échantillons de lait UHT et 15.4% de lait pasteurisé ont été contaminés avec des sulfamides à des niveaux inférieurs à LMR.

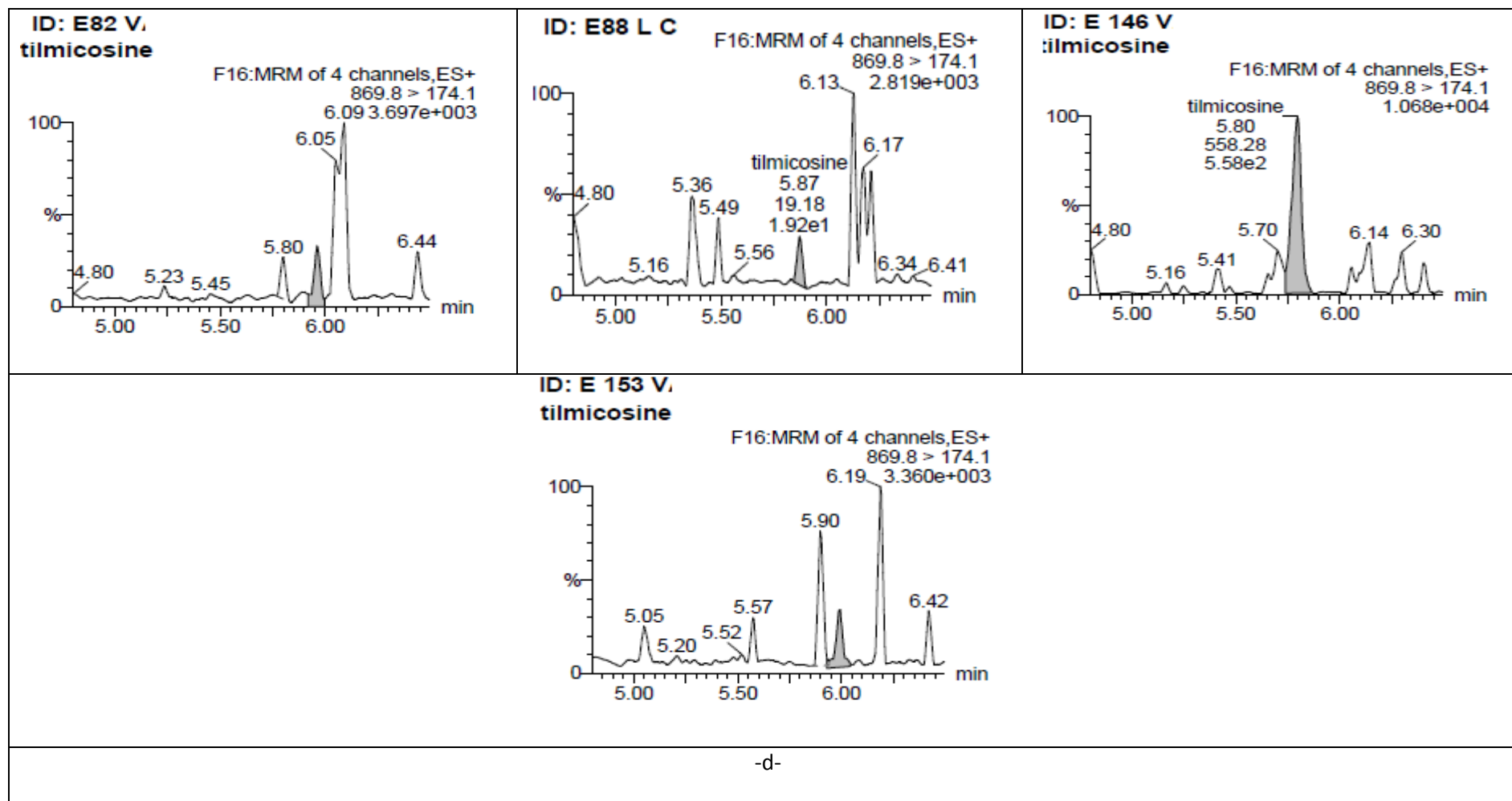




-b-





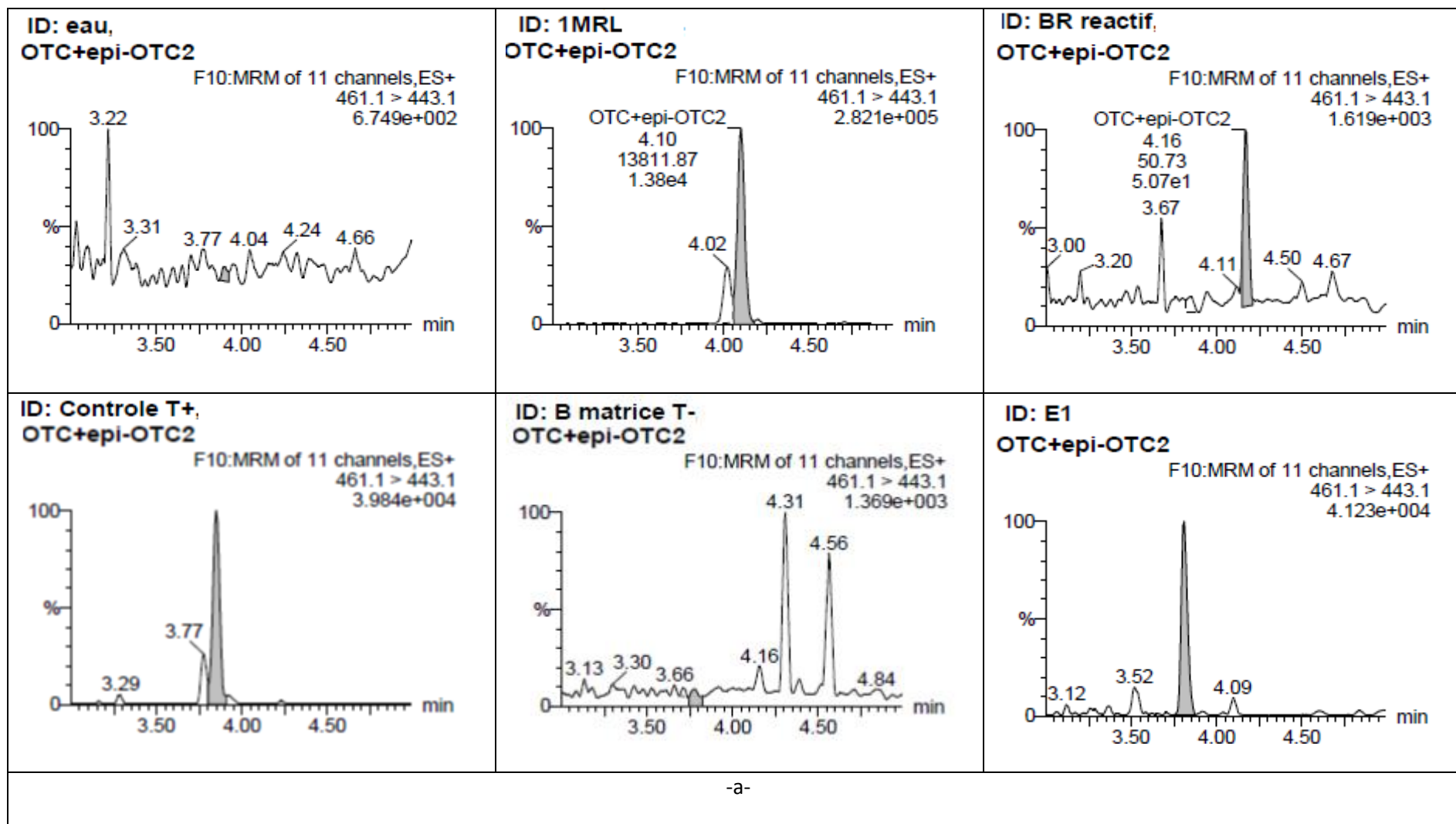


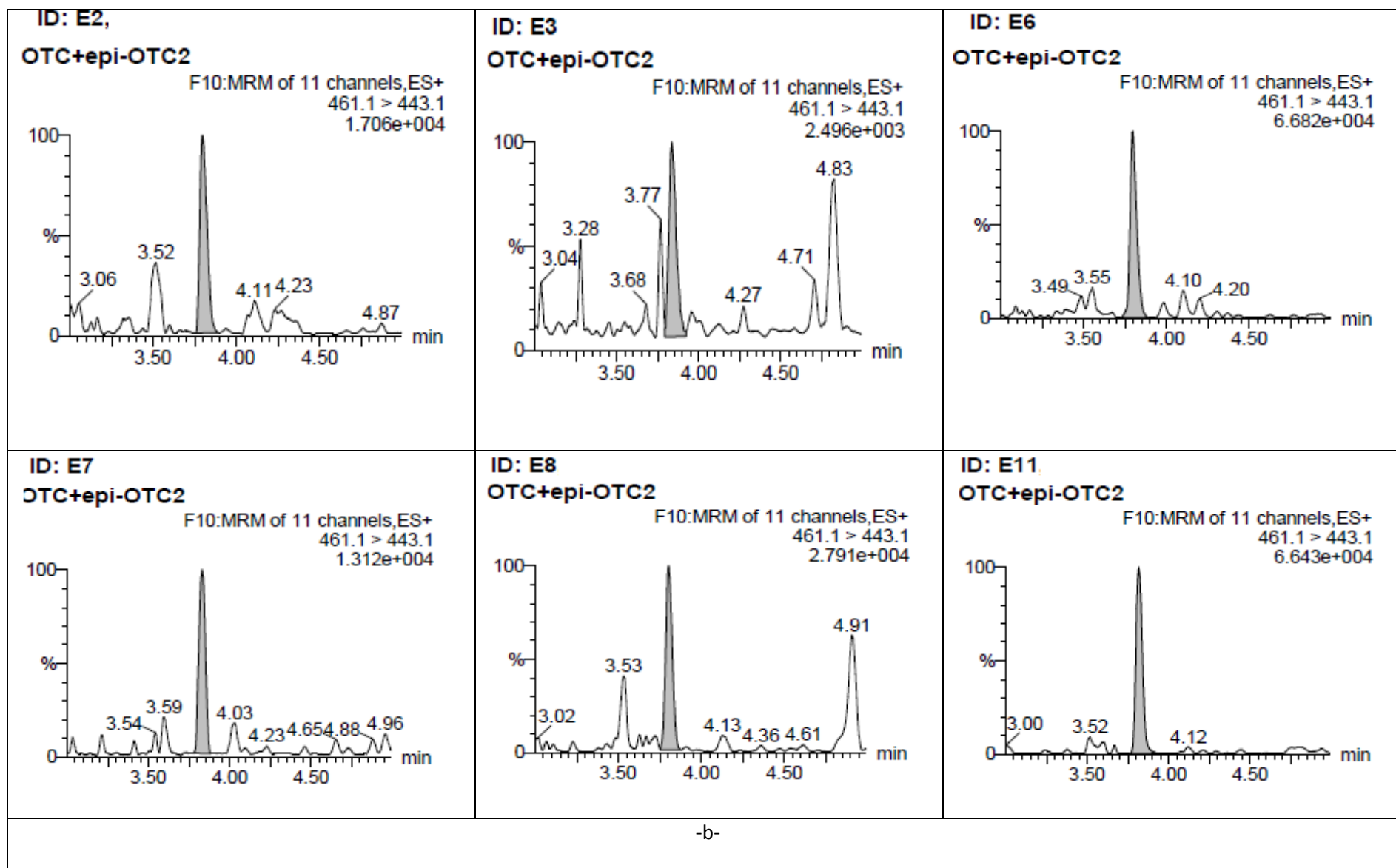
**Figure 17** : Chromatogrammes –a, b, c, d- des résultats obtenus de l’eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour tilmicosine représentant des macrolides.

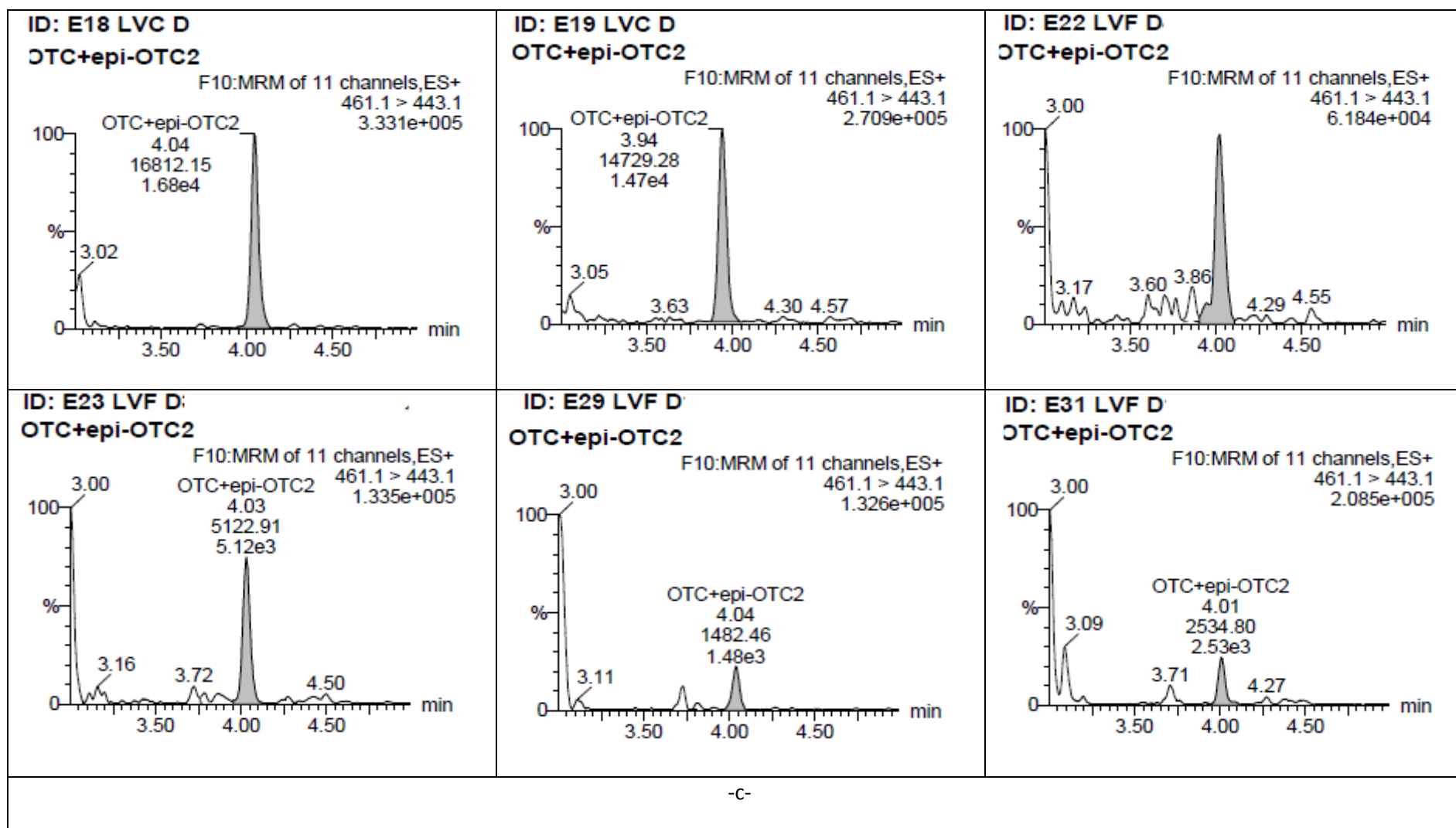
Les macrolides (figure 17) constituent une classe très importante des composants antibactériens actifs contre les bactéries à Gram-positif et certaines à Gram-négatif. Ce sont largement utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les maladies respiratoires, ou comme additifs alimentaires pour promouvoir la croissance (Dubois et al., 2001 ; Wang et Leung, 2007) et les macrolides les plus généralement utilisés sont érythromycine, spiramycine, tylosine et tilmicosine (Bilandzic et al., 2011). Nos résultats 17.52% sont supérieurs à 2,67% et 12.5% des résidus de macrolides et/ou d'aminosides qui ont été détectés dans des prélèvements testés positifs par Ben-Mahdi et Ouslimani, (2009) et Titouche et al., (2013) successivement.

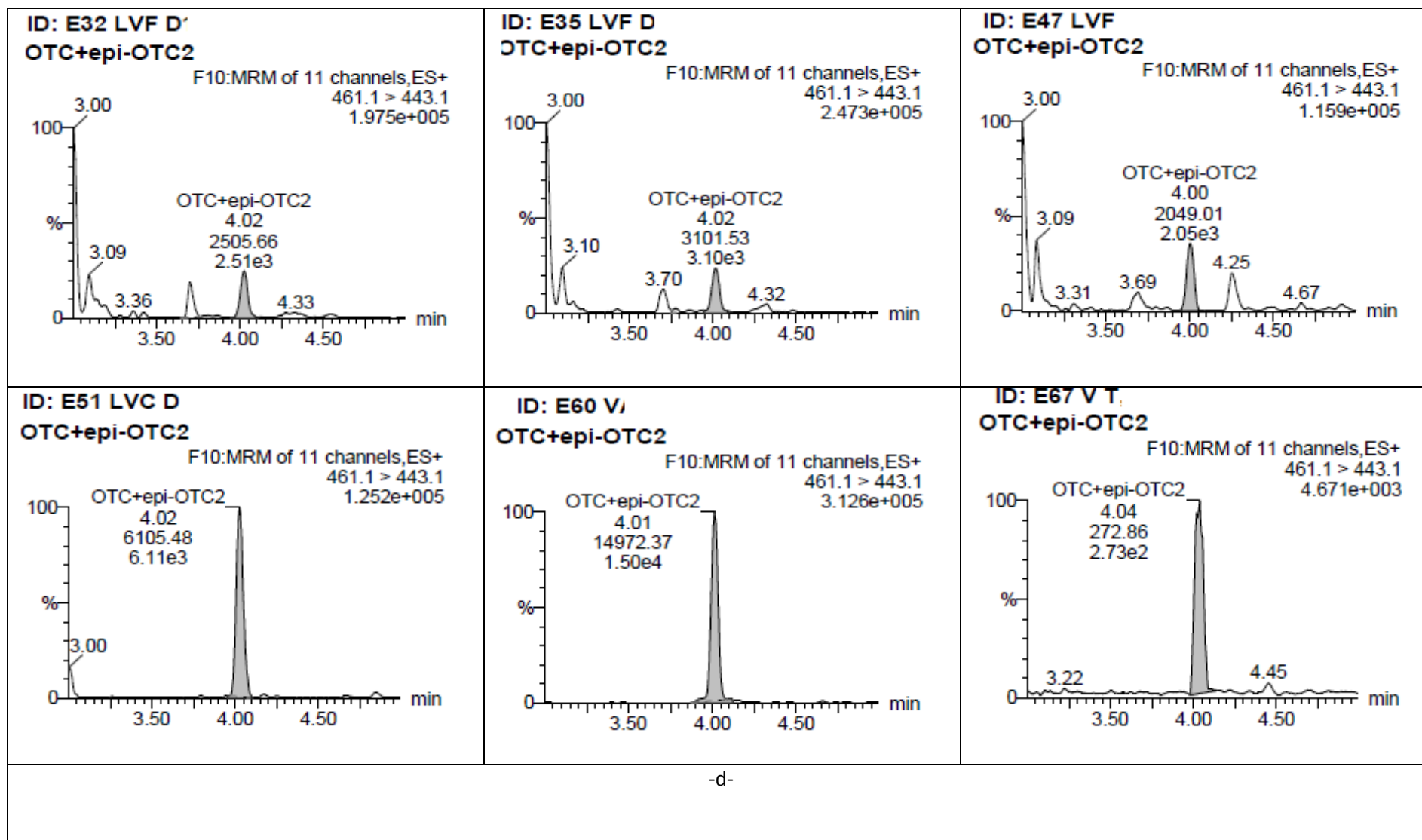
La présence de tétracyclines (figure 18) a été analysée comme ceux-ci sont les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement de maladies de glandes mammaires des vaches laitières (Pogurschi et al., 2015). Ce sont globalement utilisés comme des antibiotiques à large spectre contre une vaste gamme de bactéries aérobies et anaérobies Gram-positif et Gram-négatif. (Bilandzic et al., 2011). La présence de l'oxytétracycline dans la majorité des échantillons du lait analysés est en accord avec les résultats de Martins et al., (2016), supportant la proposition que l'oxytétracycline est probablement l'antibiotique le plus fréquemment utilisé chez les vaches en lactation. En comparaison des résultats obtenus par cette étude avec d'autres travaux, nous avons trouvé qu'un pourcentage de 16.49% des échantillons positifs pour les tétracyclines est supérieur à 1.17% et 1.32% trouvés dans 339 et 605 échantillons de lait analysés par Martins et al., (2014) ; Martins et al., (2016) en Brésil. Egalement, notre résultat est supérieur à 0% des échantillons de lait UHT et 7.7% de lait pasteurisé qui ont été trouvés contaminés avec des tétracyclines à des niveaux inférieurs à LMR par Zhang et al., (2014) en Chine. Tandis que, nos résultats sont inférieurs à 97.33%, 88.75% des pénicillines et/ou tétracyclines trouvés par Ben-Mahdi et Ouslimani, (2009) et Titouche et al., (2013) respectivement, à 25.71% trouvé par Pogurschi et al., (2015) en Roumanie et à 24.4%, 30% et

28.6% des tétracyclines détectés à des niveaux supérieurs à la LMR dans des échantillons du lait pasteurisé, stérilisé et cru successivement en Iran (Abbasi et al., 2011).

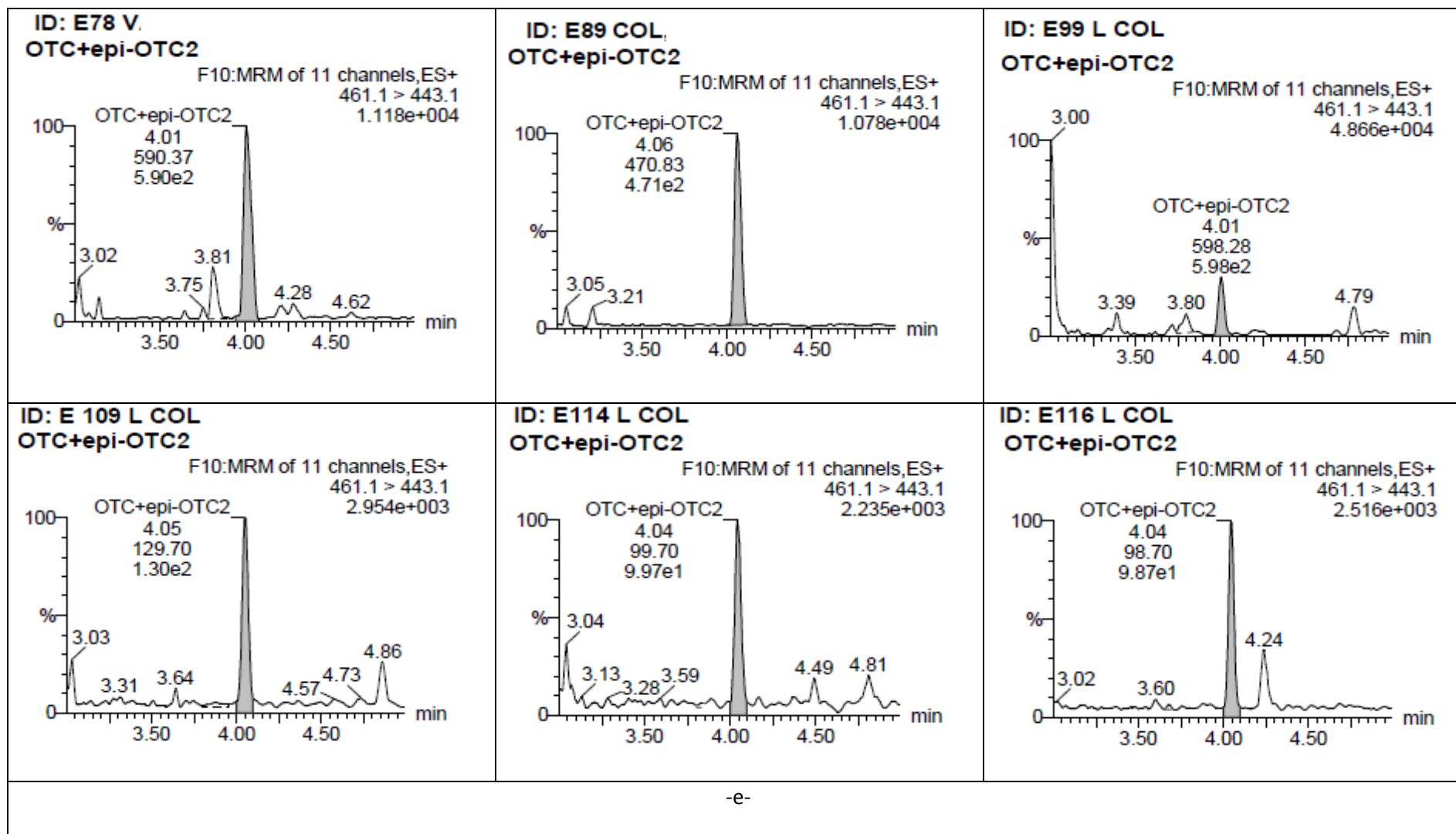


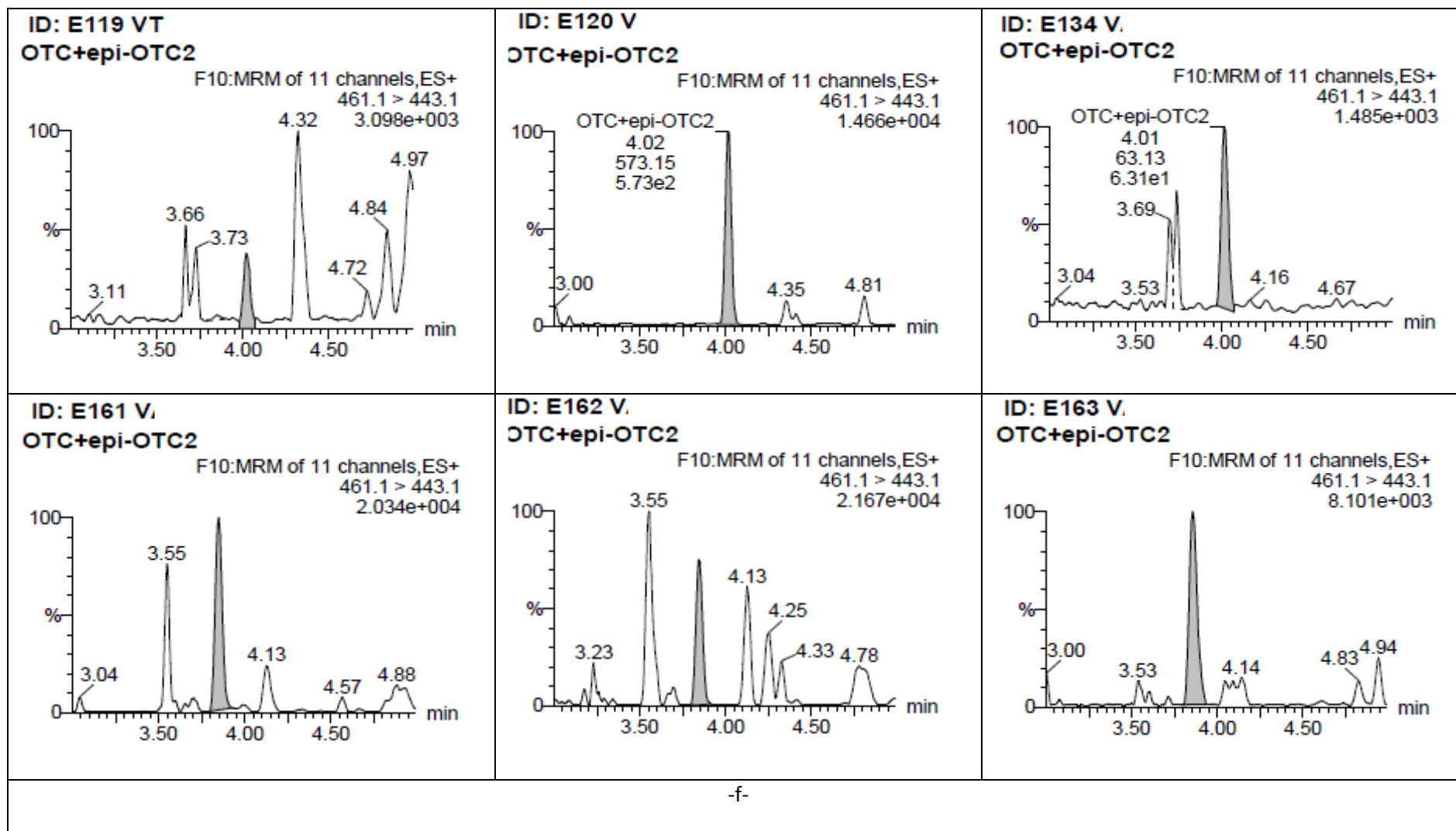


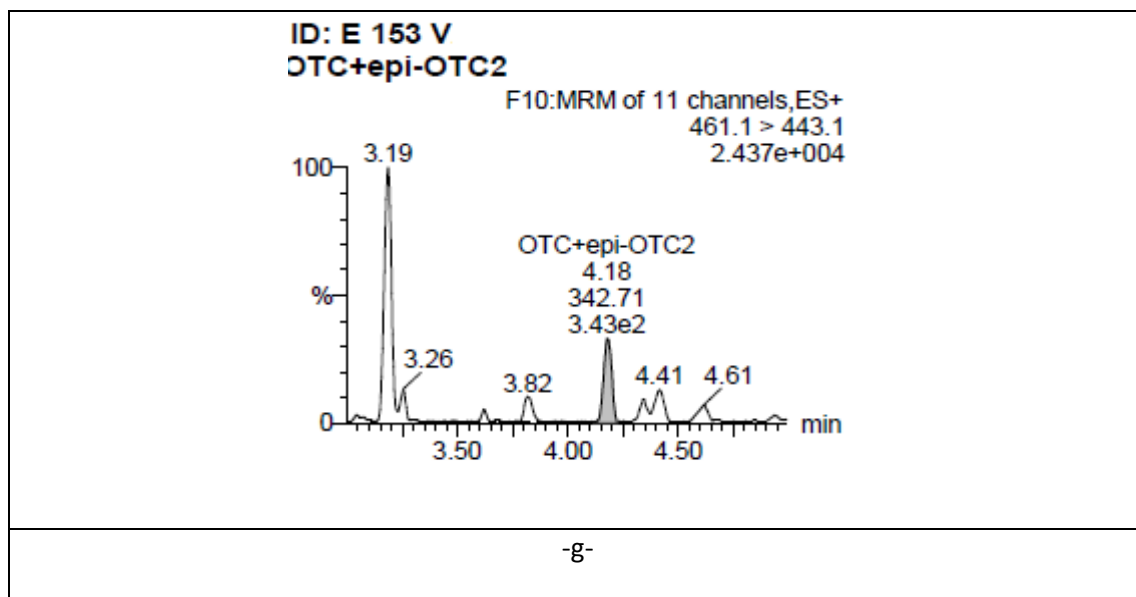




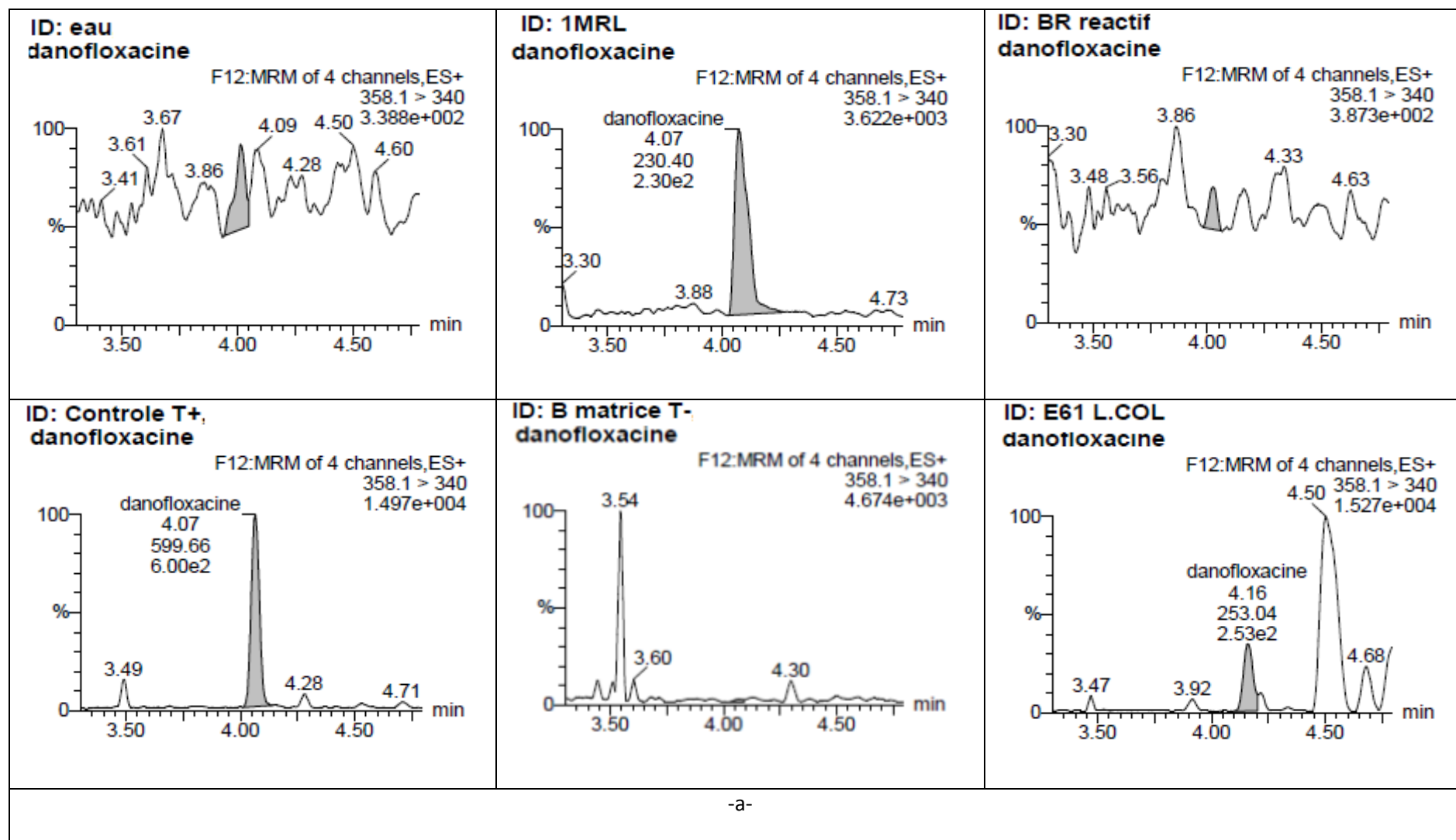


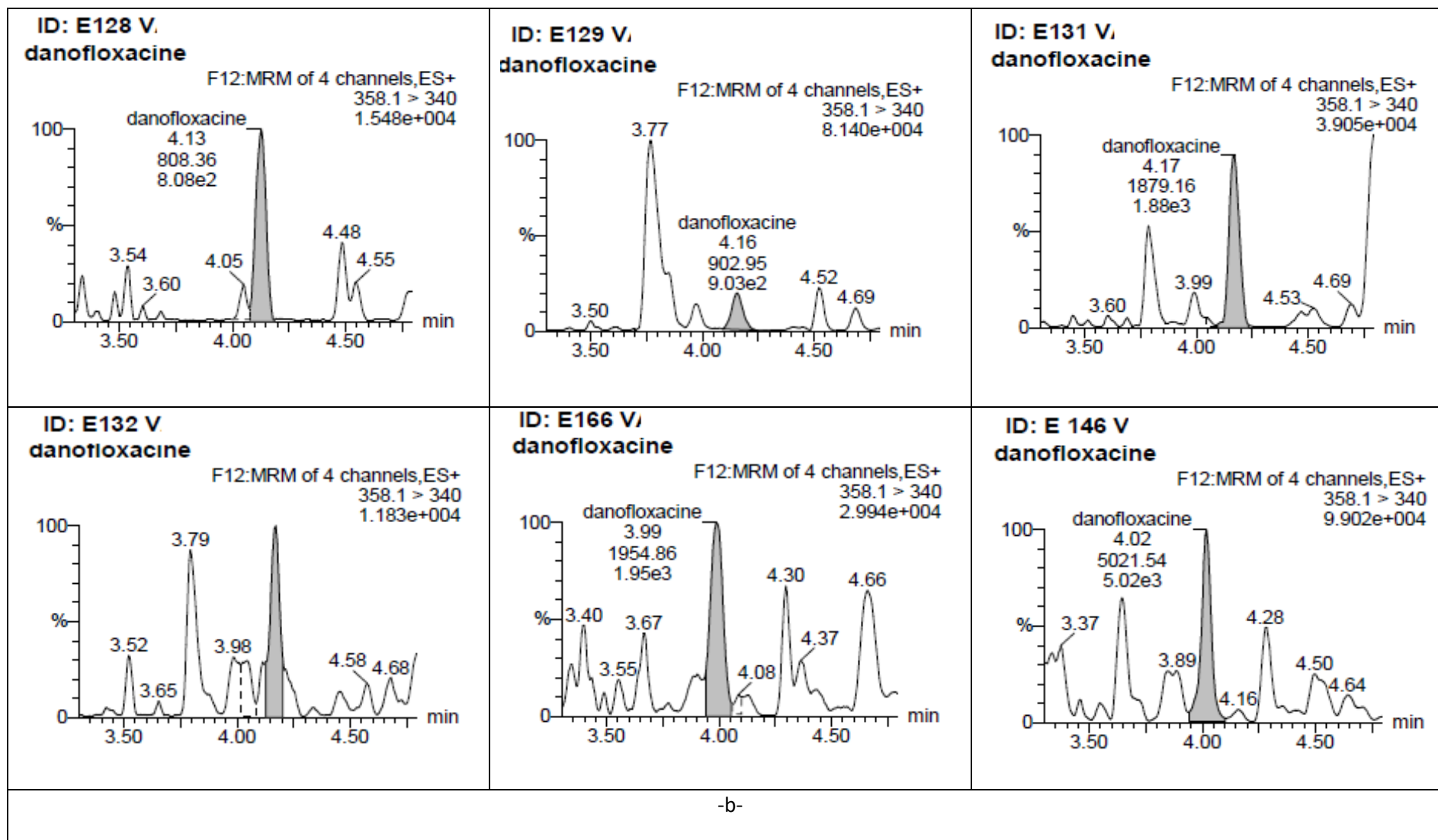


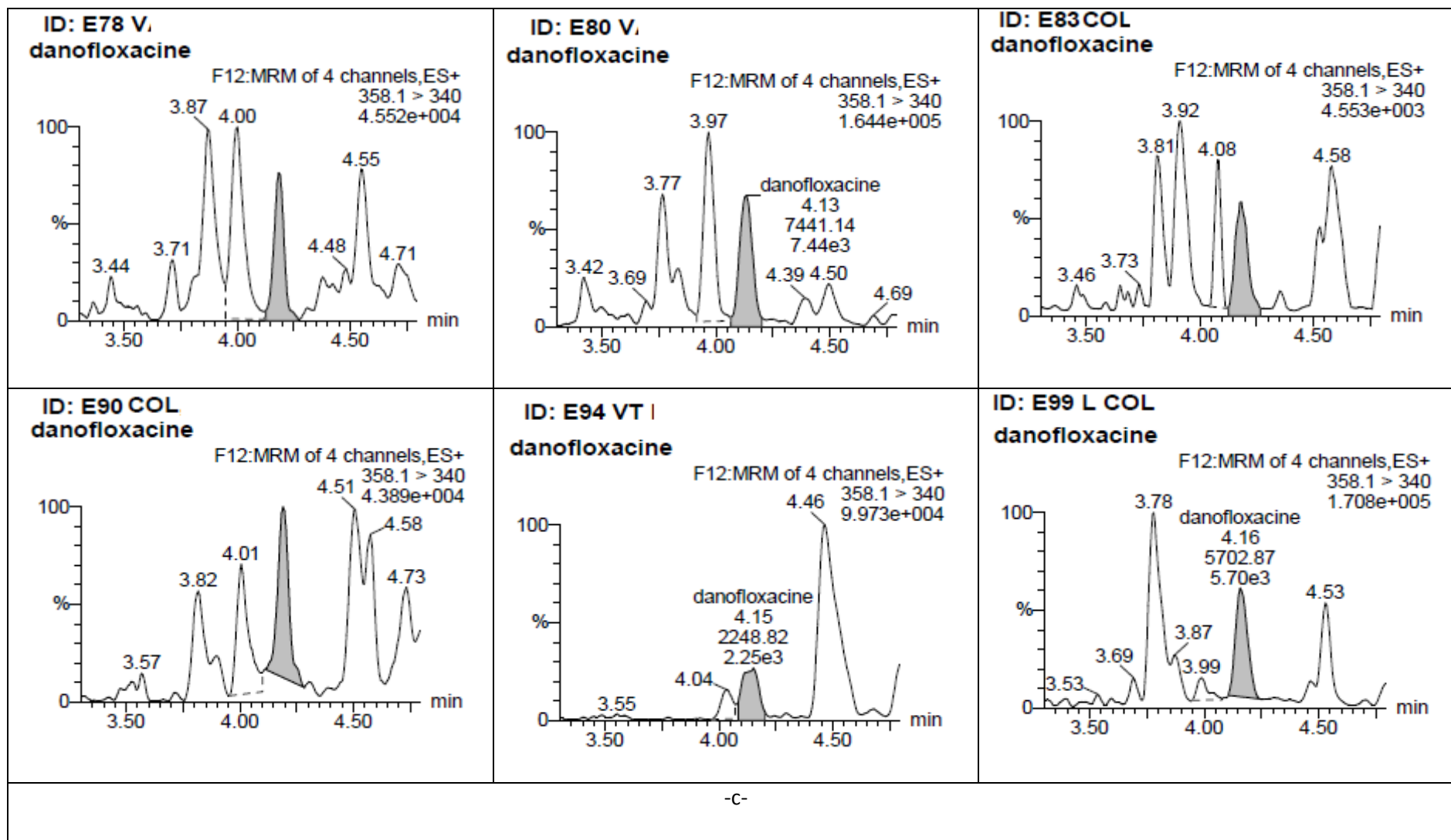




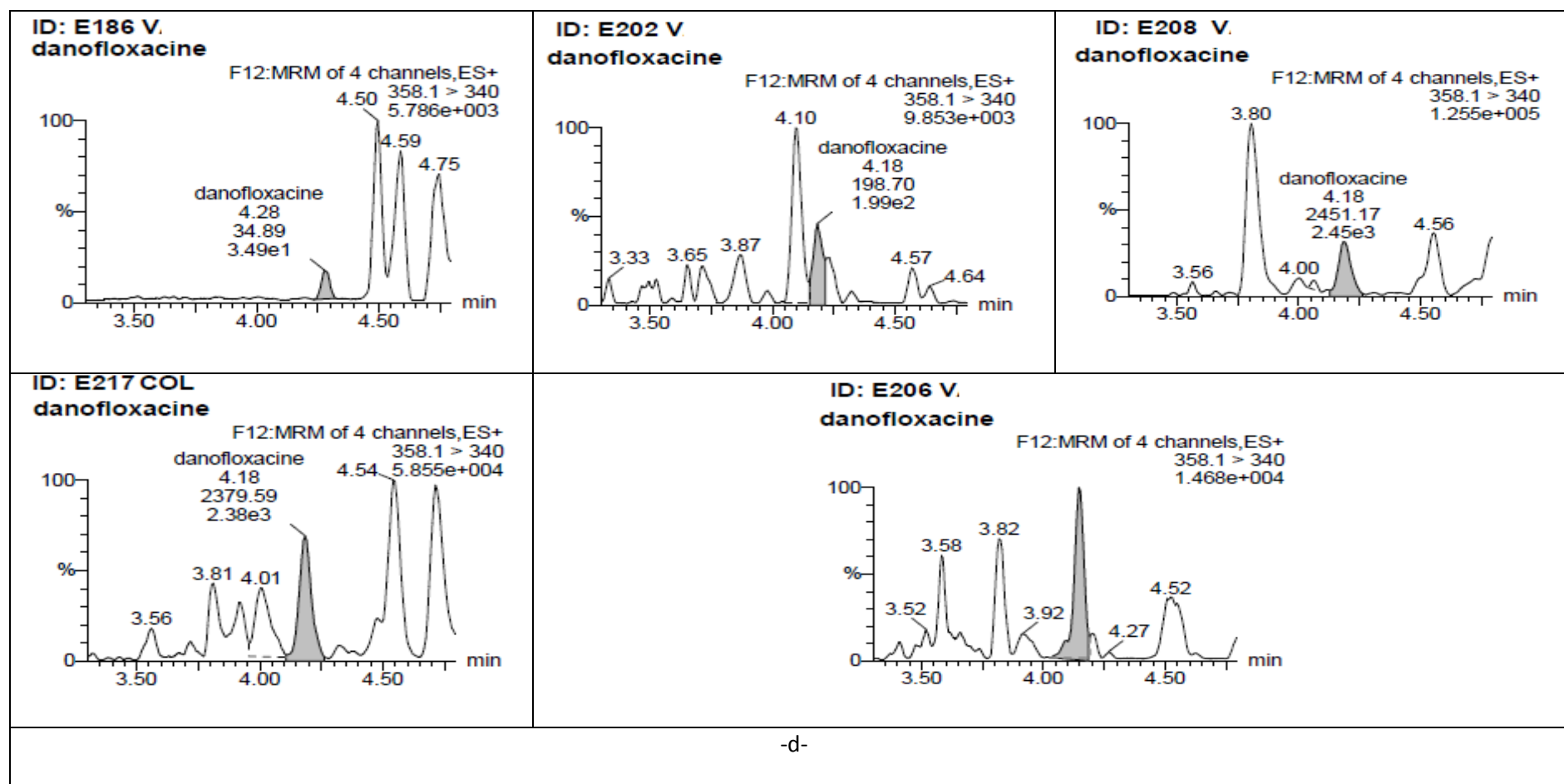
**Figure 18** : Chromatogrammes –a, b, c, d, e, f, g- des résultats obtenus de l'eau, de la solution ILMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour l'oxytétracycline représentant des tétracyclines







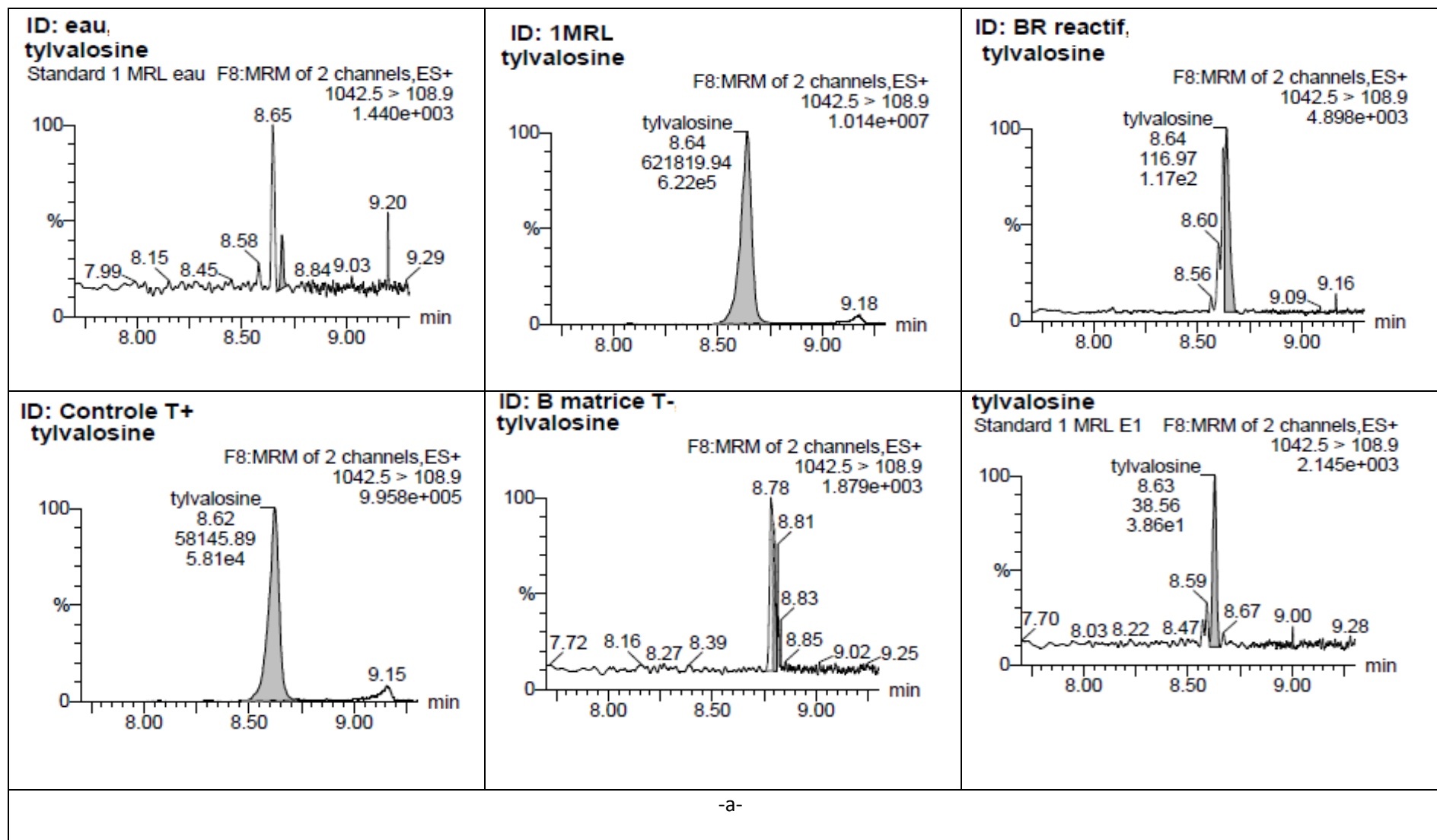
-C-

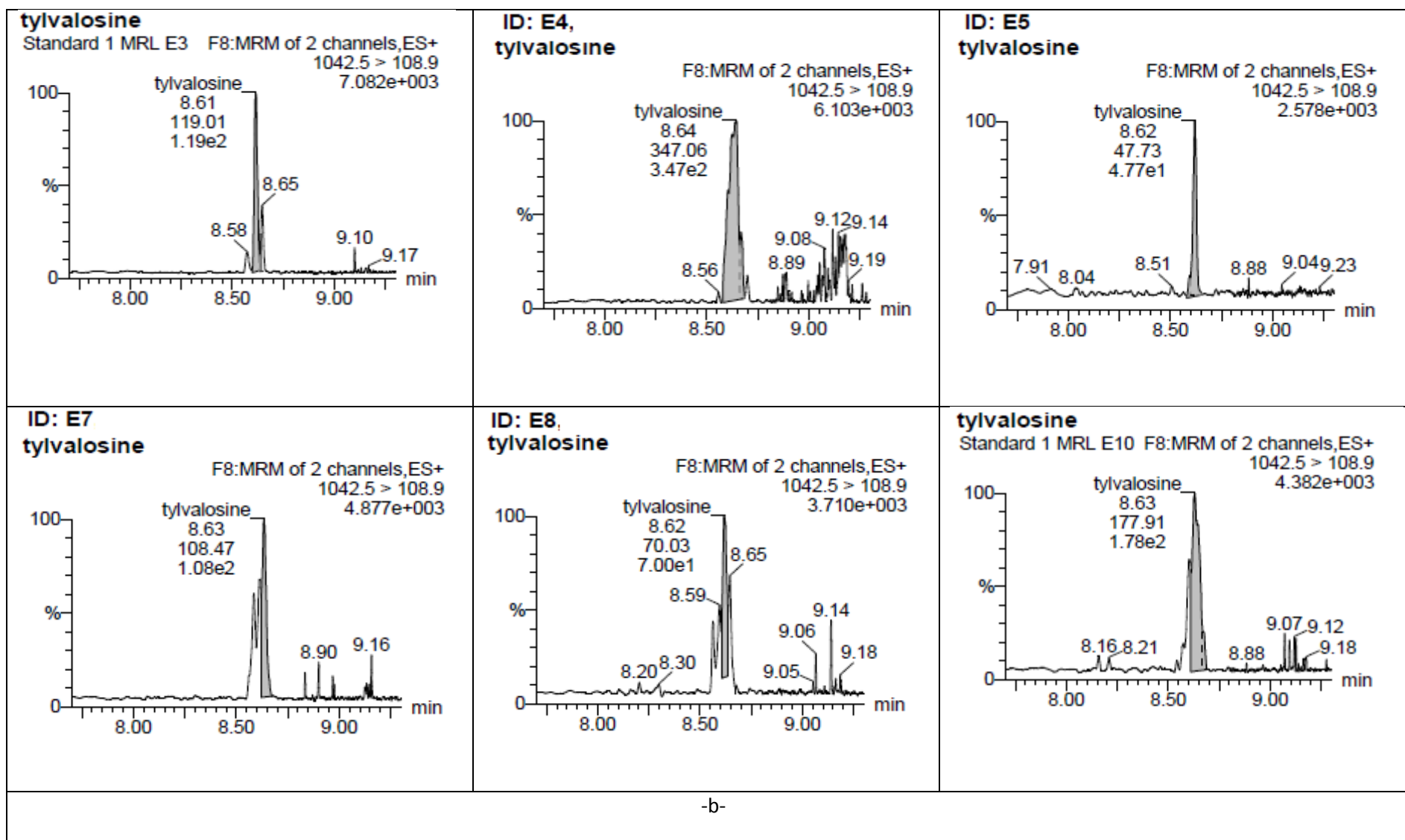


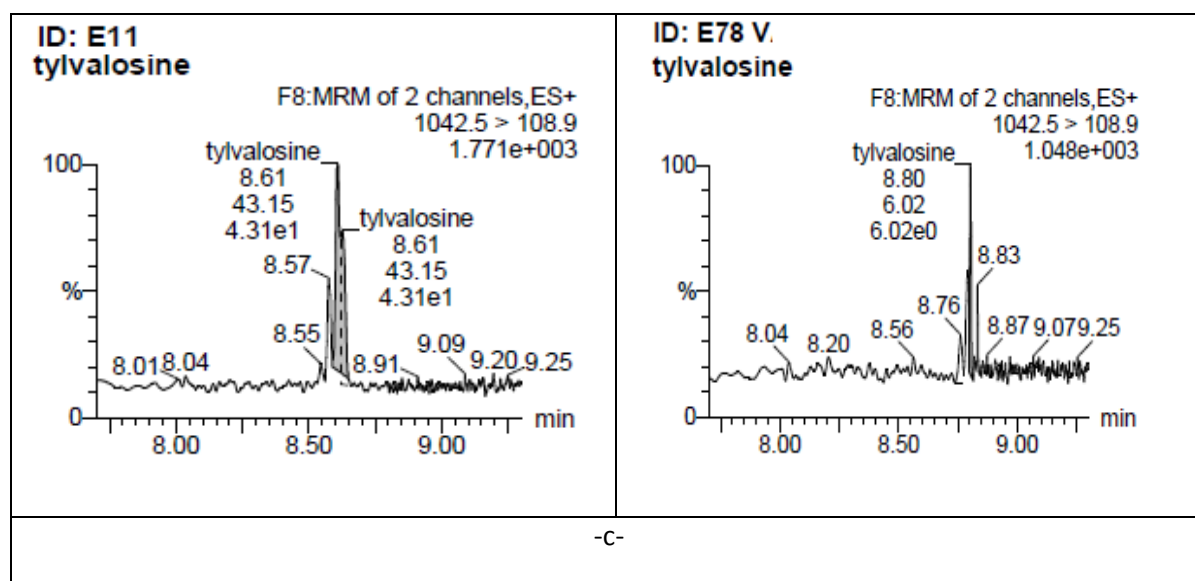
**Figure 19 :** Chromatogrammes –a, b, c, d- des résultats obtenus de l’eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour danofloxacin représentant des quinolones.

En médecine vétérinaire, les quinolones et les fluoroquinolones (figure 19) sont un groupe important d'antibiotiques synthétiques largement utilisés pour traiter les maladies de bétail, comme les infections des voies respiratoires et gastro-intestinales (Bilandzic et al., 2011 ; Navrátilová et al., 2011). Ce sont utilisés dans des préparations intra-mammaires pour le traitement de mammites des vaches laitières allaitantes, pour des vaches laitières pendant des périodes sèches et aussi pour la prévention de mammites (Navrátilová et al., 2011). Bien que les quinolones aient largement appliqués dans l'agriculture primaire, ces dernières années leur administration aux animaux producteurs des aliments a été discutée en relation avec l'incidence accrue de résistance au sein des micro-organismes pathogènes humains. Effectivement, la présence de résidus quinolones dans le lait présente un risque pour la santé publique en raison du développement d'une résistance aux médicaments de la flore intestinale (Bilandzic et al., 2011). Ainsi, Il est prouvé que l'exposition à long terme aux basses concentrations de ces substances peut avoir des effets négatifs sur la densité osseuse (Navrátilová et al., 2011). Dans cette étude les quinolones ont été trouvés à un faible pourcentage de 10.30% du total. Nos résultats sont supérieurs à 0.33% rapportés en Brésil par Martins et al., (2016) sur un total de 605 échantillons et sont inférieurs à (28%) des échantillons du lait trouvés positifs pour les quinolones et bêta-lactames par Junza et al., (2014). Tandis que, nos résultats ne s'accordent pas avec ceux de Han et al., (2015) qui ont trouvé un seul échantillon contaminé par fluméquine à un niveau inférieur à la LMR.



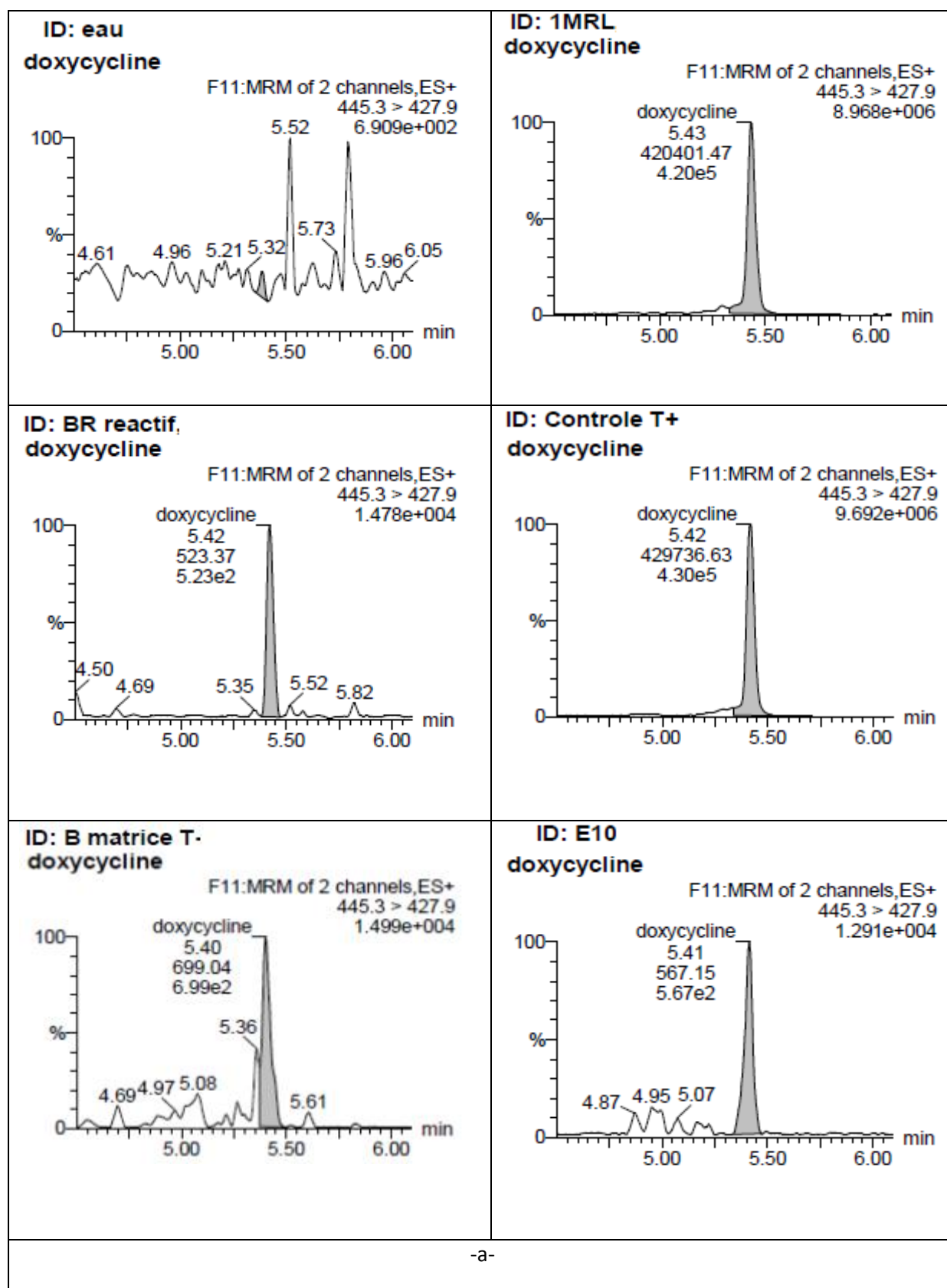




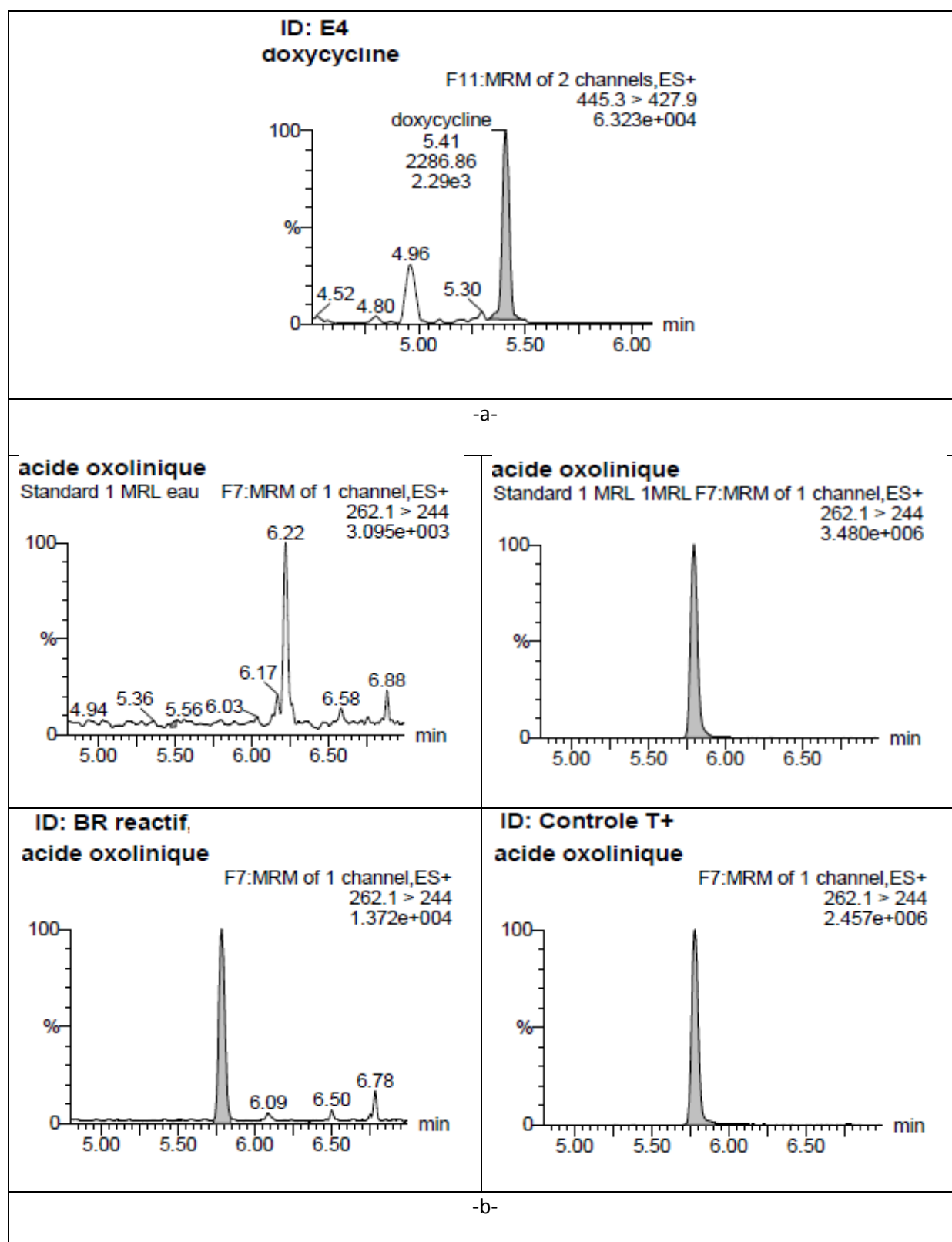


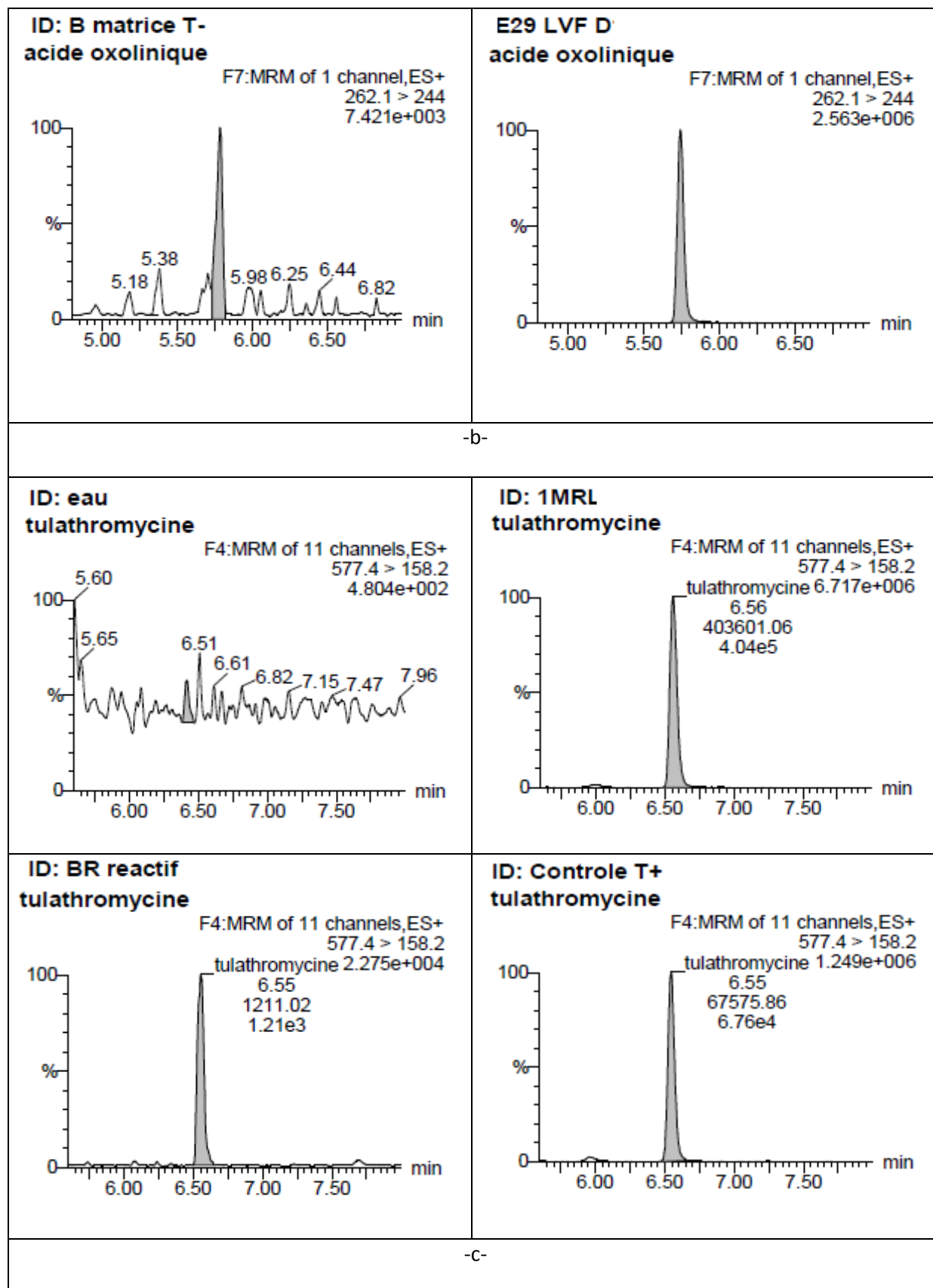
**Figure 20** : Chromatogrammes –a, b, c- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour tyvalosine représentant des macrolides qui ne possèdent pas de LMR.

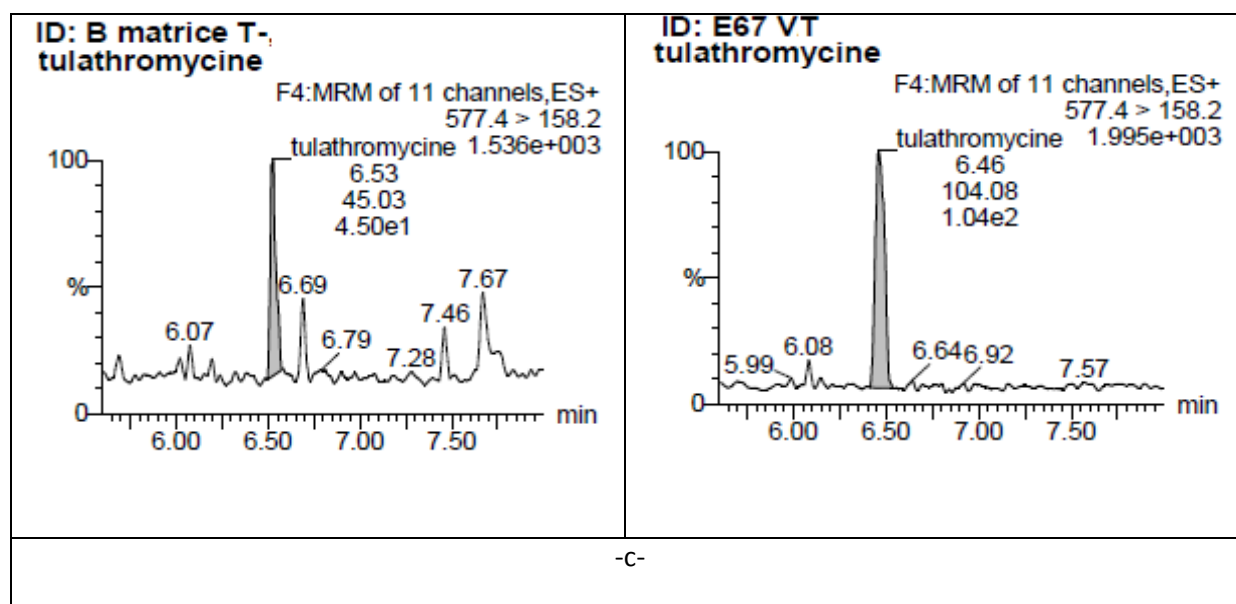
L'antibiotique qui ne possède pas de LMR le plus détecté dans cette étude est le tyvalosine (figure 20). Ce dernier est utilisé dans le traitement des poulets et des dindes (CVMP, 2015) et n'est pas actuellement approuvé pour l'utilisation dans des vaches laitières. Certains médicaments qui ne sont pas approuvés pour l'utilisation dans le bétail laitier allaitant peuvent être utilisés dans des conditions précises. Ces conditions incluent une relation valable « vétérinaire – client – patient » aussi bien des mesures appropriées pour assurer qu'aucun résidu de médicament illégal n'arrive dans aucun aliment produit par l'animal soumis au traitement. Cependant, cette utilisation n'est pas permise pour certains médicaments et elle ne peut pas aboutir à un résidu de médicament illégal dans la nourriture destinée à la consommation humaine (CVM, 2015).



-a-







**Figure 21** : Chromatogrammes –a, b, c- des résultats obtenus de l'eau, de la solution 1LMR, du blanc réactif (BR), témoin positif (T+), négatif (T-) et échantillons trouvés positifs (E) pour doxycycline, acide oxolinique et tulathromycine représentant des antibiotiques interdits.

La commission Européenne (Commission Regulation, 2010) interdit l'utilisation du tulathromycine, l'acide oxolinique et doxycycline (figure 21) chez les animaux producteurs du lait et ces antibiotiques sont trouvés à des niveaux élevés dans les échantillons de laits analysés. Selon, Amer et al., (2012) un long délai d'attente (> 19 jours) est exigé pour le lait destiné à la consommation humaine quand le tulathromycine est administré accidentellement aux chèvres laitières allaitantes. Nos résultats s'accordent avec les résultats rapportés par CVM, (2015) qui ont trouvés 2 échantillons positifs pour le tulathromycine sur un total de 953 échantillons de lait cru analysés. Tandis que, notre résultat pour le doxycycline est supérieur à 0 échantillon trouvé positif par cette étude.

En général, 65.5% de tous les échantillons de lait analysés dans cette étude par UPLC-MS/MS ont été contaminés par les résidus d'antibiotiques à des niveaux qui dépassent la MRL. Nos résultats sont beaucoup plus supérieurs à ceux de 15% (Li et al., 2012), 16.66% (Meng et al., 2015) en Chine, 28% (García et al., 2016) en Espagne et 25.4% (Abbasi et al., 2011) en Iran. Des niveaux plus bas de contamination ont été enregistrés : 1.76% ,0.33% par (Martins et al.,

2014) et (Jank et al., 2017) en Brésil successivement et (<1%) en Croatie par (Bilandzic et al., 2011). Ainsi, nos résultats sont similaires aux proportions de 70 % rapportés au Kosovo par Sulejmani et al., (2012) et de 58 et 100 % au Bénin (Mensah et al., 2014b). Pereira et al., (2014) ont indiqué que 47.17% des échantillons analysés ont été détectés à des concentrations de détection tandis que Han et al., (2015) ont trouvé que 12% des échantillons ont été détectés à des niveaux inférieurs à la MRL.

#### 4. Corrélation entre les résultats de l'UPLCMS/MS et ceux du Delvotest SP-NT et présence d'antibiotiques spécifiques

Seulement 131 échantillons de lait ont été utilisés pour une comparaison entre les résultats obtenus avec Delvotest SP-NT et l'UPLC-MS/MS (tableau 23). L'utilisation de Kappa de Cohen (test statistique) pour la comparaison entre le nombre total des résultats a révélé qu'il n'y'a pas d'agrément entre ces deux méthodes.

**Tableau 23:** Corrélation statistique entre les résultats du Delvotest SP-NT et UPLC-MS/MS

	Delvotest négatif	Delvotest positif	Delvotest douteux
UPLC-MS/MS négatif	18	13	15
UPLC-MS/MS positif	52	20	13

kappa de Cohen (-0.1042, valeur de P : 0.1578) calculées.

En outre, parmi les 131 échantillons de lait seulement 18 échantillons ont été trouvés négatifs par les deux méthodes. En utilisant Delvotest SP-NT, 15 échantillons ont été considérés comme douteux et 13 échantillons ont été trouvés positifs. Ces résultats ont été confirmés par la suite avec l'UPLC-MS/MS comme négatifs. Ainsi qu'à partir des résultats illustrés dans les tableaux 23 et 24, nous avons trouvé que l'UPLC-MS/MS a pu détecter plusieurs antibiotiques dans les 52 échantillons trouvés négatifs auparavant avec le Delvotest SP-NT dont les  $\beta$ -lactames sont les résidus les plus abondants suivi par les macrolides. Tandis que, les sulfamides, les quinolones et les tétracyclines ont été présents consécutivement à des fréquences modiques. Finalement, 20 échantillons de lait ont été confirmés positifs par les deux méthodes et en plus la positivité de 13 échantillons trouvés douteux par Delvotest SP-



NT a été révélé e par l'UPLC-MS/MS. Ces résultats de comparaison indiquent que la méthode de l'UPLC-MS/MS est plus sensible que le Delvotest SP-NT.

**Tableau 24 :** Comparaison des résultats obtenus par LC-MS/MS et Delvotest SP-NT donnée par la fréquence des antibiotiques surreprésentés

Antibiotique	%Fréquence des résultats		
	LC-MS/MS positif & Delvotest négatif	LC-MS/MS positif & Delvotest positif	LC-MS/MS positif & Delvotest douteux
ampicilline	26.9	10	38.5
oxacilline	9.6	/	/
tylvalosine	11.5	5	/
tilmicosine	13.5	10	/
amoxicilline	42.3	40	/
érythromycine	1.9	/	/
tilosyne	1.9	/	/
sulfathiazole	1.9	/	/
sulfamerazine	1.9	/	/
sulfamethizole	1.9	/	/
enrofloxacin	1.9	/	/
spiramicine	1.9	/	/
nafcilline	1.9	/	/
josamycine	1.9	/	7.7
tulathromycine	1.9	/	/
doxycycline	1.9		/

Les analyses comparatives ont indiqué plusieurs contradictions entre les méthodes, un certain nombre de résultats faux négatifs utilisant Delvotest SP-NT a été identifié et la sensibilité de Delvotest SP-NT pour les différents groupes d'antibiotiques aussi bien que le type de lait a été évalué.

Selon les résultats obtenus avec Delvotest SP-NT, les échantillons les plus contaminés sont ceux collectés des vaches traitées, alors que, l'UPLC-MS/MS a révélé que les échantillons rassemblés auprès des points de vente ont été les plus contaminés. Ce faisant, les éleveurs pratiquent la métaphylaxie plus que la prophylaxie dans la gestion des pathologies. Ils appliquent des traitements antibiotiques à titre préventif pour les vaches allaitantes saines et curatif pour celles malades (Mensah et al., 2014b). Le délai d'attente correspond à la durée consécutive à la dernière administration du traitement pendant laquelle les denrées produites par l'animal traité ne peuvent pas être commercialisées. C'est pour cela, les antibiotiques présents dans le lait des vaches traitées pourraient résulter d'une collection de lait durant un temps réduit après l'administration d'antibiotiques. Ainsi, il peut refléter le non-respect du

délai d'attente prescrit à cause de l'utilisation d'une dose élevée, la défaillance d'observer le délai d'attente, la mauvaise utilisation de médicaments ou la mauvaise hygiène (Zinedine et al., 2007; Petrović et al., 2008; Mensah et al., 2014b; Boultif, 2015). L'établissement d'un délai temps d'attente dépend de différents critères : le type d'antibiotique utilisé, la quantité d'antibiotique donné et la voie de traitement ainsi l'âge, le statut de santé, la phase de lactation et les caractéristiques individuelles d'animaux laitiers (Nikolić et al., 2011). Les études qui ont été faites pour la fixation du délai d'attente sont pour la plupart menées pour des races représentatives des grandes productions des pays développés et ne tiennent pas compte des particularités des espèces animales africaines qui peuvent différer au niveau de leur patrimoine génétique mais également en matière de régulation de leur physiologie, adaptée aux conditions climatiques locales (consommation en eau, volume de distribution et clairance rénale). Ces différences influent sur la cinétique des résidus et pourraient nécessiter d'adapter les temps d'attente requis lorsque les médicaments sont administrés à des races locales (Mensah et al., 2014a).

Egalement, Les échantillons de lait collectés aux niveaux des points de ventes ont été fournis par des collecteurs privés qui rassemblent leurs lait dans des citernes isothermes à partir des fermes (privées ou étatiques) et des éleveurs producteurs de lait de vaches à petite échelle. Ces derniers sont largement dispersés aux territoires Algériens ruraux et sont localisés très loin des zones urbaines et loin de tous contrôle par les autorités compétentes. En réalité, la détection précise des niveaux bas de résidus de médicament antimicrobiens dans le lait, est non seulement très importante pour les laboratoires de contrôle gouvernementaux et l'industrie laitière, mais aussi pour les fermiers pour leur permettre d'assurer que le lait contaminé provenant des vaches individuelles n'est pas mélangé avec celui du tank (Stead et al., 2008) et empêcher le transfert d'antibiotiques dans la chaîne alimentaire. Le décret N°14-366 exécutif Algérien du 15 décembre 2014 qui règle les conditions et les modalités applicables quant aux polluants tolérés dans des produits alimentaires, ne mentionne pas d'informations suffisantes sur le plan de contrôle et le dosage de résidus d'antibiotiques (Décret exécutif, 2014). En fait, l'autocontrôle dans les industries laitières est généralement réalisé suivant la législation Européenne. Au contraire, l'assurance de la qualité est plutôt basse ou non strictement suivie dans beaucoup de pays africains comme en Algérie (Mensah et al., 2014b). D'où, l'inexistence de cadre législatif réglementaire en la matière en Algérie peut être liée aux pourcentages élevés de résidus d'antibiotiques interdits ou réglementés dans les produits alimentaires d'origine animale.

Dans cette étude les échantillons de lben ont été fortement contaminés. Le lait fermenté 'lben' est préparé en laissant le lait de vache se fermenter naturellement à température ambiante pendant 24h de temps. Cette fermentation est effectuée principalement par les bactéries lactiques présentes (Zamfir et al., 2006 ; Ouadghiri et al., 2009b) et après il doit être soumis au barattage et l'enlèvement de beurre. La Littérature suggère que la présence d'antibiotiques dans le lait puisse affecter les processus de fermentation dans l'industrie alimentaire (Hsieh et al., 2011). Par conséquent, la fermentation durant la production du lben peut être affectée par l'inhibition de la croissance des cultures initiales si les résidus d'antibiotiques sont présents (Nikolic et al., 2011) et il ne peut pas donc contenir de sous-produits de certaines substances antimicrobiennes naturellement présentes dans ce type de fermentation (Zinedine et al., 2007). C'est pour cette raison, la performance de Delvotest SP-NT a été mise en doute. Tandis qu'aucune limitation spécifique n'est mentionnée ni par le fabricant, ni vérifiée dans quelques études (Hennart et Faragher, 2012) pour analyser les résidus d'antibiotiques dans le lait fermenté et le devenir d'antibiotiques dans un lait comme lben n'est pas entièrement évalué. A l'exception d'une étude réalisée par Zinedine et al., (2007) sur le lait raib au Maroc, il y a un grand manque de données scientifiques sur la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait fermenté (lben). La durée de vie de 'lben' est environ 3 jours à 4 °C. Cependant, il a été rapporté que parfois il est gardé à température ambiante dans des régions où il y a l'électricité est limitée. Dans ces conditions le lait de lben atteint des niveaux élevés d'acidité après 2-3 jours (Benkerroum et Tamime, 2004). Les résultats de la stabilité des antibiotiques de notre étude ont montrés que dans ces conditions la concentration d'antibiotique semble augmenter. C'était indépendant des conditions de température (4°C et 21°C). Plus d'études seraient nécessaires pour révéler si ces antibiotiques seraient facilement bio-disponibles et augmentent l'exposition aux consommateurs.

Delvotest SP-NT présente une sensibilité variable aux différents groupes d'antibiotiques. Selon le fabricant et plusieurs rapports (Althaus et al., 2003, Stead et al., 2008, Sierra et al., 2009a ; DSM, 2012 et Beltran et al., 2015), La sensibilité de Delvotest SP NT aux  $\beta$ -lactames, comme le principal groupe de médicaments vétérinaires utilisés en thérapie des vaches est haute à part le cloxacilline. Celui-ci peut être détecté au niveau plus haut que LMR (Petrovic et al., 2008). La sensibilité du Delvotest SP-NT aux macrolides est limitée au tylosine, alors que l'érythromycine et spiramycine sont détectés à des niveaux plus haut que LMR (DSM, 2012). Althaus et al., (2003); Stead et al., (2008); Sieera et al., (2009b) et Beltran et al., (2015) ont aussi confirmé que la détection de l'érythromycine était à des niveaux plus haut que LMR tandis qu'il n'y a aucune donnée liée à la sensibilité de Delvotest SP-NT pour les

autres macrolides (tilmicosine, tulathromycine, tylvalosine et josamycine). En outre, la sensibilité de Delvotest SP-NT aux sulfamides est limitée seulement à sulfathiazole (DSM, 2012). Les niveaux de détection de l'enrofloxacin et doxycycline de ce test ont été décrits par Sieera et al., (2009 b). Ce dernier rapporte quand l'échantillon de lait contient des résidus au-dessous de la limite de détection (LOD), les spores germent et multiplient, ainsi, leur activité métabolique change la couleur de l'indicateur. Althaus et al., (2003), Sierra et al., (2009b), Le Breton et al., (2007) et Comunian et al., (2010) ont remarqué que Delvotest SP-NT a démontré une capacité inférieure de détecter d'autres tétracyclines. Ainsi, Appicciafuoco et al., (2015) ont signalé que les méthodes de routine utilisées actuellement pour l'analyse du lait, ne peuvent pas détecter les résidus de quinolones. Pour un test de dépistage, l'absence de résultats faux négatifs est plus important que l'absence de résultats faux positifs parce que les échantillons positifs seront confirmés (Petrović et al., 2008, Ferrini et al., 2015).

Les deux méthodes ont été en accord pour quelques échantillons de lait trouvés positifs. Les antibiotiques les plus fréquemment détectés ont été les  $\beta$ -lactames. Principalement, l'amoxicilline (le résidu le plus abondant dans le lait étudié) et ampicilline ont été trouvés dans la moitié des échantillons à un pourcentage qui est toujours moins que 97 % et 88 % de pénicillines et/ou tétracyclines comme rapportés par Ben-Mahdi et Ouslimani, (2009) et Titouche et al., (2013), respectivement où des méthodes microbiologiques standards ont été utilisées. Le prix bas de  $\beta$ -lactames en Algérie les rend facilement disponibles et donc facilite leur utilisation par des éleveurs des vaches privés sans surveillance de vétérinaires dans les endroits isolés. De plus, la présence des macrolides à des fréquences basses de tilmicosine et tylvalosine comme - résidu sans MRL - pourrait être liée –à leur utilisation sporadique. Alors que, les aminoglycosides n'ont pas été analysés par la méthode UPLC-MS/MS en raison de leur LMR relativement élevée en comparaison avec celle de la viande. Principalement, la sensibilité de Delvotest SP-NT pour dihydro-streptomycine et streptomycine est plus haute que LMR et plus bas que LMR pour néomycine. Ce dernier, pourrait présenter dans les 20 échantillons qui ont été trouvés positifs avec les deux méthodes. Les niveaux supérieurs de contamination des échantillons de lait par les résidus d'antibiotiques sont expliqués essentiellement par l'utilisation massive et incontrôlée des préparations pharmaceutiques intra-mammaires pour le traitement et la prévention de mammite bovine, tandis que les délais d'attente après traitement n'ont pas été correctement respectés. Une autre raison pourrait être liée à cette contamination est l'addition volontaire des inhibiteurs de croissance bactériens

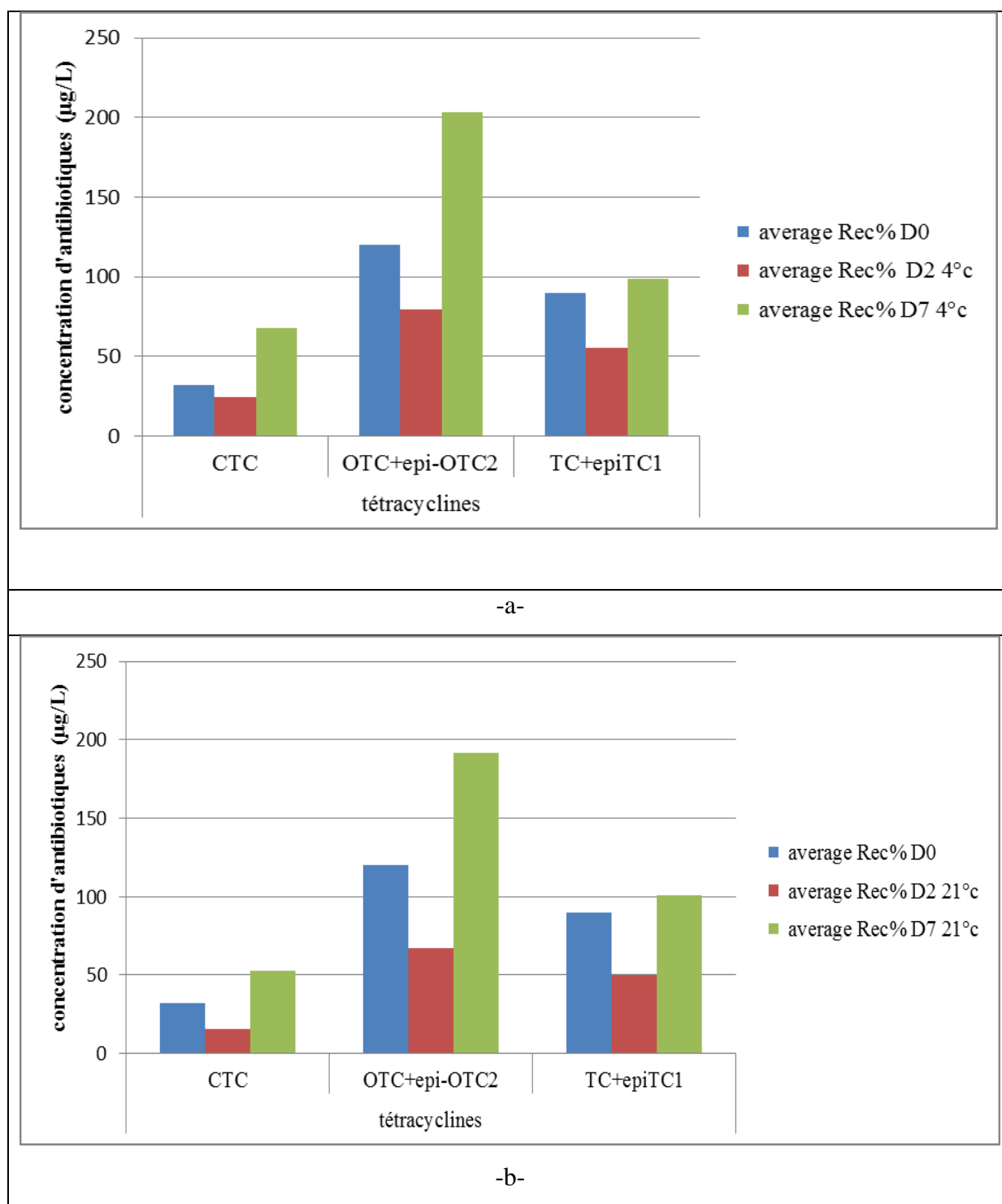
(des antibiotiques, antiseptiques) pour arrêter la croissance microbienne et stabiliser la qualité microbienne de lait (Zinedine et al., 2007). Une autre argumentation est supportée par l'étude de Reybroeck, (2010) où il a été stipulé que la raison principale de la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait était la traite accidentelle des vaches traitées qui ont passé inaperçues à 66 % des cas et la non - la conformité de délais de retrait à 41 % des cas.

En conclusion, l'UPLC-MS/MS est une méthode nettement plus sélective et plus sensible que les méthodes microbiologiques car elle permet d'identifier les molécules séparément et donc d'éviter les problèmes d'interférences possibles entre les substances (Boatto et al., 1998). Malgré le coût très élevé de ces instruments, le gain de temps réalisé permet de les rentabiliser lorsque le nombre d'échantillons testés est grand (Bergogne-Berizin et Dellamonica, 1999).

## 5. Résultats de la stabilité des antibiotiques dans le lait pendant conservation

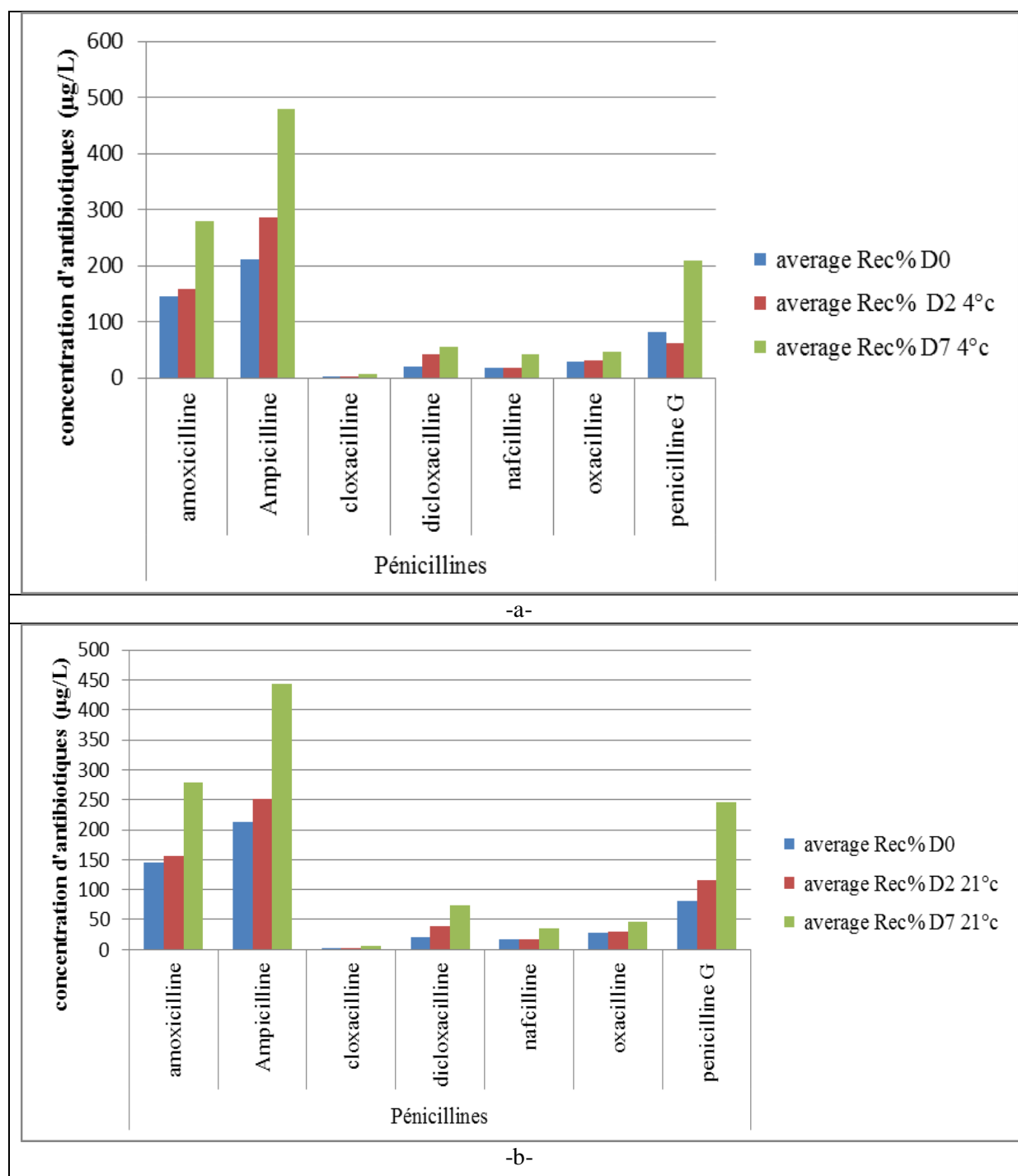
Le but de cette expérience était de déterminer l'effet de températures différentes et de temps de conservation sur la concentration des antibiotiques dans le lait en employant l'UPLC-MS/MS. Selon les résultats obtenus (figures 22, 23, 24, 25 et 26), aucune dégradation n'a été marquée pour les antibiotiques présents dans les échantillons du lait blanc fortifiés pendant les deux premiers jours de conservation à des températures différentes (4°C et 21°C). Tandis qu'une augmentation significative de la concentration de ces antibiotiques a été observée après conservation pendant 7 jours à 4 °C et à 21 °C. Pour la plupart des antibiotiques, cette différence était significative indépendamment de la température à laquelle le lait a été stocké alors que pour certains antibiotiques était non significative ( $p > 0.05$ ). Ceci était pour neospyramycine, sulfamethoxypyridazine, sulfaquinoxaline, oxytétracycline (OTC) et tétracycline (TC) à 4 °C; pour pénicilline G, triméthoprime à 21°C et pour: tylosine, dicloxacilline, sulfapyridine, sulfisoxazole dans les deux températures. Les résultats n'ont aussi montrés aucune différence significative entre les concentrations d'antibiotiques présents dans les échantillons de lait conservés 2 jours dans les deux températures. Cependant, après l'analyse des échantillons conservés pendant 7 jours une différence significative entre certains antibiotiques a été observée. À 21°C après 7 jours il était possible de mesurer significativement plus d'antibiotiques, neospyramycine, spyramicine, cloxacilline, dicloxacilline, pénicilline G, sulfacetamide, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfamoxole. Une évaluation de l'effet des deux températures 4°C et à 21°C sur la concentration des antibiotiques présents analysés en même jours d'analyse a été réalisée. A partir de ses

résultats tous ces antibiotiques à titre d'exemple l'oxytétracycline, tétracycline, ampicilline, sulfadoxine et sulfadimidine ont été détectés au deuxième jour de conservation à 4°C mieux qu'à 21°C alors qu'une augmentation de concentration a été remarquée pour les macrolides à 21°C mieux qu'à 4°C. Parallèlement, Les résultats du septième jour de conservation ont montrés qu'aucune différence n'a été enregistrée entre les concentrations à 4°C et à 21°C pour les quinolones et les macrolides bien que les sulfamides ont été plus détectés à 4°C qu'à 21°C. Ainsi une analyse des échantillons conservés à -20°C après 1mois (j30), 2mois (j60) et 3mois (j90) a été effectuée et une comparaison entre ses résultats a révélé qu'une dégradation remarquable a été enregistrée après 3mois de conservation pour sulfaguanidine, sulfamérazine, sulfaméthoxy-pyridazine, sulfapyridine, sulfathiazole, tétracycline et marbofloxacin alors que les pénicillines ont été plus stables et ont présentés des valeurs élevées après 3mois de conservation (ces résultats sont consignés dans l'annexe 03).



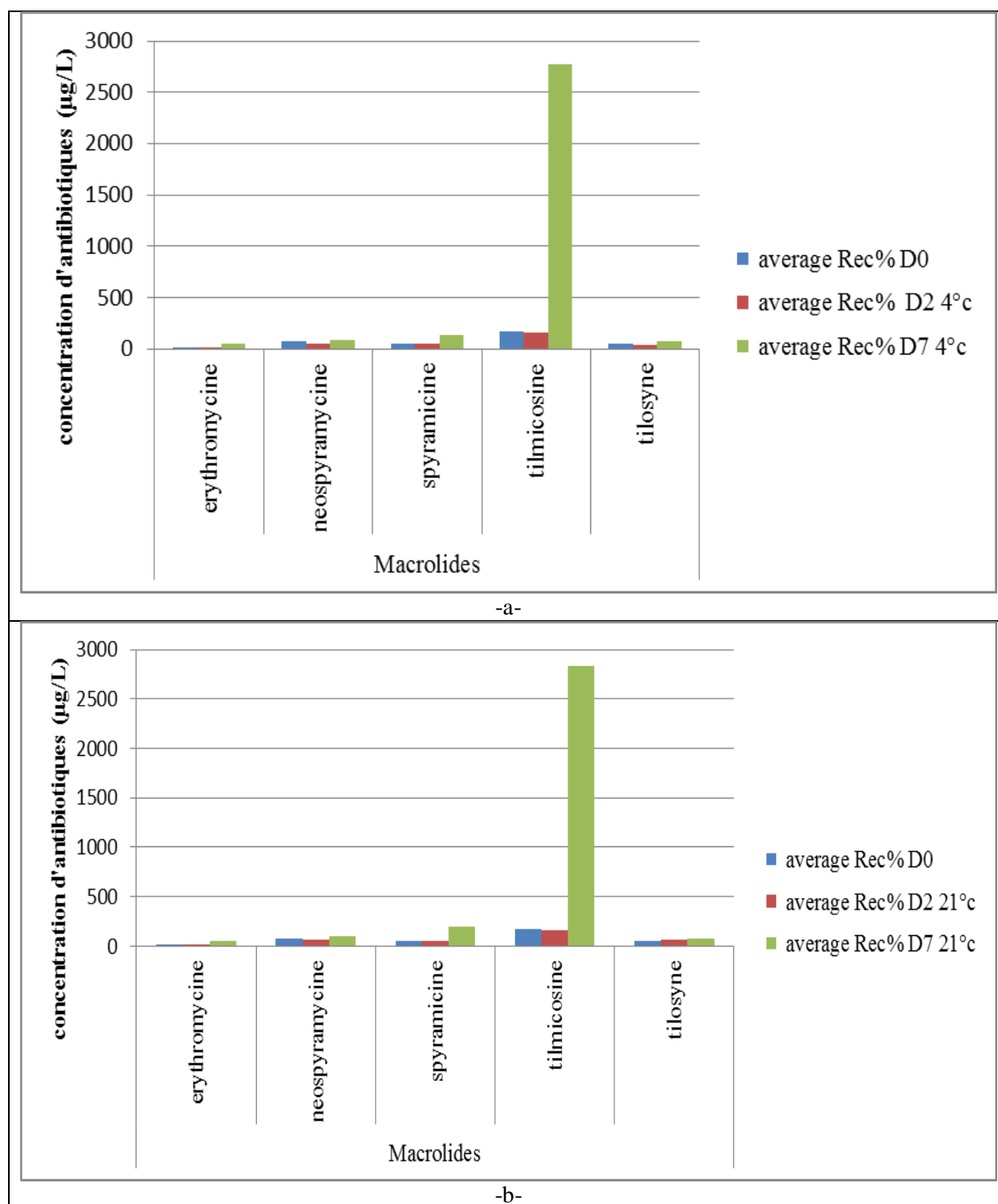
**Figure 22:** Estimation de la concentration des tétracyclines dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).

Average Rec% : (Moyenne des Rendement), D : jour

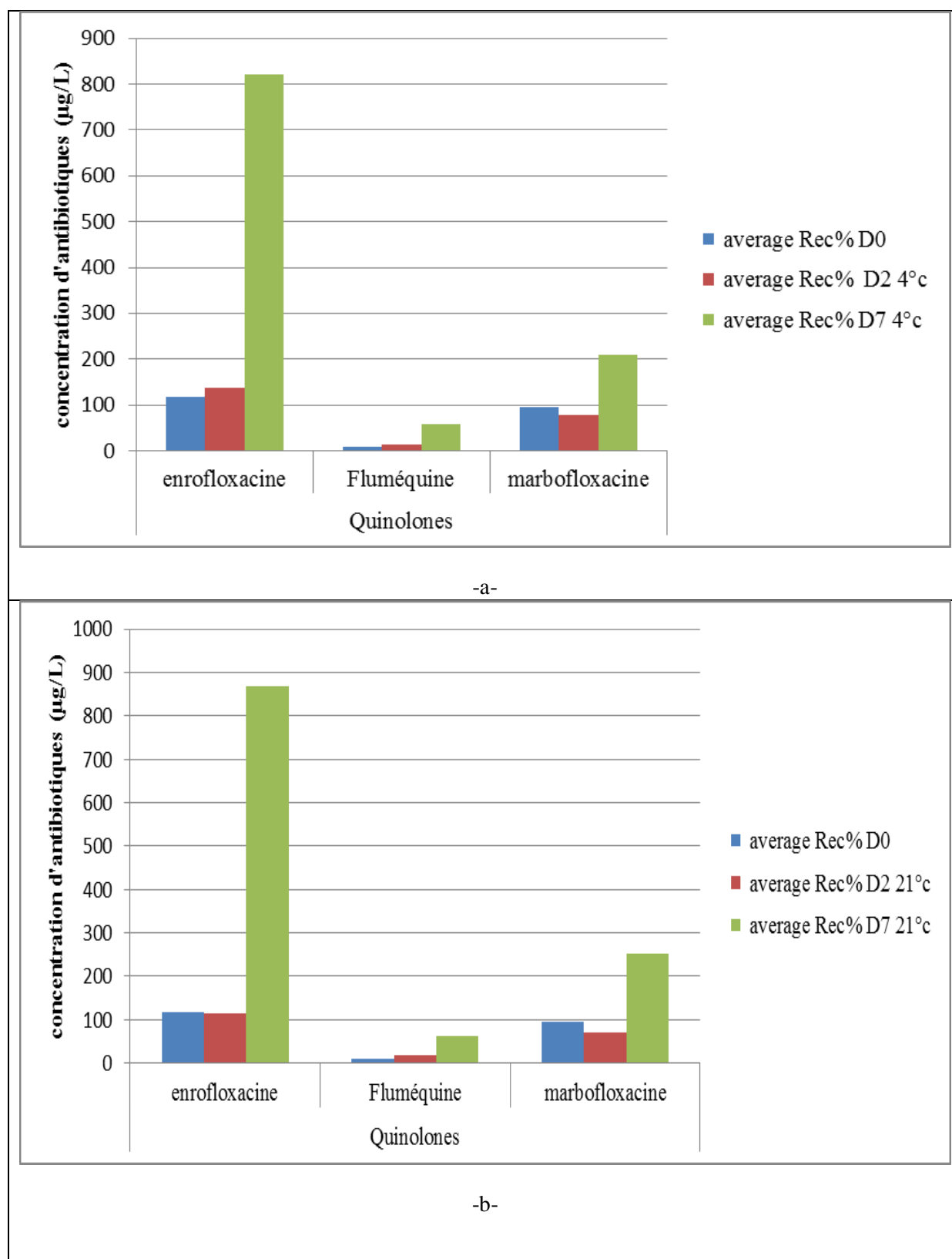


**Figure 23:** Estimation de la concentration des pénicillines dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).

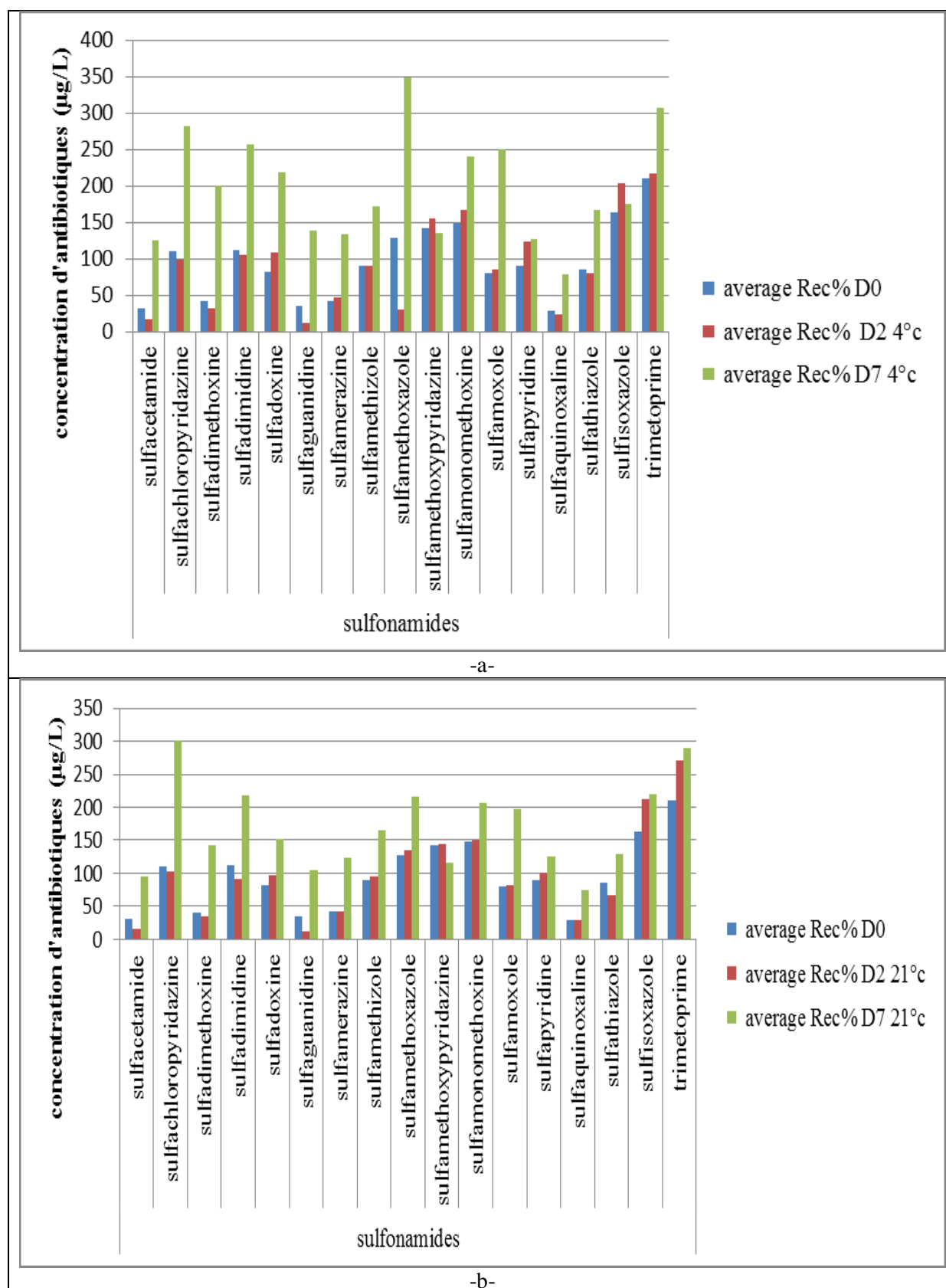




**Figure 24:** Estimation de la concentration des macrolides dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).



**Figure 25:** Estimation de la concentration des quinolones dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).



**Figure 26:** Estimation de la concentration des sulfamides dans des échantillons de lait conservés à 4°C (a) et 21°C (b) durant deux périodes de temps (2 et 7 jours).

Dans la littérature, La stabilité de cinq antibiotiques majeurs des  $\beta$ -lactames (l'amoxicilline, ampicilline, cloxacilline, oxacilline et la pénicilline G) dans le lait fortifié et dans des extraits de lait préparés pour l'analyse LC-MS/MS a été étudiée au changement de températures à froid (4, -20 et -76 °C). Le stockage d'échantillons de lait à 4 °C a abouti aux pertes mesurables de tous les  $\beta$ -lactames après 6 jours (> 50 % dans la plupart des cas). La dégradation lente de pénicilline G, cloxacilline et oxacilline a été observée dans le lait stocké à -20 °C, mais aucune perte n'a été enregistrée à -76 °C plus de 4 semaines (Riediker et al., 2004). Roca et al., (2011) ont signalé que l'augmentation de la température de 60°C à 100°C a diminué la demi-vie d'amoxicilline (372 à 50 min), ampicilline (741 à 26 min), cloxacilline (367 à 46 min) et la pénicilline G (382 à 43 min). Les traitements thermiques à hautes températures et longues durées (par exemple, 120°C pendant 20min) ont mené à la dégradation supplémentaire des antibiotiques  $\beta$ -lactames avec des pourcentages près de 100 % pour cefoperazone et cefuroxime. En revanche, quand le lait a été soumis aux traitements thermiques à basses températures et des temps courts (par exemple, 72°C pour 15 s), la dégradation de  $\beta$ -lactames dans le lait n'a pas excédé 1% pour les 10 antibiotiques testés. Alors que, Grunwald et Petz, (2003) ont indiqué que les facteurs principaux menant à la diminution de résidus des pénicillines sont la température pendant le traitement thermique (90 °C, 15 minute) du lait avant que les cultures de yaourt ont été ajoutées, l'attachement des pénicillines aux protéines de lait, le temps et la température de fermentation et l'influence des cultures initiales. Tandis que, Rizwan et al., (2014) ont trouvé que 5% des échantillons du lait bouillés collectés à Pakistan sont contaminés avec pénicilline.

Les résultats de Roca et al., (2010) ont montré que les quinolones sont très résistants aux différents traitements thermiques avec les pertes maximales de concentration de 12.71% pour ciprofloxacine et 12.01% pour norfloxacine à 120 °C et 20 min. Ces résultats sont supportés par ceux de Fisher et al., (2010) qui ont trouvé que tous les antibiotiques (quinolones) exposent la stabilité haute thermique; chaque composé a une base thermodynamique différente pour la stabilité. Par conséquent, la haute stabilité de quinolones représente un risque significatif à la santé humaine parce que les résidus de ces antibiotiques peuvent rester dans le lait après le traitement thermique et, donc, peuvent atteindre l'industrie laitière et les consommateurs (Roca et al., 2010). Les résultats obtenus par Abbasi et al., (2011) ont révélé que 24.4%, 30 % et 28.6 % des échantillons du lait pasteurisés, et stérilisés, avaient respectivement des résidus tétracyclines supérieurs aux niveaux maximaux recommandés (100ng/g). Ainsi que, Rizwan et al., (2014) ont trouvé que 5% des échantillons du lait bouillés

sont contaminés avec oxytétracycline et cela indique que les tétracyclines persistent dans le lait même après Pasteurisation. Roca et al., (2013) ont examiné la cinétique de la dégradation de huit sulfamides dans le lait écrémé chauffé à 60, 70, 80, 90 et 100°C avec LC-MS/MS. L'Application d'équations cinétiques aux différents traitements thermiques utilisés dans le traitement de laiterie indique que les sulfamides sont très stables pendant la pasteurisation (63°C; 30 min et 72°C; 15 s) aussi bien que l'UHT stérilisation (140 °C; 4 s). Au contraire, les calculs exécutés avec le modèle cinétique ont évalué des pertes dans des concentrations entre 6.5 % (sulfadiméthoxine) et 85.1 % (sulfaméthazine) pour la stérilisation à 120 °C pendant 20 min. Tandis que, pour les macrolides aucune information n'a été trouvée sur leur stabilité dans le lait.

# Conclusion

### *Conclusion*

L'utilisation des médicaments vétérinaires constitue le premier réflexe des éleveurs. Si le but de leur utilisation est de sécuriser les productions et de mieux extérioriser les potentialités animales, il existe cependant de nombreux problèmes liés à cette pratique. L'emploi non contrôlé et abusif des antibiotiques chez les vaches laitières conduit à leurs présence sous forme de résidu dans le lait. Or, ces résidus constituent une préoccupation majeure tant pour les consommateurs et les services officiels sur le plan sanitaire que pour les industriels sur les plans technologique, commercial et médiatique. Pour l'industrie laitière, dont l'objectif est de disposer d'une matière première conforme aux exigences réglementaires et apte à subir une transformation, il est nécessaire de dépister les résidus d'antibiotiques dans le lait à chaque collecte. Les éleveurs restent le maillon principal pour la qualité des denrées alimentaires d'origine animale ainsi que les vétérinaires qui ont une place centrale dans la maîtrise de l'utilisation des antibiotiques en santé animale. Ils interviennent notamment au stade de la conception, du développement, de l'autorisation de mise sur le marché du médicament vétérinaire antibiotique, mais aussi et surtout dans sa distribution, son administration ainsi que dans le contrôle des bonnes pratiques de son utilisation. Egalement, Les autorités prennent une grande part de responsabilité lors d'absence d'une législation rigoureuse et stricte relative à l'utilisation des médicaments vétérinaires et qui reste sommaire faute de ressources financières et humaines.

Vue les risques que cause la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale et le manque d'un contrôle officiel, l'objectif de cette étude était d'évaluer les niveaux de contamination dans la région de Guelma d'une denrée alimentaire largement utilisée qui est le lait sous deux formes cru et lben par deux méthodes Delvotest SP-NT et UPLC-MS/MS. D'après les résultats obtenus, il s'avère que 65.5 % des échantillons de lait local étaient contaminés par des résidus d'antibiotiques autorisés à des niveaux supérieurs à la LMR, des résidus qui ne possèdent pas de MRL, ou même des résidus qui sont interdits d'utilisation chez les animaux producteurs du lait.

La corrélation entre les résultats obtenus par les deux méthodes a révélé que le test d'inhibition microbiologique Delvotest SP-NT ne pourrait être fiable dans des conditions comme celles en Algérie pour une détection précise des résidus d'antibiotiques dans le lait. Tandis que, l'UPLC-MS/MS a présenté une détection alternative avec une possibilité d'une

## *Conclusion*

---

investigation profonde de chaque type d'antibiotique en appliquant une extraction spécifique afin d'augmenter la sensibilité de la méthode et diminuer la limite de détection (LOD).

Subséquentement, une méthode analytique de LC-MS/MS polyvalente est prête d'être utilisée dans un Plan National de Control des Résidus en Algérie pour surveiller et déterminer la présence des multi-résidus d'antibiotiques dans le lait et autres matrices des denrées alimentaires après optimisation.

Les résultats de cette recherche ont révélé non seulement la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait cru, mais aussi et pour la première fois la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait transformé, en l'occurrence le lben.

### **Perspectives**

Le statut actuel de la qualité du lait de la wilaya de Guelma vis-à-vis de la contamination par les résidus d'antibiotiques explique l'absence totale d'un contrôle alimentaire. Cette situation est préoccupante et certaines mesures doivent être réalisées:

La mise en place d'un plan national de contrôle rigoureux pour la recherche des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale au sein des fermes, des usines et des points de ventes afin de rassurer la sécurité du consommateur. Une pénalisation sur un lait contaminé peut freiner l'utilisation anarchique de ces médicaments.

Le renforcement des laboratoires de recherche de matériels d'analyse plus développés tels que l'UPLC-MS/MS facilite l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en même temps.

Ce travail pourra être poursuivi par l'élargissement de la recherche à d'autres molécules d'antibiotiques.

L'étude de la stabilité des résidus d'antibiotiques dans le lait dans différentes conditions et une compréhension de l'effet de leur présence sur l'émergence de la résistance bactérienne semble être deux thématiques de recherche très importantes à prendre en considération par les futurs chercheurs.



# **Références bibliographiques**

Références bibliographiques

- Aalipour F., Mirlohi M., Jalali M., Azadbakht L. (2015).** Dietary exposure to tetracycline residues through milk consumption in Iran, *J Environ Health Sci Eng*, 13:80, doi:10.1186/s40201-015-0235-6.
- Abbasi M M., Babaeil H., Ansarin M., Nourdadgar AS., Nemati M. (2011).** Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL Method, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(1): 34-39.
- Adrian J., Potus J., Frangne R. (1995).** La science alimentaire de A à Z, Lavoisier TEC & DOC, Paris, 477.
- Aggad H., Mahouz F., Ammar YA., kihal M. (2009).** Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest Algérien, *Rev de Méd Vét*, 160: 590-595.
- Althaus R.L., Torres A., Montero A., Balasch S., Molina MP. (2003).** Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest Photometric Measurements, *J Dairy Sci*, 86: 457–463.
- Amer A. M. M., Constable P.D., Goudah A., El Badawy S. A. (2012).** Pharmacokinetics of tulathromycin in lactating goats, *Small Ruminant Research*, 108 (1–3): 137–143.
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R. (2002).** Composition, propriétés physico chimiques, valeur nutritive, qualité technologiques et techniques d'analyse du lait dans Carole Lapointe-Vignola, *Science et technologie du lait: transformation du lait*, Fondation de technologie laitière du Québec, Presses International Polytechnique, 1-68.
- ANDI (Agence Nationale de développement de l'Investissement). (2015).** Wilaya de Guelma, <http://www.andi.dz/PDF/monographies/Guelma.pdf>.
- Appicciafuoco B., Dragone R., Frazzoli CH., Bolzoni G., Mantovani A., Ferrini A. M. (2015).** Microbial screening for quinolones residues in cow milk by bio-optical method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, SI: Analytical approaches, 106: 179–185.
- Barbut F., Petit J. C. (2007).** Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques, dans infectiologie par: Collignon A., Leymarie M. B., Farinotti R., Doutremepuich C, 3<sup>ème</sup> édition, 346-362.

- Belhadia M., Yakhlef H., Kouache B. (2011).** Filière lait, performances et insuffisances de la production et de la collecte du lait cru, cas des élevages bovins laitiers dans la région du haut Chéiff, papier présenté dans le Premier Séminaire National sur le lait et ses dérivés : « entre réalité de production et réalités de transformation et de consommation », Université de Guelma, Algérie, 4-5 Octobre 2011.
- Belhadia M., Saadoud M., Yakhlef H., Bourbouze A. (2009).** La production laitière bovine en Algérie: Capacité de production et typologie des exploitations des plaines du Moyen Cheliff, *Revue Nature et Technologie*, 01 : 54-62.
- Beltran M.C., Berruga M.I., Molina A., Althaus R.L., Molina M.P. (2015).** Performance of current microbial tests for screening antibiotics in sheep and goat milk, *International Dairy*, 41: 13- 15.
- Ben-Mahdi M., Ouslimani S. (2009).** Mise en évidence des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérois, *European Journal of Scientific Research*, 36 (3): 357-362.
- Bencharif A., (2001).** Stratégie des acteurs de la filière lait en Algérie : état des lieux et problématiques, Option Méditerranéenne, Série : B/n032-les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée, 28.
- Benkerroum N., Tamime A.Y. (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale, *Food. Microbiol.*, 21:399–413.
- Bergogne-Berizin E., Dellamonica P. (1999).** Antibiothérapie en pratique Clinique, 2<sup>ème</sup> édition, Masson : 496.
- Bilandzic N., Kolanovic B.S., Varenina I., Scortichini G., Annunziata L., Brstilo M., Rudan N. (2011).** Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia, *Food Control*, 22: 1941-1948.
- Boatto G., Cerri R., Pau A., Palomba M., Pintore G., Giovanna D.M. (1998).** Monitoring of benzylpenicillin in ovine milk by HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17: 733-738.
- Borràs S., Companyó R., Granados M., Guiteras J. (2011).** Analysis of antimicrobial agents in animal feed, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30 (7): 1042-1064.

**Bories G., Louisot P. (1998).** Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale, rapport effectué par le président de la Commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale et la président du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Conseil supérieur d'hygiène publique de France : 3-21.

**Bouazouni O., (2008)** Etude d'impact des prix des produits alimentaires de base sur les ménages pauvres algériens, une étude pour le compte du programme alimentaire mondial, disponible en : <http://home.wfp.org/stellent/groups/public/documents/ena/wfp194575.pdf>.

**Boultif L., (2015).** Détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (HPLC), thèse de Doctorat: Université Mentouri Constantine, Algérie, 156.

**Brouillet P., (1994).** Maîtrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait, Recueil de médecine vétérinaire, 170 : 443-454.

**Burgat-Sacaze V., Petit C. (1983).** Antibiothérapie intramammaire : notions pratiques de pharmacocinétique, Rec. Méd. Vét, 159 (6) : 561-573.

**Cazet L. M. D., (2007).** Bilan du taux de contamination et étude Préparatoire au dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le lait de grand mélange bovin, thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, Université Claude-Bernard - Lyon I : 44-121.

**Chambers H.F., Sande M.A. (1998).** Médicaments antimicrobiens: Considération générales, dans les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments par Goodman et Gilman, 9<sup>ème</sup> édition, Mc Graw-Hill : 1027-1068.

**Charfaoui M., Mekersi S., Amroun M. (2003).** Le programme national de réhabilitation de la production laitière : objectifs visés, contenu, dispositif mise en oeuvre et impact obtenus: 12.

**Claps S., Morone G. (2011).** Produits laitiers et fromagers traditionnels de l'Algérie, développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie, CorFilac: 57-77.

**Clive P. P., Curtis M.J., Walker M.J., Sutter M.C., Hoffman B.B. (1999).** Pharmacologie intégrée traduction de la première édition anglaise par Georges C., avec collaboration de Jacques D., De BOECK Université : 606.

**Commission Decision (2002/657/EC).** Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, Official Journal of the European Communities, L 221: 8-36.

**Commission Regulation (EU N° 37/2010).** Text with EEA relevance of 22/12/2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Communities, L 15: 1-72.

**Commission Regulation (EU N° 2377/1990).** Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Communities, L224.

**Community Reference Laboratories Residues (CRLs). (2010).** Guidelines for the Validation of Screening Method for residues of Veterinary Medicines (Initial Validation and Transfer), 1-15.

**Comunian R., Paba A., Dupré I., Daga E.S., Scintu M.F. (2010).** Evaluation of a microbiological indicator test for antibiotic detection in ewe and goat milk, Journal of Dairy Science, 93: 5644-5650.

**Council Regulation No 1831/2003.** Of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, Official Journal of the European Union, L268 : 29- 43.

**CVMP Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (EMA /CVMP /380628 /2014). (2015).** European public MRL assessment report (EPMAR) tylvalosin (eggs), European Medicines Agency, 8.

**CVM Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine. (2015).** Milk drug residue sampling survey, 25. Disponible en : <http://www.fda.gov/>.

**Décret exécutif n° 14-366 du 22 Safar 1436 correspondant au 15 décembre 2014. (2014).** fixant les conditions et les modalités applicables en matière de contaminants tolérés dans les denrées alimentaires, Journal Officiel de la République Algérienne, 74 : 13-14.

**Demoly P., Bousquet J., Godard P., Michel F.B. (2000).** Actualité des allergies médicamenteuses issues des antibiotiques et médicaments antirétroviraux, Bull. Acad. Nationale Méd, 184 (4): 761-774.

**DSM food Specialties B.V (Netherlands). (2012).** Bulletin technique Delvotest® SP NT, 1. Disponible en :

<https://www.hygielim.com/Assets/Client/images/HYGIALIM/Schema/1008123.pdf>.

**Duboi M., Fluchard D., Sior E., Delahaut P. (2001).** Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, Journal of chromatography B, 753, 189-202.

**Enriquez B.J., Boulouis H.J. (1990).** Pharmacocinétique des anti-infectieux Rec. Méd. Vét, 166 : (3), 205-223.

**Fabre J.M., Bouquet O., Petit C. (2006).** Extrait du livre : Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, 25-47.

**Fabre J.M., Moretain J.P., Berthelot X. (2002).** Evolution de la méthode interprofessionnelle de recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait, Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires, 15 : 172-178.

**Ferrini A.M., Agrimi U., Appicciafuoco B., et al. (2015).** PT as a tool to point out criticalities in the strategy for control of antibiotic residues in milk: the Italian experience, Accred Qual Assur, 20 (4): 267–272, doi:10.1007/s0076901511272.

**Fiscus-Mougel F., (1993).** Les résidus d'antibiotiques à usage vétérinaire dans le lait et la viande, thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Claude Bernard, Lyon. n°53 : 84.

**Fisher N. R., Purnell C. B., Kang J. (2010).** Comment on effect of heating on the stability of quinolones in milk, J. Agric. Food Chem, 58 (24): 13020–13021, Doi: 10.1021/jf1034724.

**Freitas A., Barbosa J., Ramos F. (2013).** Development and validation of a multi residue and multiclass ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk, Int Dairy J, 33(1):38–43.

**García N.D., Junza A., Zafra-Gomez A., Barron D., Navalon A. (2016).** Simultaneous determination of quinolone and b-lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis, *Food Control*, 60: 382-393.

**Ghazi K., Niar A. (2011).** Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la wilaya de Tiaret (Algérie), *TROPICULTURA* : 193-196.

**Giraudet C., (1978)** Etude de la prophylaxie des accidents de fromagerie dus à une contamination du lait à la ferme par des germes de souillure, thèse de Doctorat vétérinaire, Toulouse:77.

**Granja R., Andreia C., de Lima A.C.G., Salerno A.G., Wanschel A. C. (2012).** Validation of a liquid chromatography with ultraviolet detection methodology for the determination of sulfonamides in bovine milk according to 2002/657/EC, *Food Control*, 28 (2): 304–308.

**Griffoul B. (2007).** Une production laitière fortement dépendante des importations, *Réussir Lait Élevage*: 2-3.

**Grunwald L., Petz M. (2003).** Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt, *Analytica Chimica Acta*, 4th International Symposium on Hormone and Veterinary Residue Analysis, 483 (1-2): 73–79.

**Guillemot M.D., et al. (2006).** Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, Document AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments) : 49-55.

**Hakem A., Yabrir B., kheleF D., Laoun A., Mouffok F., El-gallas N., Titouche Y., Ben-aissa R. (2012).** Evaluation of Microbial Quality of Raw Milk into two Dairies Mitidja's Farms (Algeria), *Bulletin USAMV, Veterinary Medicine*, 69 (1- 2): 1843- 5262.

**Han R.W., Zheng N., Yu Z.N., Wang J., Xu X.M., Qu X.Y., Li S.L., Zhang Y.D., Wang J.Q. (2015).** Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS, *Food Chemistry*, 181: 119 –126.

**Heeschen W.H., Blüthgen A. (1990).** Veterinary drugs and pharmacologically active compounds residues and contaminants in milk and milk products, 9101: 16-39.

**Hennart S.L., Faragher J.J. (2012).** Validation of the Delvotest SP NT DA, Performance Tested Method 011101, AOAC Int, 95(1): 252-60.

**Hillerton J.E., Halley B., Neaves P., ROS M. (1998).** Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor tests, Journal of Dairy Science, 82:704–711.

**Holstage D.M., Punchner B., Whitehead G., Galey F.D. (2002).** Screening and mass spectral confirmation of b-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS, J Agric Food Chem, 16:406e11. DOI: 10.1021/jf010994s.

**Hou X.L., Chen G., Zhu L., Yang T., Zhao J., Wang L., Wu Y.L. (2014).** Development and validation of an ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk, Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and life sciences, 962: 20-29.

**Hsieh M. K., Shyu C.L., Liao J.W., Franje C.A., Huang Y.J., Chang S.K., Shih P.Y., Chou C. C. (2011).** Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity, VET MED-CZECH, 56 (6): 274–285.

**Jank L., Martins M.M., Arsand J.B., Motta T.M.C., Hoff R. B., Barreto F., Pizzolato T.M. (2015).** High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid–liquid ex-traction technique and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis (LC–MS/MS), Talanta, 144: 686 - 695.

**Jank L., Martins M.T., Arsand J.B., Magalhães T., Motta C., Feijó T.C., Castilhos T. S., Hoff R.B., Barreto F., Pizzolato T.M. (2017).** Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: Development and validation, Food Analytical Methods, 1–13, doi: 10.1007/s12161-016-0755-4.

**Junza A., Dorival-García N., Zafra-Gómez A., Dolores B., Oscar B., José Barbosa B., Alberto N. (2014).** Multiclass method for the determination of quinolones and  $\beta$ -lactams, in raw cow milk using dispersive liquid–liquid microextraction and ultra-high performance



liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*; 1356:10–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma>.

**Kabir A., (2015).** Contraintes de la production laitière en Algérie et évaluation de la qualité du lait dans l'industrie laitière (constats et perspectives), thèse de doctorat en Sciences en Microbiologie, Université d'Oran 1 (Ahmed Ben Bella). Algérie : 153.

**Kacimi S., (2013)** La dépendance alimentaire en Algérie: Importation de lait en poudre versus production locale, quelle evolution? *Mediterranean Journal of Social Sciences MCSER Publishing, Rome-Italy*, 4 (11). Doi:10.5901/mjss.v4n11:152.

**Kassaify Z., Abi Khalil P., Sleiman F. (2013).** Quantification of antibiotic residues and determination of antimicrobial resistance profiles of microorganisms isolated from bovine milk in Lebanon, *Food and Nutrition Sciences*, 4: 1-9.

**Khaskheli M., Malik R.S., Arain M.A., Soomroand A.H., Arain H.H. (2008).** Detection of beta-lactam antibiotic residues in market milk, *Pak J Nutr*, 7: 682-685, doi: 10.3923/pjn.682.685.

**Labie C.H., (1981).** Dispositions législatives destinées à éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait, *Recueil de médecine vétérinaire*, 157 : 161-167.

**Lagrange L., (1989).** La commercialisation des produits agricoles et agroalimentaires, Lavoisier TEC & DOC, Paris, p 333.

**Laurentie M., Sanders P. (2002).** Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 15 : 197-201.

**Le Breton M.H., Savoy-Perroud M.C., Diserens J.M. (2007).** Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk, *Analytica Chimica Acta*, 586: 280–283.

**Le Minor L., (1982).** *Bactériologie médicale*, édition: Flammarion médecine- sciences, 773.

**Maillard R., (2002).** Antibiothérapie respiratoire, *La Dépêche Vétérinaire*, 80 : 15-17.

**Martins M.T., Melo J., Barreto F., Hoff R.B., Jank L., Bittencourt M.S., Arsand J.B., Schapoval E.E.S. (2014).** A simple, fast and cheap non-SPE screening method for

antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, 129: 374-383.

**Martins M.T., Barreto F., Hoff R.B., Jank L., Arsand J.B., Motta T.M.C., Schapoval E.E.S. (2016).** Multiclass and multi-residue determination of antibiotics in bovine milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis, *International Dairy Journal*, 59: 44–51.

**Mechai A., Kirane D. (2008).** Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk “Raïb”, *African Journal of Biotechnology*, 7 (16): 2908-2914.

**Meng Z., Shi Z., Liang S., Dong X., Li H., Sun H. (2015).** Residues investigation of fluoroquinolones and sulfonamides and their metabolites in bovine milk by quantification and confirmation using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, 179: 597-605.

**Mensah S.E.P., Koudandé O.D., Sanders P., Laurentie M., Mensah G.A., Abiola F.A. (2014a).** Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: public health risks, *Scientific and Technical Review (International Office of Epizootics)*, 33 (3): 26.

**Mensah S.E.P., Aboh A.B., Salifou S., Mensah G.A., Sanders P., Abiola F.A., Koudandé O.D. (2014b).** Risques dus aux résidus d’antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin, *Journal of Applied Biosciences*, 80: 7102 – 7112.

**Merad M., Merad R. (2001).** Toxicité des antibiotiques, *Médecine du Maghreb*, 91: 5.

**Mourot D., Loussouarn S. (1981).** Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire *Rec. Méd. Vét.*, 157:2. 175-177.

**Navrátilová P., Ivanaová I.B., Vyhnálková J., Vorlová L. (2011).** Fluoroquinolone residues in raw cow’s milk, *Czech J. Food Sci.*, 29 (6): 641–646.

**Nebot C., Regal P., Miranda J.M., Fente C., Cepeda A. (2013).** Rapid method for quantification of nine sulfonamides in bovine milk using HPLC/MS/MS and without using SPE, *Food Chemistry*, 141(3, 1): 2294–2299.

**Nikolić N., Mirecki S., Blagojević M. (2011).** Inhibitory substances in raw milk, *Mljekarstvo*, 61(2):182–7.

**NMC (National Mastitis Council). (1990).** Traduit de: Procedures for Collecting Milk Samples D'après: "Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection", 3rd Edition, disponible en: [www.reseaumammite.org](http://www.reseaumammite.org).

**Ouadghiri M. (2009a).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine, thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire, Université Mohammed V–agdal Faculté des sciences Rabat, Maroc : 132.

**Ouadghiri M., Vancanneyt M., Vandamme P., Naser S., Gevers D., Lefebvre K., Swings J., Amar M. (2009b).** 14 Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 15 'lben', *J Appl Microbiology*, 106:486–95.

**Pereira R.V., Siler J.D., Bicalho R.C., Warnick L.D. (2014).** Multiresidue screening of milk withheld for sale at dairy farms in central New York State, *Journal of Dairy Science*, 97: 1513–1519.

**Petrović J.M., Katić V.R., Bugarski D.D. (2008).** Comparative examination of the analysis of  $\beta$ lactam antibiotic residues in milk by enzyme, receptor–enzyme, and inhibition procedures, *Food Anal Methods*, 1:119–25. doi: 10.1007/s121610079007y.

**Pikkemaata M.G., Rapallinib M.L.B.A., Oostra-van Dijka S., Elferinka J.W.A. (2009).** Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples, *Anal Chim Acta*, 637:1–2, doi: 10.1016/j.aca.2008.08.023.

**Pogurschi E., Ciric A., Zugrav C., Patrascu D. (2015).** Identification of antibiotic residues in raw milk samples coming from the Metropolitan Area of Bucharest, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6: 242 – 245.

**Rama A., Lucatello L., Benetti C., Galina G., Bajraktari D. (2016).** Assessment of antibacterial drug residues in milk for consumption in Kosovo, *journal of food and drug analysis*, 1-8.

**Ramirez A., Gutiérrez R., Diaz G., Gonzalez C., Pérez N., Vega S., Noa M. (2003).** High-performance thin-layer chromatography- bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. *Journal of Chromatography B*.784: 315-322.

**Reig M., Toldra F., (2008).** Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection, *Meat Science*, 78 (1-2): 60-67.

**Reybroeck W., (2010)** Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey, Doctorat dissertation, Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent.

**Rhodes G., Huys G., Swings J.M.C., Gann P., Hiney M., Smith P., Pickup R.W. (2000).** Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between Aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A, *Appl. Environ. Microbiol*, 66: 3883-3890.

**Riediker S., Andreas R., Stadler R.H. (2004).** Cold-temperature stability of five  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis, *Journal of Chromatography A Food Science*, 1054 (1–2): 359–363.

**Rizwan M.M., Shafqat ullah., Bacha N. (2014).** Screening of fresh, boiled and Pasteurized milk for Aflatoxin-M1 contamination and antibiotic residues in Pakistan, *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 9 (1): 51-56.

**Roca M., Castillo M., Marti P., Althaus R. L., Molina M. P. (2010).** Effect of heating on the stability of quinolones in Milk, *J. Agric. Food Chem*, 58(9): 5427–5431.

**Roca M., Villegas L., Kortabitarte M.L., Althaus R.L., M.P. Molina. (2011).** Effect of heat treatments on stability of  $\beta$ -lactams in milk, *Journal of Dairy Science*, 94 (3):1155–1164.

**Rocaa M., Althaus R.L., Molina M.P. (2013).** Thermodynamic analysis of the thermal stability of sulphonamides in milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry detection, *Food Chemistry*, 136 (2) 15: 376–383.

**Romnee J .M., (2009).** Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infra-rouge dans la recherche d'antibiotiques dans le lait, thèse de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique, Académie Universitaire Wallonie-Europe, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques De Gembloux, Communauté Française De Belgique : 340.

**Sanders P., (2005).** L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : Enjeux de Santé Publique et de santé animale, *Bulletin de l'académie vétérinaire de France*, 158 (2) : 139-140.

**Schwarz S., Chaslus-Dancla E. (2001).** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance, *Vet. Res*, 32: 201-225.

**Sidak Z., (1967)** Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions, *J Am Stat Assoc*, 62:626–33.

**Sierra D., Sánchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., de la Fe C.I., Guirao I., Gonzalo C. (2009a)**. Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for  $\beta$ -lactams in goat's milk, *Journal of Dairy Science*, 92: 3585–3591.

**Sierra D., Contreras A., Sánchez A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., de la Fe C.I., Guirao I., Gonzalo C. (2009b)**. Short communication: Detection limits of non- $\beta$ -lactam antibiotics in goat's milk by microbiological residues screening tests, *Journal of Dairy Science*, 92: 4200–4206.

**Singleton P., (2008)**. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, 6<sup>ème</sup> édition, DUNOD : 542.

**Stead S.L., Ashwin H., Richmond S.F., Sharman M., Langeveld P.C., Barendse J.P., Stark J., Keely B.J. (2008)**. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest® SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk, *International Dairy Journal*, 18: 3-11.

**Stoltz R. (2008)**. Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : Evaluation et maîtrise de ce danger, thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Université Claude-Bernard - LYON I, France : 117.

**Stora D., (2005)**. Pharmacologie B.P. Classes pharmacologiques, 3<sup>ème</sup> édition, Porphyre : 845.

**Suhren G., Luitz M. (1995)**. Evaluation of microbial inhibitor tests with indicator in micro-titer plates by photometric measurements, *Milchwissenschaft*, 50: 467–470.

**Sulejmani Z., Shehi A., Hajrulai Z., Mata E. (2012)**. Abuse of pharmaceutical drugs-antibiotics in dairy cattle in Kosovo and detection of their residues in milk, *J Ecosyst Ecogr*, 2: 114. Doi: 10.4172/2157-7625.1000114.

**Talnan A., (2013)**. Contrôle des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires d'origine animale: Cas du chloramphénicol dans le lait produit en zone périurbaine de Dakar, Sénégal, thèse de Doctorat en Médecine vétérinaire, Université Cheikh Anta Diop De Dakar, 149.

- Tarzaali D., Dechicha A., Gharbi S., Bouaissa MK., Yamnaine N., Guetarni D. (2008).** Recherche des résidus des tétracyclines et des bêta-lactamines dans le lait cru par le MRL Test (ROSA TEST) à Blida, Algérie, Papier présenté dans : 6èmes Journées Scientifiques Vétérinaires sur le médicament vétérinaire : nouvelles approches thérapeutiques et impact sur la santé publique, E.N.V, Algérie.
- Titouche Y., Hakem A., Houali K., Yabrir B., Malki O., Chergui A., Chenouf N., Yahiaoui S., Labiad M., Ghenim H., Kechih-Bounar S., Chirilă F., Nadăș G., Fiț N.I. (2013).** Detection of Antibiotics Residues in Raw milk Produced in Freha Area (Tizi-Ouzou), Algeria, Bulletin UASVM, Veterinary Medicine, 70: 1843-5378.
- Wang J., Leung D., Lenz S.P. (2006).** Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 2873–2880.
- Wang J., Leung D. (2007).** Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom, 21: 3213- 3222.
- Zamfir M., Vancanneyt M., Makras L., Vaningelgem F., Lefebvre K., Pot B., Swings J., De Vuyst L. (2006).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products, Syst Appl Microbiol, 29(23):487–95.
- Zhang Y.D., Zheng N., Han R.W., Zheng B.Q., Yu Z.N., Li S.L., Zheng S.S., Wang J.Q. (2014).** Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market, Food Control, 36 (1): 238–242.
- Zinedine A., Faid M., Benlemlih M. (2007).** Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique, Revue de Microbiologie Industrielle, Sanitaire et Environnementale, 1 : 1-9.
- Zoubeydi M., Gharabi D. (2013).** Impact du PNDA sur la performance économique des filières stratégiques en Algérie : cas de la filière lait dans la wilaya de Tiaret, Revue Ecologie-Environnement, 9.
- Žvirauskienė R., Šalomskienė J. (2007).** An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk, Food Control, 18:541–7.

# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 01

**Tableau 01** : Comparaison entre les quatre méthodes d'extraction M1 (3mlv), M2 (10mlv), M3 (10mlvm) et M4 (0.5 ml art) par antibiotique.

<b>Antibiotique</b>	<b>Comparaison</b>	<b>Différence</b>	<b>Valeur P</b>
amoxicilline	0,5ml art-10mlv	0.3198	0.0073
amoxicilline	0,5ml art-10ml vm	-0.3971	0.0042
amoxicilline	0,5ml art-3mlv	0.444	0.0001
amoxicilline	10mlv-10ml vm	-0.7169	0.0001
amoxicilline	10mlv-3mlv	0.1242	0.953
amoxicilline	10ml vm-3mlv	0.8411	0.0001
Ampicilline	0,5ml art-10mlv	1.6976	0.0001
Ampicilline	0,5ml art-10ml vm	0.7042	0.0001
Ampicilline	0,5ml art-3mlv	1.956	0.0001
Ampicilline	10mlv-10ml vm	-0.9934	0.0001
Ampicilline	10mlv-3mlv	0.2585	0.1034
Ampicilline	10ml vm-3mlv	1.2519	0.0001
cloxacilline	0,5ml art-10mlv	0.0443	0.9999
cloxacilline	0,5ml art-10ml vm	0.027	0.9999
cloxacilline	0,5ml art-3mlv	0.0431	0.9999
cloxacilline	10mlv-10ml vm	-0.0174	0.9999
cloxacilline	10mlv-3mlv	-0.0012	0.9999



## Annexes

<b>Antibiotique</b>	<b>Comparaison</b>	<b>Différence</b>	<b>Valeur P</b>
cloxacilline	10ml vm-3mlv	0.0161	0.9999
dicloxacilline	0,5ml art-10mlv	0.5281	0.0026
dicloxacilline	0,5ml art-10ml vm	0.3882	0.1981
dicloxacilline	0,5ml art-3mlv	0.5065	0.0058
dicloxacilline	10mlv-10ml vm	-0.1399	0.9643
dicloxacilline	10mlv-3mlv	-0.0216	0.9999
dicloxacilline	10ml vm-3mlv	0.1183	0.9987
érythromycine	0,5ml art-10mlv	-0.0059	0.9999
érythromycine	0,5ml art-10ml vm	-0.1974	0.0244
érythromycine	0,5ml art-3mlv	-0.0327	0.9984
érythromycine	10mlv-10ml vm	-0.1915	0.0397
érythromycine	10mlv-3mlv	-0.0268	0.9999
érythromycine	10ml vm-3mlv	0.1648	0.2407
Fluméquine	0,5ml art-10mlv	0.5187	0.0001
Fluméquine	0,5ml art-10ml vm	0.2756	0.0228
Fluméquine	0,5ml art-3mlv	0.4294	0.0001
Fluméquine	10mlv-10ml vm	-0.2432	0.0001
Fluméquine	10mlv-3mlv	-0.0894	0.0455
Fluméquine	10ml vm-3mlv	0.1538	0.1212
marbofloxacine	0,5ml art-10mlv	0.604	0.0001

## Annexes

<b>Antibiotique</b>	<b>Comparaison</b>	<b>Différence</b>	<b>Valeur P</b>
marbofloxacine	0,5ml art-10ml vm	0.0464	0.9999
marbofloxacine	0,5ml art-3mlv	0.5083	0.0001
marbofloxacine	10mlv-10ml vm	-0.5575	0.0001
marbofloxacine	10mlv-3mlv	-0.0956	0.9996
marbofloxacine	10ml vm-3mlv	0.4619	0.0002
nafcilline	0,5ml art-10mlv	-0.0046	0.9999
nafcilline	0,5ml art-10ml vm	-0.0784	0.9999
nafcilline	0,5ml art-3mlv	0.02	0.9999
nafcilline	10mlv-10ml vm	-0.0738	0.9999
nafcilline	10mlv-3mlv	0.0246	0.9999
nafcilline	10ml vm-3mlv	0.0983	0.9999
oxacilline	0,5ml art-10mlv	0.4154	0.0429
oxacilline	0,5ml art-10ml vm	0.2486	0.9428
oxacilline	0,5ml art-3mlv	0.423	0.0333
oxacilline	10mlv-10ml vm	-0.1668	0.9664
oxacilline	10mlv-3mlv	0.0076	0.9999
oxacilline	10ml vm-3mlv	0.1744	0.9357
pénicilline G	0,5ml art-10mlv	0.0999	0.0742
pénicilline G	0,5ml art-10ml vm	-0.6988	0.0001
pénicilline G	0,5ml art-3mlv	-0.5805	0.0001

## Annexes

---

<b>Antibiotique</b>	<b>Comparaison</b>	<b>Différence</b>	<b>Valeur P</b>
pénicilline G	10mlv-10ml vm	-0.7987	0.0001
pénicilline G	10mlv-3mlv	-0.6804	0.0001
pénicilline G	10ml vm-3mlv	0.1183	0.9966
tylosine	0,5ml art-10mlv	0.0346	0.9999
tylosine	0,5ml art-10ml vm	-0.4189	0.0001
tylosine	0,5ml art-3mlv	-0.2263	0.0087
tylosine	10mlv-10ml vm	-0.4535	0.0001
tylosine	10mlv-3mlv	-0.2609	0.0006
tylosine	10ml vm-3mlv	0.1926	0.5369

## Annexes

### Annexe 02

**Tableau 01** : Les coefficients de corrélation obtenus pour tous les antibiotiques analysés

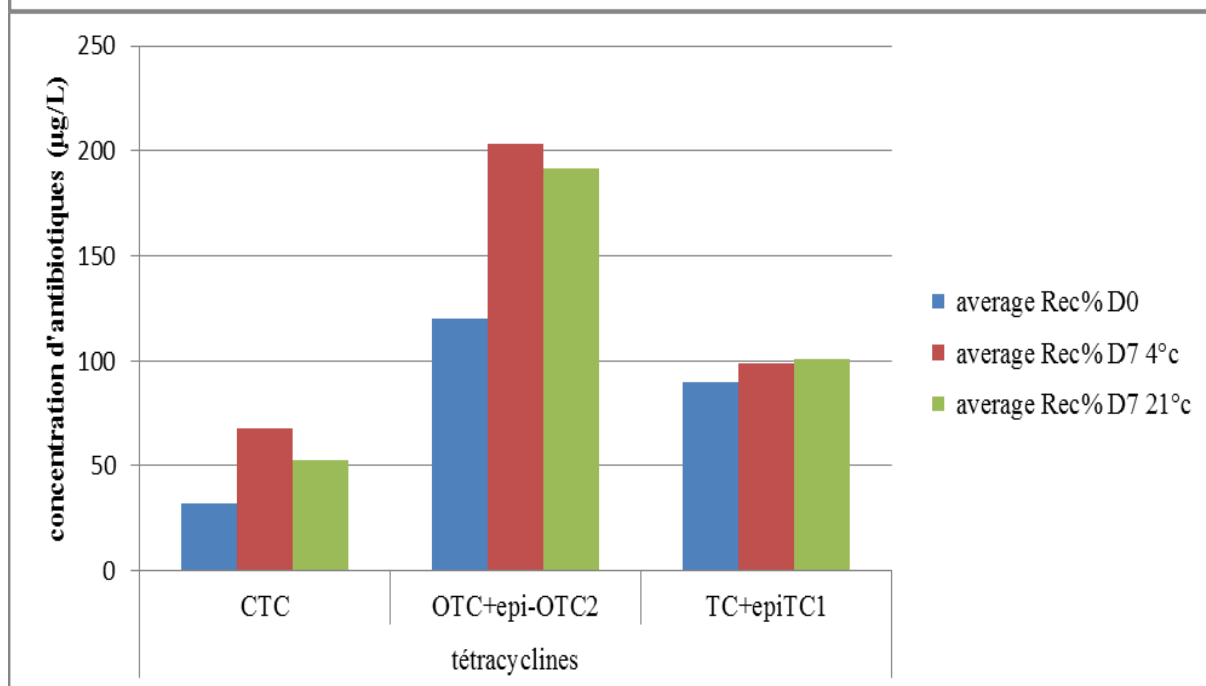
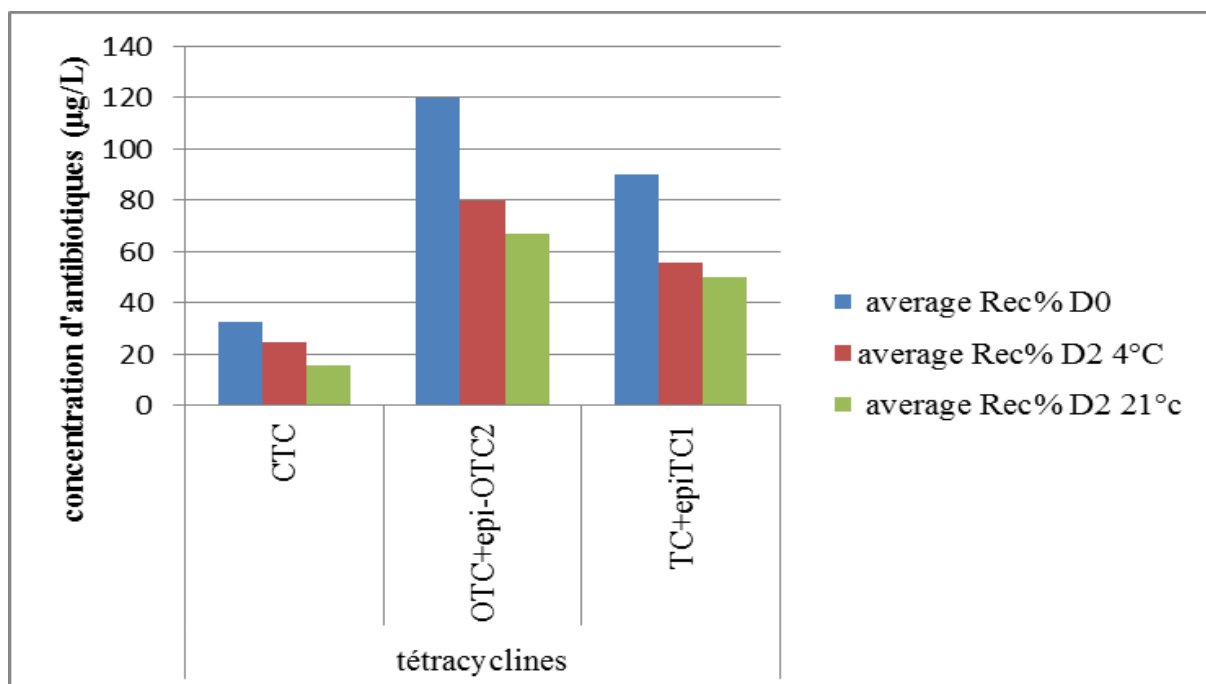
Groupe et type d'antibiotique	Coefficients de corrélation
<b>Macrolides</b>	
Erythromycine	0,97
Neospyramycine	0,96
Spiramycine	0,91
Tilmicosine	0,80
Tylosine	0,99
Josamycine	0,90
Tulathromycine	0,96
Tylvalosine	0,93
<b>Pénicillines</b>	
Amoxicilline	0,96
Ampicilline	0,95
Cloxacilline	0,92
Dicloxacilline	0,94
Nafcilline	0,91
Oxacilline	0,95
pénicilline G	0,95
<b>Quinolones</b>	
Enrofloxacin	0,89
Fluméquine	0,89
Marbofloxacin	0,86
Danofloxacin	0,65
Acide oxolinique	0,76
Difloxacin	0,94

## Annexes

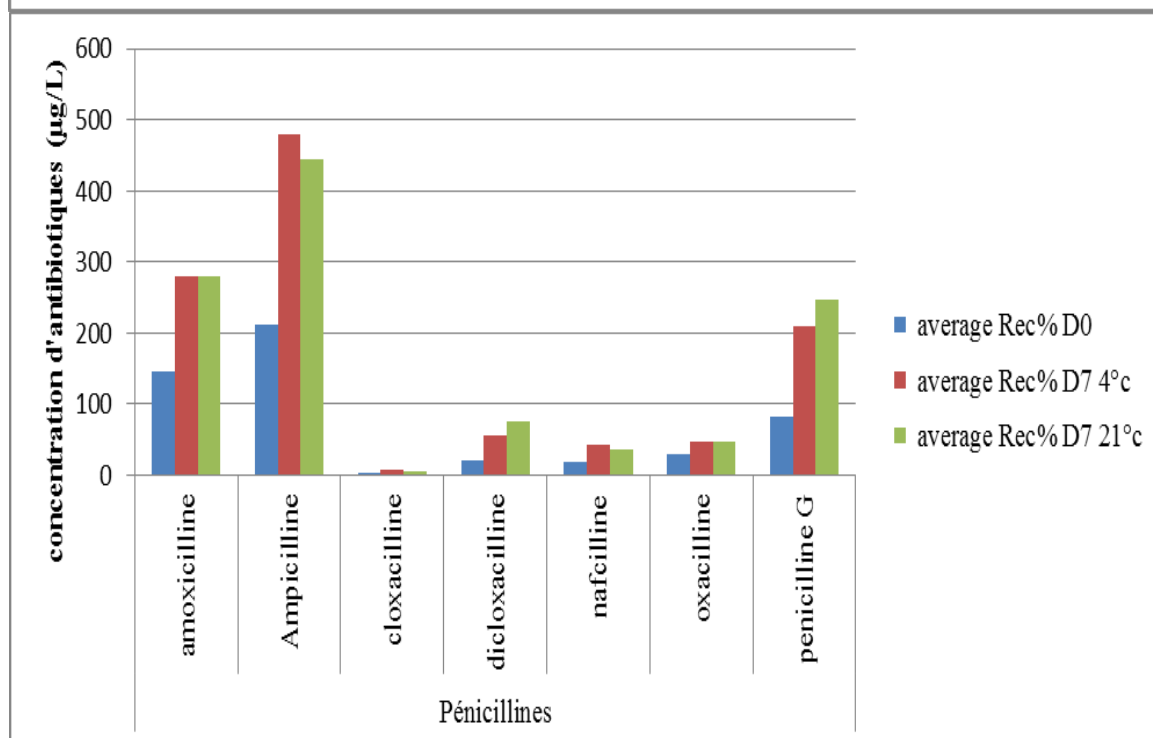
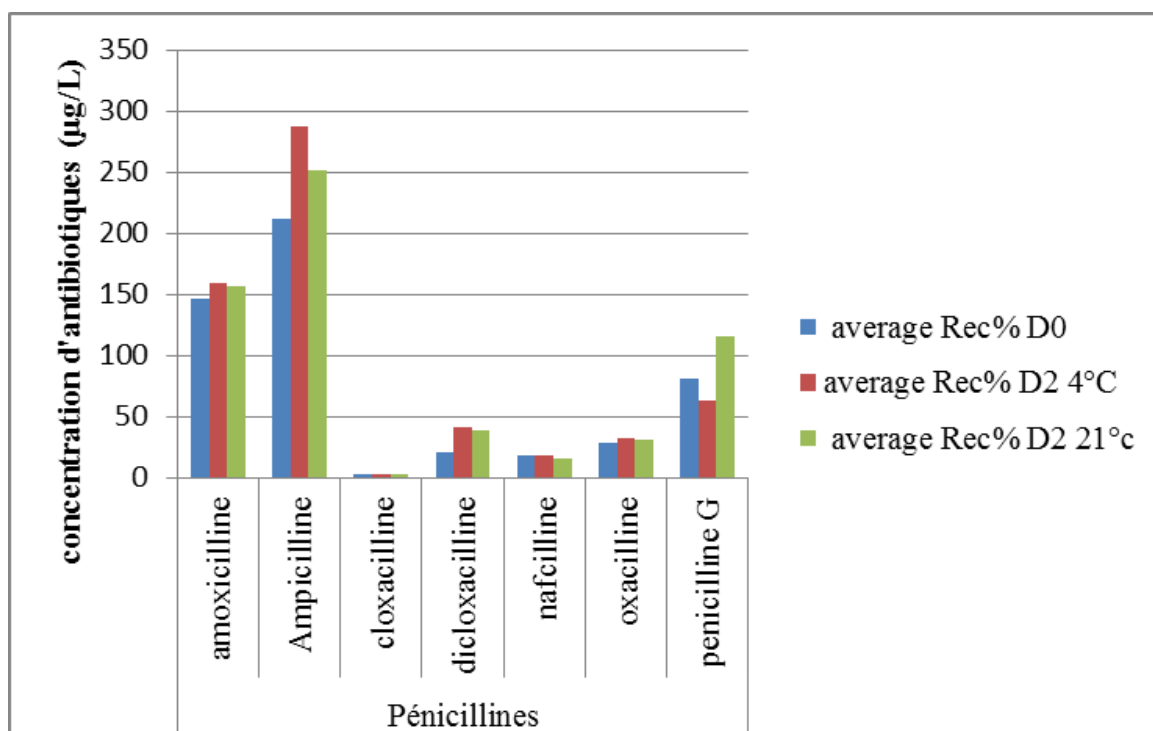
<b>Groupe et type d'antibiotique</b>	<b>Coefficients de corrélation</b>
<b>Sulfamides</b>	
Sulfacetamide	0,95
Sulfachloropyridazine	0,94
Sulfadiazine	0,80
Sulfadimethoxine	0,93
Sulfadimidine	0,92
Sulfadoxine	0,93
Sulfaguanidine	0,95
Sulfamerazine	0,94
Sulfamethizole	0,88
Sulfamethoxazole	0,94
Sulfamethoxypyridazine	0,94
Sulfamonomethoxine	0,95
Sulfamoxole	0,92
Sulfapyridine	0,94
Sulfaquinoxaline	0,94
Sulfathiazole	0,92
Sulfisoxazole	0,91
Triméthoprim	0,88
<b>Tétracyclines</b>	
Chlortétracycline	0,94
Oxytétracycline+ 4-Epi-Oxytétracycline	0,97
Tétracycline+ 4-Epi-Tétracycline	0,94
Doxycycline	0,93

# Annexes

## Annexe 03

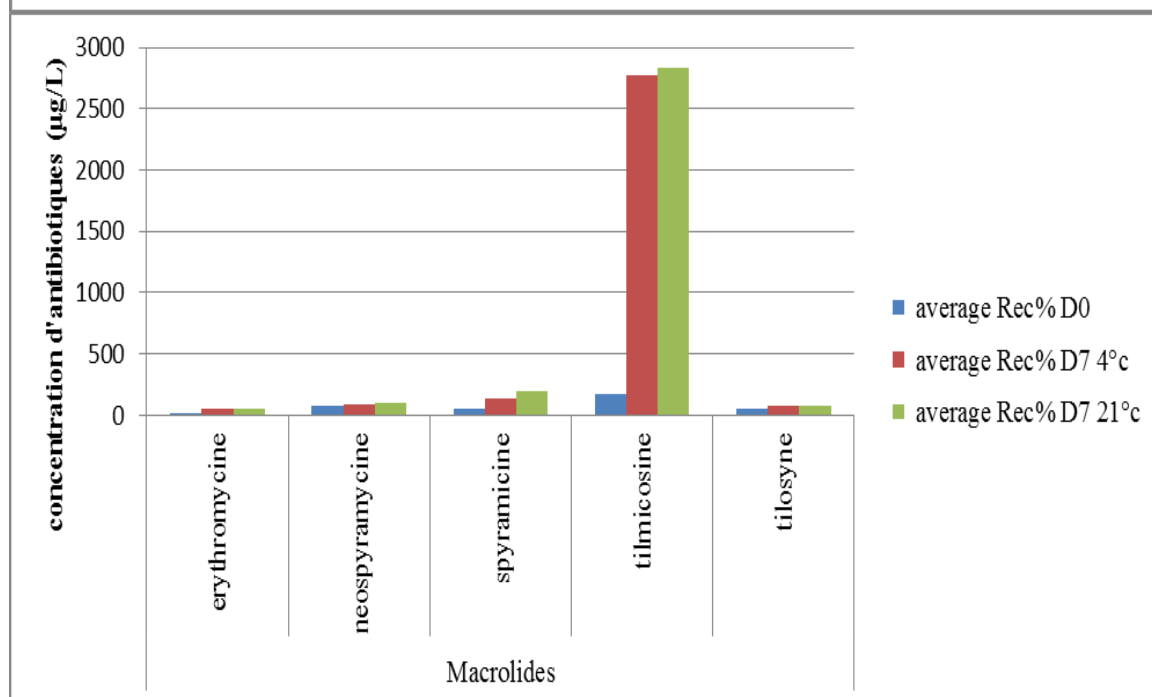
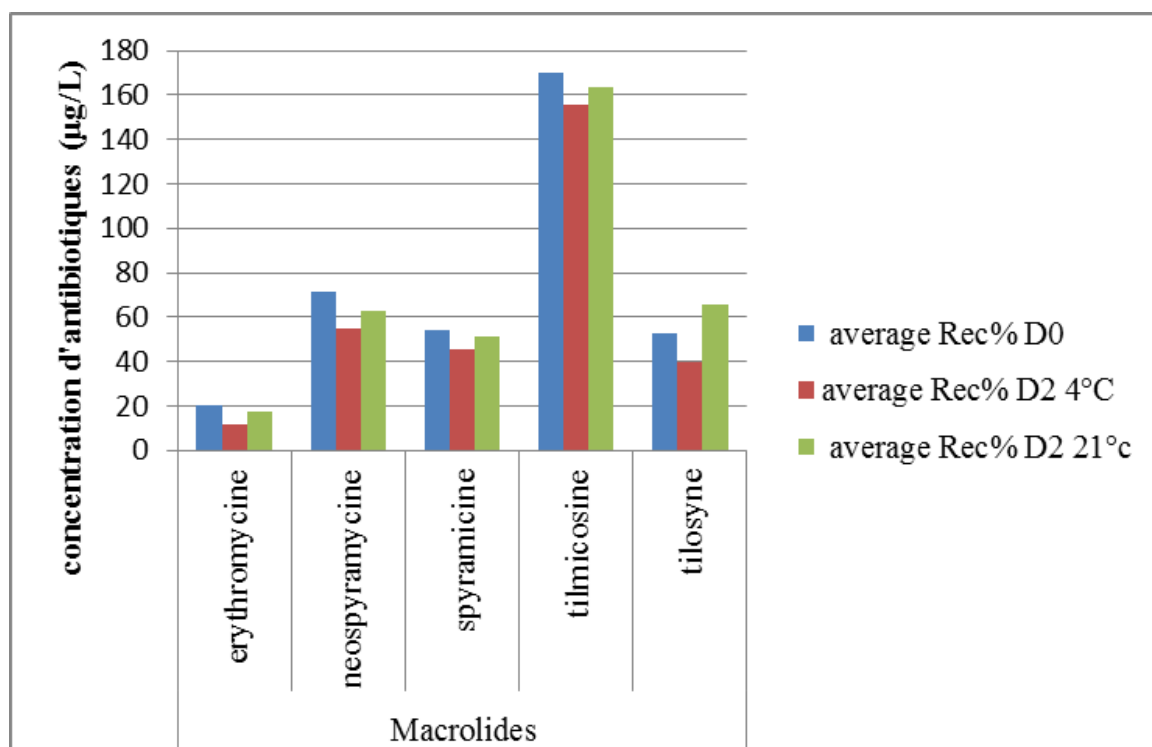


## Annexes



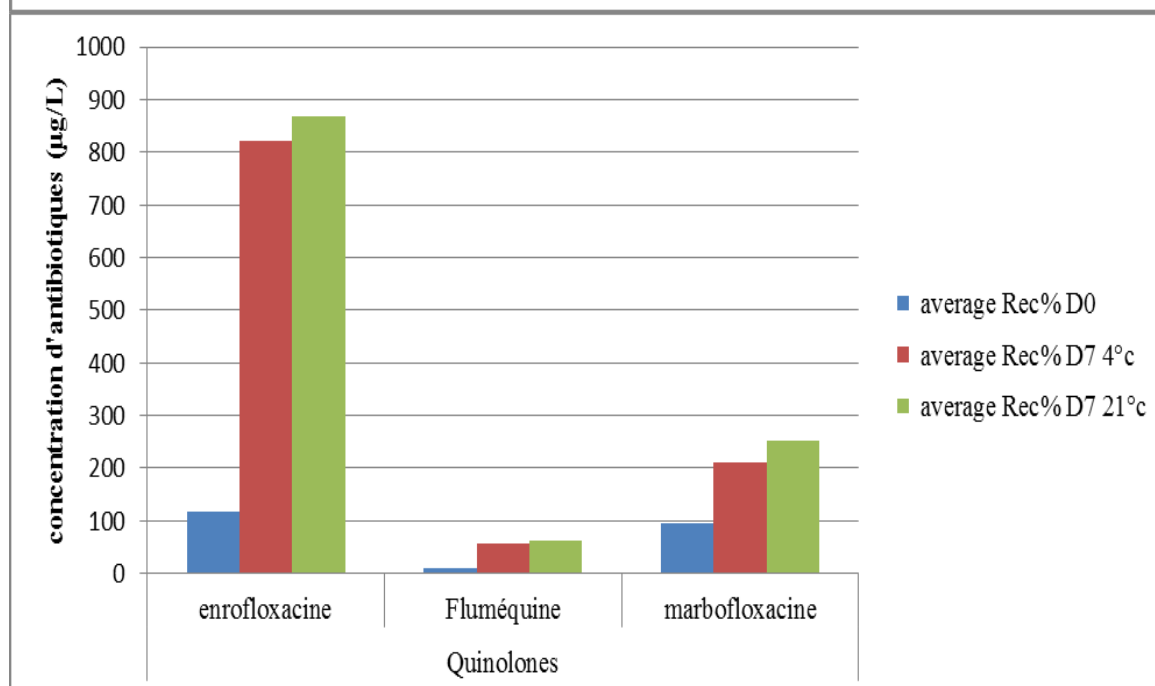
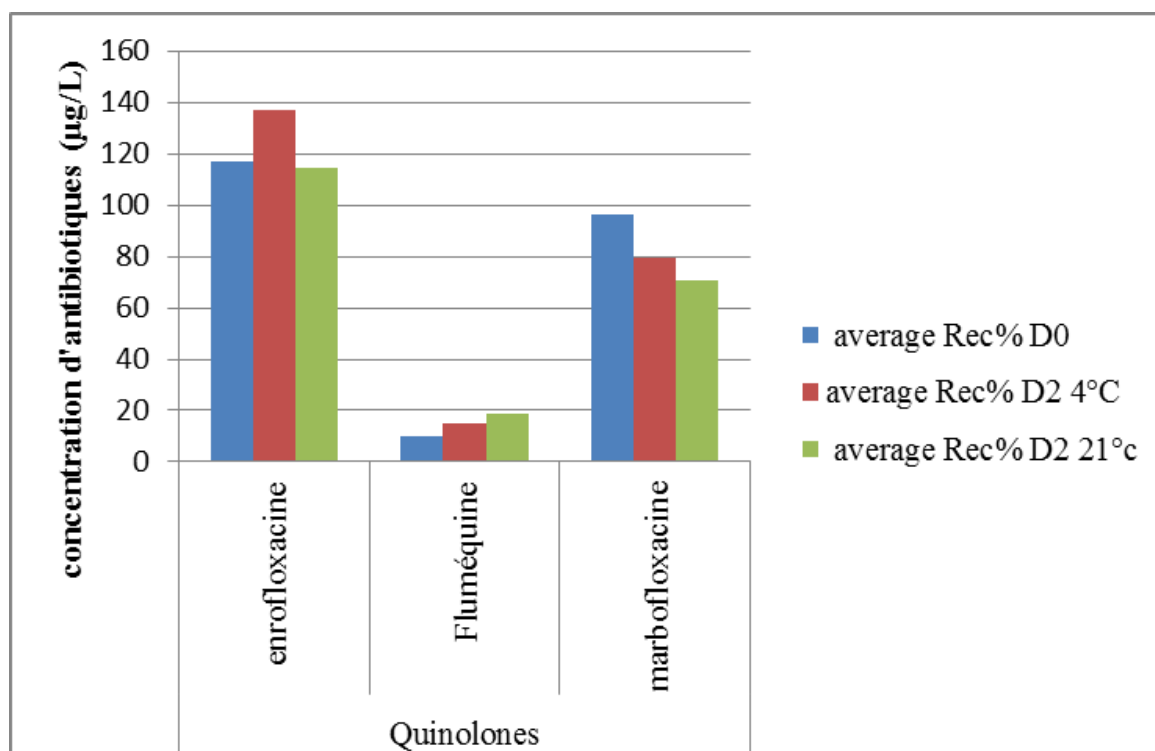
-b-

## Annexes



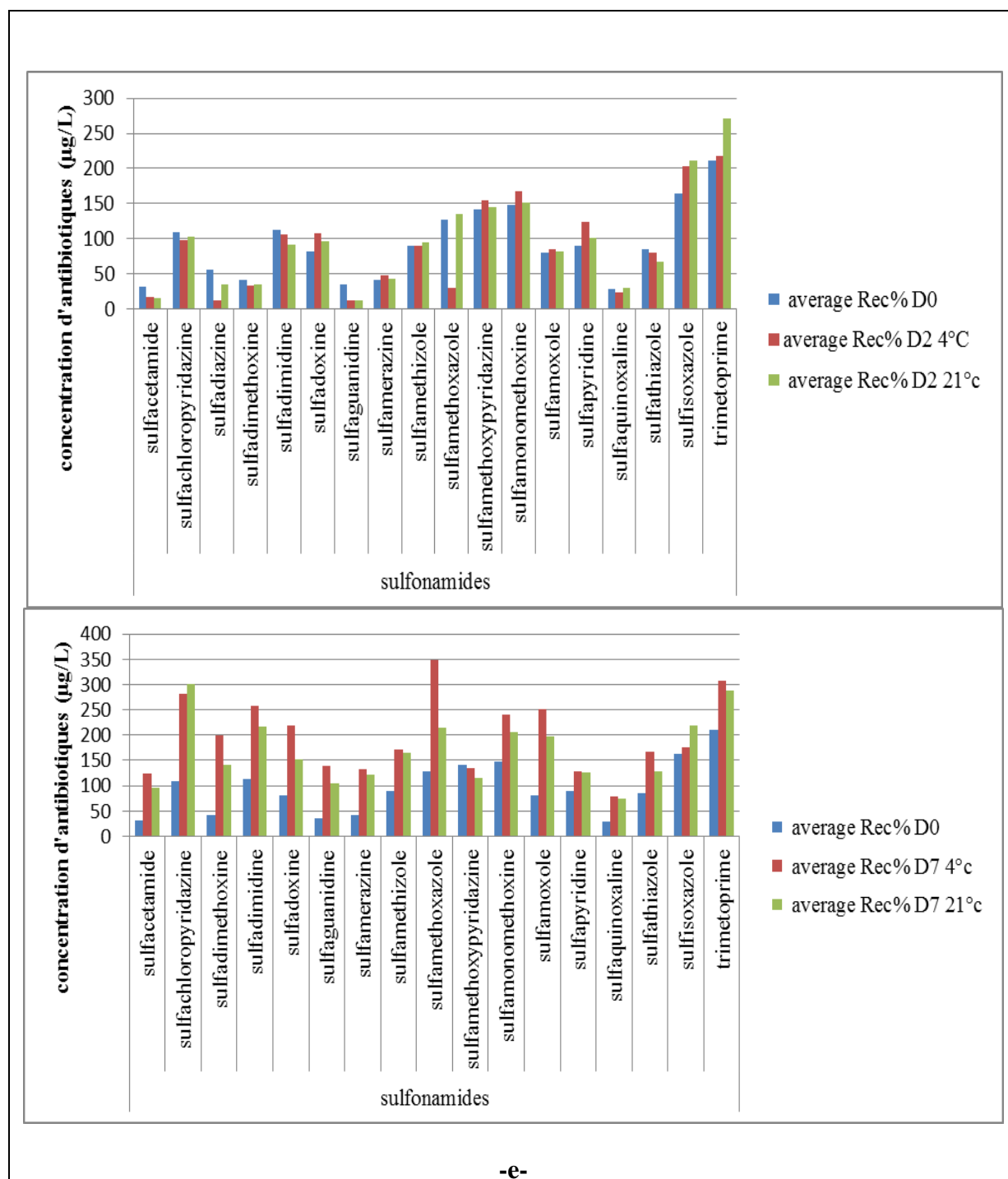


## Annexes



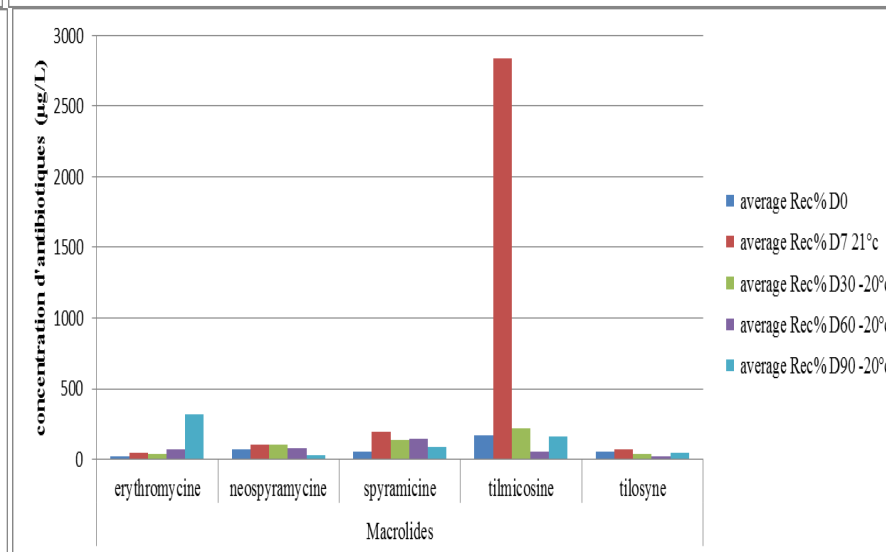
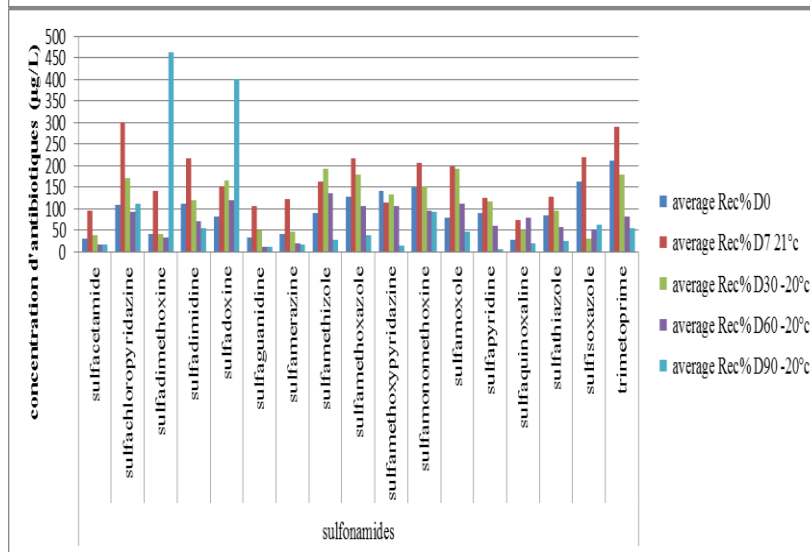
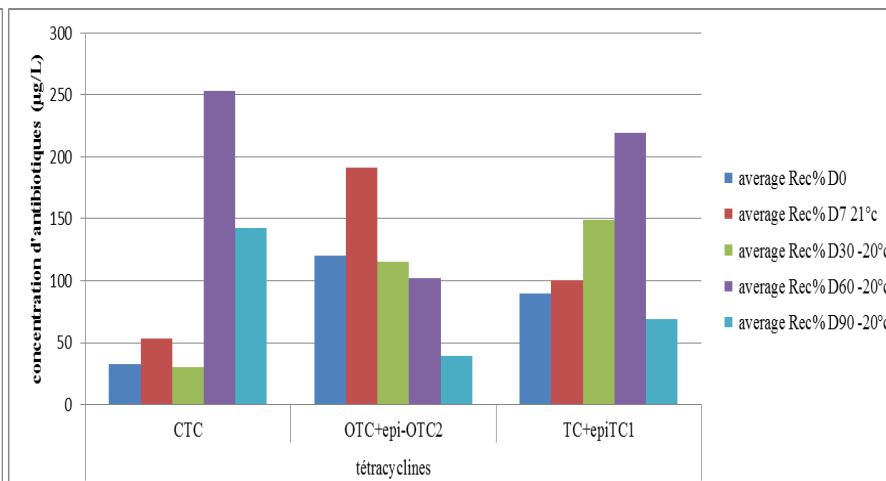
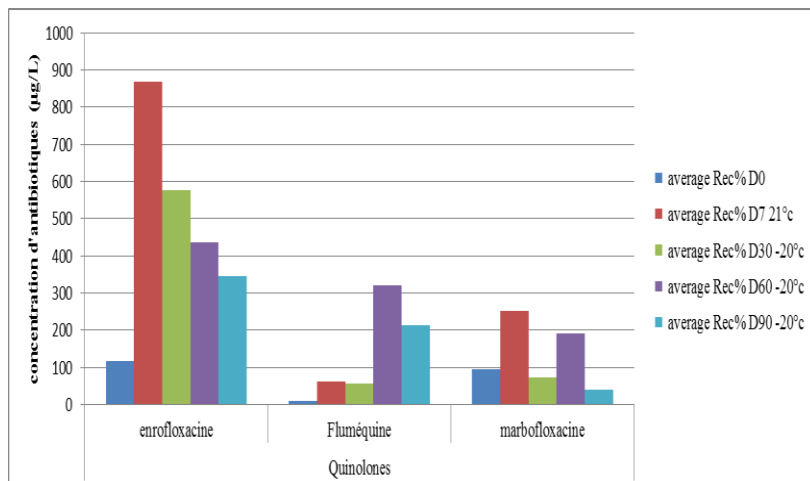
-d-

## Annexes

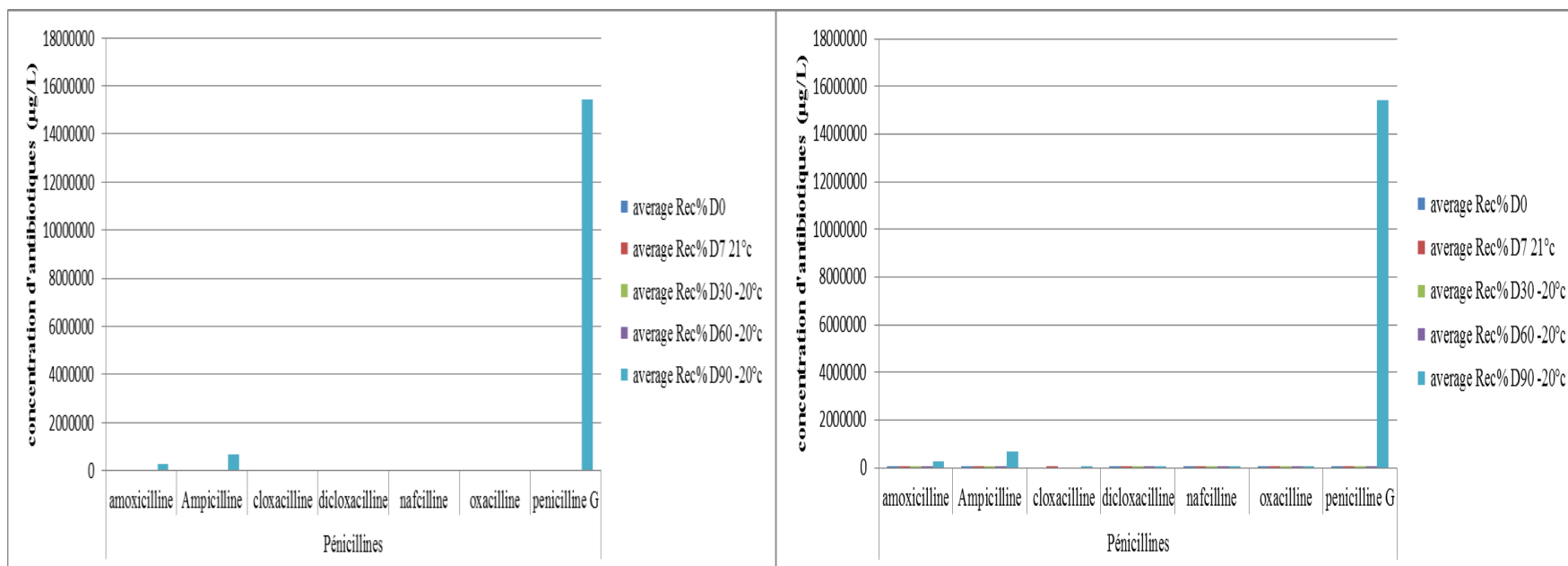


**Figure 1** : Estimation de la concentration de toutes les familles d'antibiotiques testées –a, b, c, d, e- dans des échantillons de lait conservés à 4°C et 21°C en même jour d'analyse J2 et à J7. Average Rec% : moyenne des rendements. D : jour.

# Annexes



## Annexes



-b-

**Figure 02:** Estimation de la concentration de toutes les familles d'antibiotiques testées –a et b- dans des échantillons de lait conservés à 21°C et à -20°C durant des périodes de temps différentes (7, 30, 60 et 90jours).

## Annexes

---

# Résumé

***Résumé***

Compte tenu du manque des données sur le statut des denrées alimentaires d'origine animale et précisément le lait commercialisées à Guelma vis-à-vis la présence des résidus d'antibiotiques, notre étude vise à chercher leur présence dans le lait de vache cru et lben.

Dans cette étude, deux méthodes ont été utilisées Delvotest SP-NT et UPLC-MS/MS. les résultats obtenus avec Delvotest SP-NT sont vérifiés et validés par la méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS). D'après les résultats de cette dernière, 65.46% des échantillons ont été positifs contenant des résidus d'antibiotiques au-delà de la LMR, des résidus qui n'ont pas de LMR ou des résidus interdits. La comparaison entre les résultats obtenus par les deux méthodes a révélé que le Delvotest SP-NT est peu fiable à cause du nombre des résultats faux négatifs. Ces résultats ont exprimé le statut actuel de la qualité du lait distribué pour une consommation directe et/ou pour une transformation. Cette situation peut être confirmée par un contrôle au niveau national avec des analyses plus profondes sur la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

**Mots clés:** résidus d'antibiotiques, Delvotest SP-NT, UPLC-MS/MS, faux positifs, faux négatifs, lait fermenté (lben).

***Abstract***

Taking into consideration the lack of data on the statute of foodstuff originated from animals especially milk commercialized in Guelma against antibiotic residues presence, our study aims to search their presence in cow's milk raw and lben.

In this work, two methods were used Delvotest SP-NT and UPLC-MS/MS. Results obtained using Delvotest SP-NT are verified and validated by a liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Among the latter findings, 65.46% of non-conform samples contained authorized residues at levels higher than the MRL, residues without set MRL, or non-authorized residues. The comparison between both methods results showed that Delvotest SP-NT is less trustworthy due to number of false negative results. These results showed the current statute on the quality of milk distributed to a direct consumption and/or for transformation. This assumption could be confirmed by a nationwide study with more in-depth analyses of antibiotic's presence in food chain originated from animals.

**Keywords:** antibiotic residues, Delvotest SP-NT, UPLC-MS/MS, false positive, false negative, fermented milk (lben).



ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى البحث عن بقايا المضادات الحيوية في حليب البقرة الطازج واللبن الخاص بمدينة قالمة، وهذا نظرا لنقص المعلومات حول هذا الموضوع بصفة عامة في المواد الغذائية ذات مصدر حيواني.

و لتحقيق ذلك، تم استعمال وسيلتي تحليل مختلفتين هما: *Delvotest SP-NT* و *UPLC-MS/MS* التي قمنا من خلالها بالتأكد من النتائج المتحصل عليها بالطريقة الأولى الأقل تخصصا. لقد أظهرت نتائجها، بأن 65.46 % من عينات الحليب المحللة كانت موجبة لاحتوائها على بقايا المضادات الحيوية التي لديها قيمة قصوى (LMR) والتي لم تحدد لها أي قيمة حتى الوقت الحالي. كما أنه تم إيجاد عدد قليل من العينات التي تحتوي على بعض المضادات الحيوية الممنوع استخدامها في الحيوانات المنتجة للحليب. في حين، بينت المقارنة بين النتائج المتحصل عليها بالطريقتين السالف ذكرهما؛ أنه لا يمكن الوثوق بالتحليل *Delvotest SP-NT*، وهذا تبعا لعدد نتائج السلبية الخاطئة.

نستطيع أن نستخلص من النسبة المرتفعة للعينات الموجبة، الوضعية الراهنة لنوعية الحليب الذي يتم توزيعه ليستهلك مباشرة أو يستعمل في إنتاج مشتقاته و يمكن أن نتأكد من هذا بإجراء رقابة على المستوى الوطني؛ وذلك باعتماد تحاليل أكثر عمقا حول تواجد بقايا المضادات الحيوية في المواد الغذائية ذات مصدر حيواني.


كلمات المفتاح: بقايا المضادات الحيوية، *Delvotest SP-NT*، *UPLC-MS/MS*، نتيجة موجبة خاطئة، نتيجة سالبة خاطئة، حليب متخمّر (لبن).

DATA ARTICLE

Open Access



# Assessment of antibiotic residues in commercial and farm milk collected in the region of Guelma (Algeria)

Samiha Layada<sup>1\*</sup>, Djemel-Eddine Benouareth<sup>1\*</sup>, Wim Coucke<sup>2\*</sup> and Mirjana Andjelkovic<sup>2\*</sup> 

## Abstract

**Background:** In an attempt to enhance the quality and quantity of food production (especially milk) and in order to prevent, or treat, animal diseases, the use of antibiotics in Algeria follows an increasing trend. The increased use evidently contributes to the emergence of increased contamination levels of antibiotic residues.

**Results:** In this work, two methods were used to detect presence of antibiotic residues in raw and fermented cow's milk collected in Guelma's farms (in Algeria). The screening comprised different points of sale in Guelma province. In a first step a widely used prescreening method based on microbial inhibition assay; Delvotest SP-NT; was used to analyze 131 milk samples. In a second step a liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) was used. The latter was first optimized for extraction of 36 veterinary drugs of penicillins, quinolones, macrolides, tetracyclines, sulfonamides, and trimethoprim from the collected milk. After simple extraction and dilution, the 194 samples, including those previously tested by the Delvotest SP-NT, were analyzed by LC-MS/MS. Results obtained by both methods were compared. Among the LC-MS/MS findings, 65.46 % of non-conform samples contained authorized residues at levels higher than the MRL, residues without set MRL, or non-authorized residues.

**Conclusion:** The comparison of both methods showed that Delvotest SP-NT is less trustworthy due to number of false negative results. This was further confirmed by LC-MS/MS pointing out the traces of antibiotics in numerous samples. In 65.46 % of milk samples residues of antibiotics were found suggesting a lack of public health controls as well as an evidence of the negligent use of antibiotics in the livestock industry, which both form a risk to public health. This indication should be confirmed by a nationwide study with in-depth analyses of antibiotic's presence in food chain originated from animals. The study offered an LC-MS/MS based analytical method ready to be used in Algerian National Residues Control Plan as a versatile analytical tool to monitor and determine the occurrence of antibiotic multi-residues in milk.

**Keywords:** Antibiotic residues, Delvotest SP-NT, LC-MS/MS, False positive, False negative, Fermented milk (Iben)

## Background

Antibiotics are widely used in livestock production for many purposes, such as: animal disease treatment (therapeutic application), animal disease prevention (prophylactic application), and feed efficiency (as growing promoters) (Jank et al. 2015). Their presence as residues

in food products especially milk implicates certain damages in the public health like: the development of allergic reactions in some hypersensitive individuals, increased risk of carcinogenicity (Petrović et al. 2008; Hou et al. 2014), the growth of resistant bacterial strains, and imbalances in intestinal microflora (Wang et al. 2006; Borràs et al. 2011). Low concentrations of antimicrobial drug residues create problems in the production of milk products by inhibiting the starter cultures (Petrović et al. 2008; Stead et al. 2008). Moreover, the risk of contamination with antibiotic residues of farms milk is higher if inappropriate practices are applied. For these reasons, control measures must be implemented to prevent drug residues

\* Correspondence: layada.samiha@yahoo.fr; Benouareth\_dje@yahoo.fr; wim.coucke@wiv-isp.be; mirjana.andjelkovic@wiv-isp.be

<sup>1</sup>Research Laboratory of Biology, Water and Environment, Biology Department, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe Sciences, University 8 Mai 1945-Guelma, BP 401, Guelma 24000, Algeria

<sup>2</sup>Scientific Institute of Public Health, Juliette Wytzman Street 14, 1050 Brussels, Belgium

from entering into the food chain. In this regard, and to ensure the safety of the consumer, worldwide regulatory authorities have set Maximum Residue Limits (MRLs) for several veterinary drugs (Kassaify et al. 2013). Since 2006, these substances are forbidden by the European Union (EU) to be used either in sub-therapeutic doses for prophylaxis or as growth promoters in veterinary medicine (Council Regulation No 1831/2003). Consequently, the presence of antibiotic residues in products that are targeted for food consumption has to be controlled. Similarly, various analytical methods have been described to analyze milk; especially microbiological and immune assays which are widely used because of their low cost and short time of analysis (Ramirez et al. 2003; Beltran et al. 2015). However, most current microbial screening tests have been initially developed to detect  $\beta$ -lactams in cow's milk. They are based on the inhibition of *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* which is highly sensitive to these substances (Beltran et al. 2015). Delvotest SP-NT is considered as one of the most commonly used microbial inhibition tests (Stead et al. 2008). However, the limited sensitivity and selectivity of the method demand further confirmation of the results obtained using more sensitive technique (Ferrini et al. 2015).

Instrumental techniques such as liquid chromatography (LC) coupled to UV- VIS spectroscopy or mass spectrometry (MS), are widely used in food control for either screening or confirmation of positive findings of less specific test within the following studies: Hermo et al. (2008), Li et al. (2012), Boix et al. (2014), Hou et al. (2014), Martins et al. (2014), and Cepurnieks et al. (2015). Furthermore, LC-MS/MS is nowadays the most frequently used analytical tool for detecting a large number of multiclass veterinary drug residues in food and decreasing the rate of false negative and false positive results with high selectivity and sensitivity (Martins et al. 2014). Many papers have tackled the analysis of different classes of veterinary antibiotics in milk using LC-MS/MS (Bogialli et al. 2008; Hermo et al. 2008; Han et al. 2015, and Meng et al. 2015). But recent research themes have enlarged their interests to the development of multiclass veterinary drug residues methods which facilitate the discrimination of antibiotics in milk and other matrices; such as, the study of Martins et al. (2014), which has established two screening methods that can analyze 24 antibacterial and one metabolite residue in milk and liver using LC-MS/MS.

Very few studies in Algeria have been conducted on the potential presence of antibiotic residues in raw cow's milk samples and that was by using less specific microbiological methods. Of the few researches that are available, studies made by Tarzaali et al. (2008), Aggad et al. (2009), and Titouche et al. (2013) have described high levels of milk contamination by using Delvotest SP-NT.

They indicated that among all tested milk samples 89, 29, and 47 % were found to contain residues, respectively. This appears significantly high prevalence of positive samples in comparison to results from any European Union country where a regular system for antibiotic residues control in milk is many decades-old. On contrary in Algeria similar milk control appears to be immature. Consequently, there are no data available on occurrence of antibiotic residues in milk produced in Guelma province located in North East of Algeria. Moreover, in any of the published reports contamination of fermented milk was not considered. The fermented milk - called lben- and cow's milk are important components of Algerian's diet (Belhadia et al. 2011; Zoubeidi and Gharabi 2013). Lben is traditional cultured milk widely consumed in North Africa and in Middle Eastern countries. It is produced by spontaneous souring of cow's milk followed by churning in order to separate lben from butter. Whereas only one report about a similar milk type (raibi milk) is available (Zinedine et al. 2007), no other data on the specific products are available or known.

In this work, the analyses of two types of milk (raw and lben) collected in Guelma province (in the north of Algeria) is presented. The samples were collected directly from the farms, and further in the value chain from dairy markets. Two methods were used to detect the presence of antibiotic residues in those samples. The first one was Delvotest SP-NT, which is most commonly used test for this purposes in Algeria. The second one was an optimized LC-MS/MS multi-residues screening method. The results obtained by both tests were compared and correlated to evaluate the feasibility of the use of Delvotest SP-NT as a prescreening test in Algerian setting. The optimization and validation of multi-residue LC-MS/MS screening method was performed following the international norms.

## Methods

### Samples and accompanying data

A total of 194 cow's milk samples were collected. Among them, 156 samples were collected from two farms (A and B), whereas 38 (including fermented and raw cow's milk) were purchased from 16 various points of sale in Guelma province during the period of January 2013 to July 2014. Of 156 farm samples 53 were collected from farm A located in the centrum of Guelma province. The samples were gathered as such: 8 samples were taken from individual cows which have been treated less than a month prior to the collection, 28 from individual untreated cows, and 17 samples were collected from bulk tank milk at the farm. Similarly, 103 milk samples were collected from farm B located more than 7 Km far from Guelma center-. Their collection and number were as follows: milk from individual cows

treated less than a month prior to the collection were 18, milk from individual untreated cows were 70, and bulk tank milk were 15. In addition to sampling for the assessment of antibiotic residues, questionnaires were made to collect data on the cow's treatment like: the kind of antibiotic administered to the cow, the day of treatment, and the withdrawal time of each antibiotic used. The latter may vary from 2 to 7 days depending on the administered antibiotics (penicillins, tetracyclines, macrolides and sulfonamides) and this either intermammary or intramuscular.

Out of 38 milk samples purchased at various points of sale in Guelma province, 22 were fermented milk "lben" and 16 were raw cow's milk. Seven points of sale were situated in the province's capital whereas the others were situated in separate regions surrounding the state. For this part of the value chain a short questionnaire was used in order to collect more specific information about the milk origin. Those data specified milk as collected either from a farmer, private collection, milk factories, or from farms in Guelma municipalities and Souk Ahras state. Due to missing data, other collections were indicated as unknown origin.

Approximately a volume of 140 mL of each milk sample was collected and conserved in sterile flask and transported to the laboratory at 4 °C. Ten millilitre were used to be analyzed by a microbial test Delvotest SP-NT for the prescreening of antibiotics in milk samples. The remaining 130 mL were frozen and kept at -20 °C prior to further analysis by LC/MS-MS. Two blank milk samples were assigned in the collection after a negative test for antibiotics by Delvotest SP-NT and one purchased from Belgian supermarket for LC-MS/MS analysis.

### Chemicals

The following reference standards were from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). The sulfonamides (sulfapyridine, sulfamethoxy pyridazine, sulfadoxine, sulfadimidine, sulfamonomethoxine, sulfaquinoxaline, sulfamoxole, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine, sulfathiazole, sulfaguanidine, sulfamerazine, sulfamethoxazole, sulfadiazine, sulfacetamide, sulfisoxazole, sulfamethizole), trimethoprim, penicillins (amoxicillin, ampicillin, penicillin V, penicillin G, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, nafcillin), quinolones (flumequine, difloxacin, sarafloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, nalidixic acid, marbofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid), macrolides (erythromycin, spiramycin, josamycin, clindamycin, lincomycin, neospyramycin, tilmicosin, tylosin, tylvalosin, tulathromycin), and tetracyclines (doxycycline, oxytetracycline, 4-epi-chlortetracycline, 4-epi-oxytetracycline, 4-epi-tetracycline, tetracycline, chlortetracycline) were with a purity of 95 to 100 %. These standards were used to prepare stock standards solutions. Similarly, the internal

standards sulfadimidine C<sup>13</sup>, flucloxacilline, norfloxacin\_D<sub>5</sub>, roxythromycine, and demeclocycline, were from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Besides, stock standards solutions of sulphonamides, penicillins, macrolides, and tetracyclines were prepared by dissolving 10 mg of each substance into 10 mL of methanol, except for penicillins which were dissolved in 10 mL of Milli-Q water (Millipore corp., Bedford, MA, USA). For the quinolones, 5 mg of each substance were dissolved into 10 mL of methanol. In addition, mixed intermediate standard solutions at 5MRL (Commission Regulation 2377/1990) were prepared from diluting stock standard solutions to obtain a specific final concentration for each substance then conserved them at -20 °C. Actually, solvents acetonitrile and methanol used for mobile phase and extraction were of UPLC-MS grade. They were purchased from Biosolve (Valkenswaard, the Netherlands). Yet, Formic acid, oxalic acid 10 mM, Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) 100 mM, and sodium sulfate anhydride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The analytical liquid chromatography column (Waters, Millford, MA, USA) C18 2.1 × 100 mm, 1.7 μm was used.

### Microbial inhibitor test (Delvotest SP-NT)

Delvotest SP-NT, which is a non-specific microbial inhibitor test, was used to detect the presence of antibiotics in milk samples. In short this is an agar diffusion test that contains a standardized number of *Bacillus stearothermophilus* spores, selected nutrients, and pH indicator bromocresol purple. Four kits of Delvotest SP-NT (DSM, Netherlands) were used whereas three were provided by DSM Food Specialties located in Spain, and the fourth was purchased. After adding milk sample directly to the agar bed (ampoules), an incubation step was conducted for 3 h at 64 °C. During incubation, microbial metabolism resulted in a change in pH, and hence in a change of color from purple to yellow. By contrast, if the sample contained sufficiently high concentrations of inhibitory substances, the color would remain purple (Stead et al. 2008). Except fermented milk, 10 mL of each raw milk sample was heated at 80 °C for 10 min to destroy natural inhibitors lysozyme and lactoferrin (Hillerton et al. 1999). In parallel, 0.1 mL was decanted into Delvotest SP-NT ampoules using a specific pipette for each sample. The ampoules were incubated in water bath at 64 °C ± 2 °C within 3 h. Test and data interpretation were performed according to the manufacturer's instructions.

### Extraction optimization

The extraction procedure was based on an existent method for screening of antibiotics in meat. This method was previously developed and validated in accordance with the European commission (Commission Decision 2002). In this study, only 36 antibiotics were

selected to be followed in milk samples during method optimization instead of 59 ones targeted in the initial method. The selected antibiotics had either the same level of MRL both in milk and meat, or lower MRL in milk than in meat as prescribed in European commission (Commission Regulation 37/2010). With required scrutiny, the selection of the appropriate method for the extraction of antibiotics residues in milk was based on the comparison between four modified extraction protocols as briefly presented in Table 1. All protocols were tested on a set of a blank milk sample and two control samples spiked with mixture of antibiotic standards. Out of the comparative overview of the average recoveries obtained by four extraction protocols (Table 2), method 3 was selected as the optimal. Further details are explained in the section of Optimization of the LC-MS/MS screening method results. The following list includes the steps of the extraction procedure. Ten grams of one blank and two control milk samples were weighed in 50 mL falcon. To these 500  $\mu$ L of mixed internal standard solution at 1MRL, 667  $\mu$ L of EDTA 0.1 M, 23 mL of the mixture (methanol/acetonitrile) and 3 g of sodium sulfate

anhydride were added. The spiked samples were fortified with 250  $\mu$ L of each mixed standard solutions at 1MRL as above in order to obtain levels corresponding to 0.5 MRL. Samples were vortexed for 1 min, and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. Subsequently, 5 mL of the supernatant was decanted into 10 mL tubes and evaporated to dryness at 40 °C. Three-hundred microlitre of Milli-Q water was added into tubes after evaporation, vortexed for a few seconds and transferred to eppendorfs tubes to be centrifuged at 12,000 rpm for 30 min. Supernatant was filtered through a 0.2  $\mu$ m filter directly to injection vial prior to LC-MS/MS analysis.

#### LC-MS/MS analysis

UPLC analysis was performed using an Acquity sample and solvent manager (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC column C18 2.1  $\times$  100 mm 1.7  $\mu$  (Waters, Millford, MA, USA) at 30 °C with the mobile phase composed by 0.1 mM oxalic acid, 0.1 % formic acid (solution A) and acetonitrile 0.1 % formic acid (solution B) at a constant flow of 0.4 mL min<sup>-1</sup>. The gradient elution program used

**Table 1** Comparative overview of four extraction methods parameters

Extraction steps	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4 (Martins et al. (2014))
1) Sample amount	3g	10g	10g	0.5g
2) Type of container	50mL Falcon tube			2mL Eppendorf tube
3) Mixed internal standard solution, 1MRL (EU2377/90)	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	500 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L
4) EDTA, 0.1M	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	667 $\mu$ L	30 $\mu$ L
5) Mixture methanol/acetonitrile	7mL	7mL	23mL	/
6) Sodium sulfate anhydride	3g	3g	3g	/
7) Mixed standard solution*	75 $\mu$ L	75 $\mu$ L	250 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L
8) Vortexing	1min			10sec and equilibration for 10min from light
9) Centrifugation	10000rpm, 10min at 4°C			
10) Deprotonization				0.6mL Ethanol/acetic acid (96/4) Followed by short vortexing and 30min at -18°C incubation
11) Supernatant	5mL evaporated to dryness at 40°C followed by addition of 300 $\mu$ L of water MilliQ			/
12) Vortex and centrifugation	Few seconds 12000rpm during 30min			
13) Supernatant	All supernatant			0.75mL with addition of 0.25mL Formic acid 0.1% in water/ formic acid in acetonitrile (98:2)
14) Filtration	0.2 $\mu$ m filter			/

\*mixed standard solution contained: Sulfonamides (sulfapyridine, sulfamethoxypyridazine, sulfadoxine, sulfadimidine, sulfamonomethoxine, sulfaquinoxaline, sulfaquinoxaline, sulfamoxole, sulfachlorpyridazine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline, sulfathiazole, sulfaguanidine, trimethoprim, sulfamerazine, sulfamethoxazole, Sulfadiazine, sulfacetamide, sulfisoxazole), penicillins (amoxicillin, ampicillin, penicillin V, penicillin G, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, nafcillin) quinolones (flumequine, difloxacin, sarafloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, nalidixic acid, marbofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid), macrolides (erythromycin, spiramycin, josamycin, clindamycin, lincomycin, neospyramycin, tilmicosin, tylosin, tyvalosin, tulathromycin), tetracyclines (doxycycline, oxytetracycline, 4-epi-chlortetracycline, 4-epi-oxytetracycline, 4-epi-tetracycline, tetracycline, chlortetracycline)

**Table 2** All parameters used for the comparison between four methods (M1, M2, M3 and M4) and the final selection of the test suitable method

Group and type of antibiotic	Spiked Concentration (µg/L)	Average Rec% ± STDEV M1	Average Rec% ± STDEV M2	Average Rec% ± STDEV M3	Average Rec% ± STDEV M4	MRL in milk (µg/L)	MRL in meat (µg/L)	MRL milk/MRL meat
Macrolides		35.65 ± 2.72	24.50 ± 8.54	73.66 ± 8.33	79.20 ± 6.51			
Erythromycin	2000	3.40 <sup>ab</sup> ± 0.98	0.67 <sup>a</sup> ± 0.35	20.10 <sup>b</sup> ± 3.77	0.00 <sup>a</sup> ± 0.00	40	200	0.2
Neospyramycin	2500	18.78 ± 1.33	22.14 ± 1.10	70.31 ± 11.95	102.99 ± 3.17	200	200	1
Spiramycin	2500	25.96 ± 3.06	29.07 ± 1.18	53.17 ± 4.80	37.45 ± 2.02	200	200	1
Tilmicosin	500	96.42 ± 2.34	63.54 ± 39.90	171.49 ± 11.93	245.02 ± 27.02	50	50	1
Tylosin	1000	33.69 <sup>a</sup> ± 5.89	7.08 <sup>b</sup> ± 0.16	53.23 <sup>a</sup> ± 9.22	10.55 <sup>b</sup> ± 0.35	50	100	0.50
Penicillins		34.36 ± 2.10	30.36 ± 1.87	72.33 ± 9.17	75.42 ± 7.91			
Amoxicillin	500	57.08 <sup>a</sup> ± 4.54	69.32 <sup>a</sup> ± 0.38	143.26 <sup>b</sup> ± 25.38	107.28 <sup>c</sup> ± 35.83	4	50	0.08
Ampicillin	500	78.19 <sup>a</sup> ± 7.09	104.03 <sup>a</sup> ± 7.99	204.73 <sup>b</sup> ± 26.17	273.58 <sup>c</sup> ± 7.65	4	50	0.08
Cloxacillin	30,000	1.43 <sup>a</sup> ± 0.12	1.31 <sup>a</sup> ± 0.03	3.05 <sup>a</sup> ± 0.21	5.76 <sup>a</sup> ± 0.49	30	300	0.1
Dicloxacillin	3000	9.13 <sup>a</sup> ± 0.44	6.96 <sup>a</sup> ± 0.09	21.14 <sup>ab</sup> ± 2.80	60.03 <sup>b</sup> ± 5.54	30	300	0.1
Nafcillin	3000	8.23 <sup>a</sup> ± 0.20	10.69 <sup>a</sup> ± 0.12	18.07 <sup>a</sup> ± 0.39	10.23 <sup>a</sup> ± 0.31	30	300	0.1
Oxacillin	3000	10.99 <sup>a</sup> ± 0.86	11.72 <sup>a</sup> ± 0.27	28.44 <sup>ab</sup> ± 1.39	53.30 <sup>b</sup> ± 2.03	30	300	0.1
Penicillin G	500	75.48 <sup>a</sup> ± 1.44	8.46 <sup>b</sup> ± 4.25	87.64 <sup>a</sup> ± 7.85	17.76 <sup>b</sup> ± 3.53	4	50	0.08
Quinolones		37.05 ± 2.20	26.58 ± 1.62	76.52 ± 1.74	83.07 ± 13.94			
Enrofloxacin	500	53.28 ± 3.60	40.40 ± 1.90	110.21 ± 1.22	95.99 ± 19.05	100	100	1
Flumequine	1000	9.05 <sup>a</sup> ± 1.45	0.00 <sup>b</sup> ± 0.00	24.33 <sup>a</sup> ± 0.70	52.72 <sup>c</sup> ± 9.48	50	200	0.25
Marbofloxacin	750	48.80 <sup>a</sup> ± 1.55	39.32 <sup>a</sup> ± 2.94	95.02 <sup>b</sup> ± 3.29	100.49 <sup>b</sup> ± 13.30	75	150	0.5
Sulfonamides		34.80 ± 1.32	29.49 ± 2.52	94.58 ± 6.43	99.73 ± 9.82			
Sulfacetamide	1000	18.54 ± 1.36	14.02 ± 1.57	35.42 ± 8.03	20.53 ± 2.80	100	100	1
Sulfachloropyridazine	1000	38.38 ± 0.48	26.78 ± 3.87	108.43 ± 0.11	132.90 ± 3.87	100	100	1
Sulfadiazine	1000	25.49 ± 2.58	24.09 ± 0.89	58.88 ± 0.63	65.94 ± 3.54	100	100	1
Sulfadimethoxine	1000	14.31 ± 1.46	7.10 ± 0.40	41.56 ± 1.33	85.52 ± 2.47	100	100	1
Sulfadimidine	1000	39.33 ± 0.21	38.29 ± 1.55	114.46 ± 7.31	123.00 ± 9.00	100	100	1
Sulfadoxine	1000	30.31 ± 0.74	16.97 ± 2.60	82.33 ± 0.96	153.84 ± 1.11	100	100	1
Sulfaguandine	1000	18.64 ± 0.12	14.25 ± 0.14	39.51 ± 7.71	26.60 ± 10.07	100	100	1
Sulfamerazine	1000	9.70 ± 1.57	7.65 ± 0.11	39.23 ± 1.08	89.31 ± 11.19	100	100	1
Sulfamethizole	1000	42.44 ± 0.80	55.31 ± 7.74	92.82 ± 1.55	84.97 ± 4.78	100	100	1
Sulfamethoxazole	1000	43.95 ± 6.02	18.70 ± 3.82	127.40 ± 4.92	161.97 ± 15.02	100	100	1
Sulfamethoxy pyridazine	1000	43.94 ± 0.02	51.72 ± 1.76	140.44 ± 5.21	165.70 ± 12.54	100	100	1
Sulfamonomethoxine	1000	42.22 ± 1.56	50.56 ± 0.46	148.67 ± 9.67	174.34 ± 7.26	100	100	1
Sulfamoxole	1000	38.61 ± 1.46	19.51 ± 2.34	80.30 ± 10.71	100.31 ± 23.38	100	100	1

**Table 2** All parameters used for the comparison between four methods (M1, M2, M3 and M4) and the final selection of the test suitable method (Continued)

Sulfapyridine	1000	29.02 ± 0.68	31.62 ± 2.64	89.32 ± 6.45	101.35 ± 18.40	100	100	1
Sulfaquinoxaline	1000	13.64 ± 0.32	10.28 ± 2.07	28.72 ± 5.89	79.34 ± 14.84	100	100	1
Sulfathiazole	1000	36.39 ± 1.95	39.05 ± 0.88	88.64 ± 5.73	41.14 ± 21.28	100	100	1
Sulfisoxazole	1000	55.57 ± 0.80	29.05 ± 2.59	168.29 ± 12.57	62.20 ± 4.43	100	100	1
Trimethoprim	1000	86.00 ± 1.57	75.98 ± 9.94	217.95 ± 25.88	126.27 ± 10.81	50	50	1
Tetracyclines		25.73 ± 0.54	21.89 ± 17.13	73.50 ± 12.79	52.61 ± 7.69			
Chlortetracycline	1000	18.87 ± 0.49	21.77 ± 9.36	30.30 ± 6.29	35.67 ± 6.17	100	100	1
Oxytetracycline+ 4-Epi-Oxytetracycline	1000	32.79 ± 0.77	22.24 ± 23.07	108.49 ± 15.90	48.16 ± 2.89	100	100	1
Tetracycline+ 4-Epi-Tetracycline	1000	25.53 ± 0.36	21.67 ± 18.97	81.72 ± 16.19	74.02 ± 14.00	100	100	1

Means with the same letter do not differ significantly at the level of 0.05

STDEV Standard Deviation, Rec Recovery

\*the estimated concentration was based on the calibration curve produced with the five different standard concentrations (250, 500, 1000, 1500 and 2000 µg/L) after screening the quantifier ion in the MS spectra.

Four methods used (n = 2) in milk samples spiked each antibiotic of 500 µg/L as a final concentration

was initially 98 % of A decreasing to 2 % within 10.5 min (0–10.5 min). After that, the composition was set back to the initial levels A: B (98:2) (10.5–12.5 min). The total run time was 12.5 min. XEVO TQ MS triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Millford MA, USA), operating in positive Electrospray ionization (ESI) MS/MS mode was used for detection. Data was controlled and evaluated by MassLynx software (version 4.1). The selected reaction monitoring (MRM) mode was used and the following tune parameters were applied: capillary, 3 kV; cone 15 V; extractor, 3.00 V; source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 500 °C, cone gas flow, 80Lh<sup>-1</sup>; desolvation gas flow, 1000Lh<sup>-1</sup>; collision gas flow, 0.16 mL min<sup>-1</sup>, resolution (LM1, HM1, LM2, HM2 where LM is low mass and HM is high mass), 2.7, 15, 2.8, 14.8; ion energy (1 and 2), 0.3, 0.6; multiplier 546.52 V. Cone voltage (V), collision energy (eV) and transition mass parameters for all antibiotic residues analyzed in milk samples are presented in Table 3.

#### Validation of the LC-MS/MS screening method

Validation of the selected method was performed on all antibiotic substances cited in Table 4 and performed following the international norm (Commission Decision 2002) through determining: specificity/selectivity, detection capability CC $\beta$ , linearity, and applicability. Milk samples bought from a Belgian supermarket were analyzed, and after confirming the absence of antibiotics were used as blank samples in the validation studies.

To determine the specificity of the proposed method, a set of extract of blank milk samples ( $n = 20$ ) were injected into the chromatographic system on the same day. The process included also an analysis of the spiked samples on three levels. This permits the specificity to be evaluated through the average and standard deviation of the noise amplitude (S/N), expressing relative to the internal standard signal amplitude. When a ratio of signal to noise (S/N) of blank sample is higher than 3, its relative retention time (RRT) is equivalent to RRT of the spiked milk sample and its response area is higher than 1 % of that of the spiked milk sample, then, the result is deemed false positive. Moreover, the selectivity was guaranteed by following up the multi-reaction monitoring (MRM) transitions per substance on LC-MS/MS and the relative retention time. The detection capability (CC $\beta$ ) which is the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of  $\beta = 5$  %. Probability of false non-compliance  $\leq 5$  % was tested with 20 milk samples. The latter, had been spiked at 0.5 MRL and analyzed according to two criteria. Firstly, relative retention time (RRT) of the suspect sample had to be in a range of  $\pm 2.5$  % around the RRT of the standard solution. Secondly, S/N ratio of the daughter ion

**Table 3** Mass spectrometry parameters used for the screening of antibiotic residues in milk

Analyte	Transition	Cone voltage (V)	Collision energy eV
Amoxicillin	366 > 114	10	20
Ampicillin	350 > 106.1	30	20
Chlortetracycline	479.1 > 302.8	30	40
Cloxacillin	436.24 > 160.0	30	10
Dicloxacillin	469.9 > 160.1	30	10
Enrofloxacin	360.4 > 341.9	30	20
Erythromycin	734.4 > 576.6	30	20
Flumequine	262.1 > 244	30	20
Marbofloxacin	363.26 > 72	30	20
Nafcillin	415 > 199	30	10
Neospiramycin	699.4 > 174.2	30	20
Oxytetracycline + 4-epi-Oxytetracycline	461.1 > 443.1	30	10
Oxacillin	402.2 > 243.3	15	10
Penicillin G	335.1 > 176.1	30	10
Spiramycin	843.6 > 174.4	30	40
Sulfacetamide	215.2 > 156	30	10
Sulfachloropyridazine	285 > 155.8	25	15
Sulfadiazine	251 > 108	30	20
Sulfadimethoxine	311.1 > 156	30	20
Sulfadimidine	279.2 > 155.9	30	20
Sulfadoxine	311.2 > 155.9	30	20
Sulfaguanidine	215.1 > 156	25	15
Sulfamerazine	265.1 > 155.9	30	20
Sulfamethizole	271.1 > 107.8	30	20
sulfamethoxazole	254.1 > 108.1	30	20
sulfamethoxy-pyridazine	281 > 155.7	30	15
Sulfamonomethoxine	281.2 > 155.9	30	20
Sulfamoxole	268.2 > 155.9	30	10
Sulfapyridine	250.1 > 184	30	20
Sulfaquinolaxaline	301.2 > 107.7	30	20
Sulfathiazole	256.1 > 107.7	30	30
Sulfisoxazole	268.1 > 156.2	30	10
Tetracycline + 4-epi-tetracycline	445.1 > 410.1	30	20
Tilmicosin	869.8 > 174.1	65	45
Tylosin	916.6 > 127.2	30	40
Trimethoprim	291.3 > 230.3	60	20

had to be equal or higher than 10. In order to get a linear calibration curve at 5 points, standard solutions series of 0.25, 0.5, 1, 1.5 and 2 MRL were injected with the series of the samples extracted with 4 different methods (Table 1). In particular, these solutions were prepared using three mixtures of antibiotic standards at



**Table 4** Maximum residues limits (MRL\*), CC $\beta$  and number of samples analyzed for each antibiotic used for the validation of the selected method

Family of antibiotics	Antibiotics	MRL in milk ( $\mu\text{g/L}$ )	CC $\beta$ ( $\mu\text{g/L}$ )	Detection	
				CC $\beta$ spiked	CC $\beta$ Blank samples
Penicillins	Amoxicillin	4	2	20/20	20/20
	Penicillin G	4	2	20/20	20/20
	Ampicillin	4	2	20/20	19/20
	Cloxacillin	30	15	20/20	20/20
	Dicloxacillin	30	15	20/20	19/20
	Nafacillin	30	15	20/20	20/20
	Oxacillin	30	15	20/20	20/20
Quinolones	Enrofloxacin	100	50	20/20	20/20
	Marbofloxacin	75	37.5	20/20	20/20
	Flumequine	50	25	20/20	19/20
Macrolides	Erythromycin	40	20	20/20	19/20
	Spiramycin	200	100	20/20	20/20
	Tilmicosin	50	25	20/20	20/20
	Tylosin	50	25	20/20	19/20
	Neospiramycin	200	100	20/20	20/20
Tetracyclines	Chlortetracycline	100	50	20/20	20/20
	Oxytetracycline+ 4-epi-oxytetracycline	100	50	20/20	20/20
	Tetracycline+ 4-epi-Tetracycline	100	50	20/20	20/20
Sulfonamides	Sulfadiazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfapyridine	100	50	20/20	20/20
	Sulfamethoxyipyridazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfadoxine	100	50	20/20	20/20
	Sulfadimethoxine	100	50	20/20	20/20
	Sulfadimidine	100	50	20/20	20/20
	Sulfamonomethoxine	100	50	20/20	20/20
	Sulfamoxole	100	50	20/20	20/20
	Sulfaquinoxaline	100	50	20/20	20/20
	Sulfachloropyridazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfathiazole	100	50	20/20	20/20
	Sulfamerazine	100	50	20/20	20/20
	Sulfamethoxazole	100	50	20/20	20/20
	Sulfacetamide	100	50	20/20	20/20
	Sulfisoxazole	100	50	20/20	19/20
	Trimethoprim	50	25	20/20	20/20
	Sulfaguanidine	100	50	20/20	20/20
Sulfamethizole	100	50	20/20	20/20	

\*MRL (EU 37/2010)

1MRL: mix 1 (macrolides – tetracyclines), mix 2 (sulfonamides - quinolones), and mix 3 (penicillins). After adding specific volume of each internal standard to the mix, the intermediate solutions were evaporated to dryness at 40 °C. The specific volumes of penicillins and Milli-Q water were added in order to obtain final

solutions at 300  $\mu\text{L}$  with final concentrations of 250, 500, 1000, 1500, and 2000  $\mu\text{g/L}$ , respectively. In order to evaluate applicability of the present multi-residue method, the collected milk samples (194) were analyzed. Additionally, the interpretation of results was based on five criteria (Commission Decision 2002) which

were: a S/N ratio of the ionic transitions greater than ten, the difference of the chromatographic retention time was within 2.5 % range of the retention time of the same peak in standard solution, area of the sample was higher than area of blank, area of sample was higher than area of spiked sample, and concentration of the sample analyzed was higher than MRL and LOD.

#### Stability of antibiotics in milk

Taking in consideration that lben is produced within 1 day of fermentation at temperature room; the stability of antibiotic residues was evaluated. Consequently, milk purchased in a Belgian supermarket was used either as a negative control ( $n = 2$ ), or enriched ( $n = 3$ ) as a test material. The enrichment was done at 0.5 MRL as prescribed for meat matrices (Commission Regulation 2377/1990) with mixtures of antibiotic standards of sulfonamides, penicillins, quinolones, macrolides, and tetracyclines. The samples were stored at different storage temperature (4 and 21 °C) and tested at various time periods (day 0, 2 and 7). The analysis was performed using LC-MS/MS after extraction (method 3). First and for most, the initial values were determined on the day of extraction (day 0). After that, samples stored at 4 and 21 °C were analyzed at day 2 and day 7 of storage. Some of these abused storage conditions also mimicked or overestimated the transport of the samples from Algeria to Belgium as well as possible practices in Algeria. These data also served for antibiotic stability evaluation.

#### Statistical analysis

In order to select the most suitable method extraction; the analytical methods were compared on the basis of the recoveries sufficient for the screening purposes, and only for the antibiotics having lower MRL in milk than in meat. The latter was defined as the ratio of MRL in milk to MRL in meat by being lower or equal to 0.5. In addition, Sstatistical analysis of the recovery results obtained with the four methods was performed using two-factor weighted ANOVA test with replication ( $n = 2$ ) using S-Plus 8.0 for Linux (Tibco, Palo Alto, CA, US). The first factor was the method used and the second was the type of antibiotic. At the same time, the interaction between these two factors was also studied. Since the latter was significant, the comparison between the four methods was done per each antibiotic and corrected for simultaneous hypothesis testing according to Sidak (1967). Similar was done for comparison of storage effect on antibiotics. Statistical significance was tested at significance level of 0.05 and 0.01.

A generalized linear model for binomially distributed data was fit to model the frequency of positive LC-MS/

MS and Delvotest SP-NT results using the logit link. These results were contrasted between different types of milk collected at the farms and points of sale. In particular, milk type was considered as a fixed factor, whereas, farm and points of sale were random ones. Also, the comparison between the different milk types was evaluated and *P*-values were corrected for simultaneous hypothesis testing, according to Tukey. For correlation purposes, results of the examined residues (without MRL, and non-authorized) using LC-MS/MS were considered as positive.

The agreement between the two tests was calculated using Cohen's kappa and its associated *P*-value. In addition, since the Delvotest SP-NT appeared to lack specificity, a list of antibiotics was set up containing the positive LC-MS/MS results and those for which there were more negative than positive Delvotest SP-NT.

## Results

### Optimization of the LC-MS/MS screening method

The main requirement for a reliable screening method is to detect authorized substances above the regulatory limits MRL and unauthorized at a level of MRPL; which is the minimum required performance limit, minimizing false negative results (Freitas et al. 2013). Before the final method validation, four methods were compared and the results presented in Table 2 were statistically evaluated to select the appropriate one. Comparison using ANOVA was limited to antibiotics (11 antibiotics) with lower MRL in milk than in meat (MRL ratio equal or lower than 0.5). Since highly significant interactions were observed between methods and antibiotics, methods were compared with each other for each of those selected antibiotics separately. Among the comparative results, the main differences were marked between two method groups. Particularly, out of 11 compared antibiotics, the recoveries of eight (method 1 as opposed to method 4) and seven (method 2 as opposed to method 3) were significantly different ( $p < 0.05$ ). This result may be explained by the analytical differences of the methods. Method 3 presented recoveries that were higher than other methods and closer to 100 %. In a second step the lowest recoveries were compared among the methods to ensure that final method may detect all selected antibiotics. It was observed that only for erythromycin and nafcilin higher recoveries were obtained when applying method 3. Taking this in account and the fact that other compounds were acceptable for screening purposes by method 3, it was decided to use this method further in the study.

The optimized extraction method was validated for macrolides, penicillins, quinolones, sulfonamides, and tetracyclines. Except, ampicillin, dicloxacillin, flumequine, erythromycin, tylosin, and sulfisoxazole which were characterized with some interference peaked within

retention time range resulting in 5 % of false positive, the rest of the specificity compounds analyzed in 20 blank milk samples were negative. The detection capability levels were 50 % of MRL for all compounds in accordance to the guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Table 4) (Community Reference Laboratories 2010). A linear calibration curve was obtained according to concentrations used. The correlation coefficient was  $\geq 0.80$  for all analyzed substances. One hundred ninety-four (194) milk samples were analyzed using this screening method. Within these, one hundred twenty-seven (127) were found non-conform. More details are presented in LC-MS/MS results section.

#### Delvotest

Out of 154 samples analyzed in this study 39 were positive forming 25.3 % of the total samples. According to the results presented in Table 5, the highest frequencies of positive results by Delvotest SP-NT prescreening were obtained for treated cow's milk (61.5 %), followed by untreated cow's milk (20.8 %), and market fermented cow's milk (20 %). Yet, market raw cow's milk (16.7 %) and bulk tank milk (10.3 %) were tested less positive than treated cow's milk. Correspondingly, a high percentage of positive results in the sample category of treated cow's milk were significantly different from untreated cow's milk and bulk tank milk ( $p \leq 0.01$ ).

#### LC-MS/MS results

The comparison between different types of milk collected from distinct sources did not reveal any significant differences. As presented in Table 5, 127 out of 194 samples analyzed were found positive (65.5 %). The highest frequencies of positive results with LC-MS/MS analysis were obtained for milk collected from the market where each sample of collected raw milk was contaminated (100 % samples positive) and followed by fermented milk (85 % samples positive). High percentage of positive results was similarly found in samples collected from the farms. Hereby, the milk collected from treated cows contained the most antibiotic residues

(68 %), followed by milk samples collected from untreated cows (58 %), and lastly bulk tank milk (54 %).

#### Correlation between LCMS/MS and Delvotest SP-NT results and occurrence of specific antibiotics

Only 131 milk samples were used for the comparative assessment of results obtained by Delvotest SP-NT and LC-MS/MS. Specifically, the comparison of the total numbers of results using Cohen's Kappa illustrated that there was no evidence of agreement between results obtained by LC-MS/MS and Delvotest SP-NT (Table 6). Furthermore, from 131 milk samples only 18 samples were negative by both LC-MS/MS and Delvotest SP-NT methods. In this study, 15 samples showed doubtful results and 13 samples presented positive results with Delvotest SP-NT. Both groups of samples (doubtful and positive results) were later confirmed negative by LC-MS/MS. Furthermore, results presented in Tables 6 and 7 also show that in 52 samples initially found negative by Delvotest SP-NT multiply antibiotics were detected by LC-MS/MS. The most abundant residues ( $\beta$ -lactams) were followed by macrolides. Sulfonamides, quinolones, and tetracyclines consecutively were present at similar low frequencies. Finally, 20 milk samples were confirmed positive by both methods and additionally 13 samples initially found questionable by Delvotest SP-NT were confirmed positive by LC-MS/MS. This all implies that LC-MS/MS method was more sensitive than Delvotest SP-NT.

#### Stability of antibiotics in milk during storage

The noticeable increase in measurable antibiotics was observed after storage. The followed antibiotics were spiked to blank milk samples which were stored during short (2 or 7 days) period. After 2 days there was no change of antibiotics independently of the storage conditions, but a significant increase in measurable antibiotics was noticed after 7 days both at 4° and 21 °C. These differences are shown in Fig. 1. For most of the antibiotics this difference was significant independently of the temperature at which milk was stored whereas for certain antibiotics it was insignificant ( $p > 0.05$ ). This was for neospyramycine, sulfamethoxypridazine, sulfaquinolaxine,

**Table 5** Comparison of the results for different milk types obtained by Delvotest and LC-MS/MS

	Delvotest negative	Delvotest positive	%Delvotest positive	LC-MS/MS conform	LC-MS/MS non-conform	% LC-MS/MS positive
Bulk tank milk	26	3	10.3 <sup>a</sup>	16	19	54 <sup>a</sup>
Individual untreated cow's milk	57	15	20.8 <sup>a</sup>	41	58	59 <sup>a</sup>
Individual treated cow's milk	10	16	61.5 <sup>b</sup>	7	15	68 <sup>a</sup>
Market raw cow's milk	10	2	16.7 <sup>ab</sup>	0	18	100 <sup>a</sup>
Market fermented cow's milk	12	3	20 <sup>ab</sup>	3	17	85 <sup>a</sup>

Groups with the same letter behind the percentage of % Delvotest positive are not significantly different from each other at level of 0.05  
Groups with the same letter behind the percentage of % LC-MS/MS positive are not significantly different from each other at level of 0.05

**Table 6** Statistical agreement between results obtained by two techniques Delvotest SP-NT and LC-MS/MS

	Delvotest negative	Delvotest positive	Delvotest doubtful
LC-MS/MS conform	18	13	15
LC-MS/MS non-conform	52	20	13

Total number of results for each results category was compared and Cohen's kappa (-0.1042, P value: 0.1578) was calculated

OTC+epi-OTC2 and TC+epiTC1 at 4 °C; for penicilline G, trimetoprim at 21 °C and for: tylosine, dicloxacilline, sulfapyridine, sulfisoxazole at both temperatures. The results also shown lack of significant difference in antibiotic concentration in milk kept 2 days on either temperatures. However, the significant difference among some antibiotics was noticed after analyzing samples kept 7 days. At 21 °C after 7 days it was possible to measure significantly more antibiotics, in particular neospyramycine, spyramicine, cloxacilline, dicloxacilline, penicilline G, sulfacetamide, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfamoxole.

## Discussion

Monitoring large numbers of milk samples for the presence of residues in excess of the levels laid down under community legislation requires low cost screening methods. In practice, it is primarily performed using microbiological screening methods, because of their high

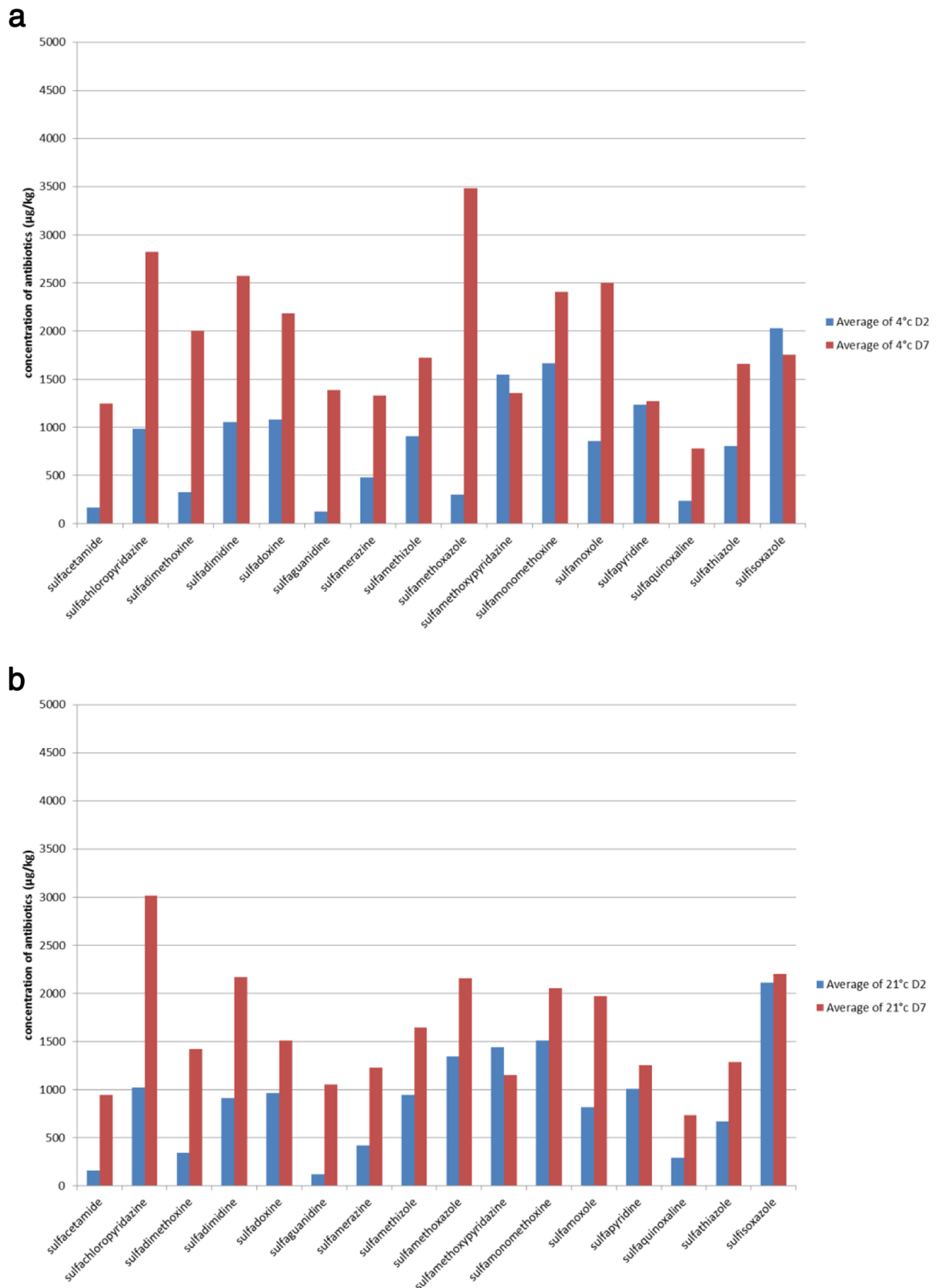
**Table 7** Comparison of the results obtained by LC-MS/MS and Delvotest SP-NT given as frequency (%) of the measurement appearances

Antibiotic	(Frequency of results, %)		
	LC-MS/MS positive & Delvotest negative	LC-MS/MS positive & Delvotest positive	LC-MS/MS positive & Delvotest doubtful
Ampicillin	26.9	10	38.5
Oxacillin	9.6	/	/
Tylvalosin	11.5	5	/
Tilmicosin	13.5	10	/
Amoxicillin	42.3	40	/
Erythromycin	1.9	/	/
Tilosyn	1.9	/	/
Sulfathiazole	1.9	/	/
Sulfamerazine	1.9	/	/
Sulfamethizole	1.9	/	/
Enrofloxacin	1.9	/	/
Spiramicin	1.9	/	/
Nafcillin	1.9	/	/
Josamycin	1.9	/	7.7
Tulathromycin	1.9	/	/
Doxycyclin	1.9	/	/

cost-effectiveness compared to physical-chemical detection. In general, these assays can be operated: without special training, do not depend upon specialized equipment, and target a broad spectrum of antimicrobial residues within one test (Pikkemaata et al. 2009). The most widely used tests which are commercially available are microbial inhibitor tests with spores of *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* –Delvotest SP, Copan Test, Charm Farm-960 Test, and others (Žvirdauskienė and Šalomskienė. 2007). Within this study, Delvotest SP-NT was the selected one to be used for the assessment of antibiotic residues in milk samples collected in Guelma (Algeria). As the main limitation of this and other similar microbial assays non-specificity is usually assumed (Bilandzic et al. 2011). For a visual reading of in particular Delvotest SP-NT, clear yellow and clear purple colors are easy to determine. However, visual assessment of samples containing intermediate concentrations of antimicrobials is more difficult, even for experienced technicians which render the visual judgment of the colored reaction as in Delvotest SP-NT subjective (Suhren and Luitz. 1995; Stead et al. 2008). In such samples, the test medium often shows a cloud of purple in a yellow background indicating a suspect positive result. In addition, different types of milk and the different modes of action of antimicrobial compounds can lead to different colors in the test, making the interpretation more difficult (Stead et al. 2008). In turn, this makes Delvotest SP-NT less suitable for decisive analyses leaving spaces for disputable results (false positives, eg). Another explanation could be that false positive Delvotest SP-NT reactions may occur in samples from freshly calved cows due to the fact that natural inhibitors and incomplete milking could be responsible for positive reaction (Hillerton et al. 1999).

To confirm the results obtained by those screening tests more specific, fast and sensitive techniques could be used. One such a method is LC-MS/MS technique which was employed in this study to verify the results of the Delvotest SP-NT. The comparative analyses pointed out several discrepancies between the methods, a number of false negative results using Delvotest SP-NT were identified and the sensitivity of Delvotest SP-NT for different groups of antibiotics as well as milk type was evaluated.

Whereas according to Delvotest SP-NT the most contaminated samples were those obtained from treated cows, LC-MS/MS revealed that the samples collected from the markets were mostly contaminated. Antibiotics in milk of treated cows could arise from a collection of milk shortly after administration of antibiotics. Subsequently, it may also reflect a certain disrespect of a prescribed antibiotic withdrawal time due to overdose usage, failure to observe withdrawal time, drug misuse or the bad hygiene (Zinedine et al. 2007; Petrović et al. 2008; Mensah



**Fig. 1** Estimation of the antibiotic concentration in samples stored at two temperatures (4° and 21 °C) and during two periods (2 and 7 days). \*The results present the estimated concentration of antibiotics measured in samples stored at 4 °C (a) and at 21 °C (b). The results are average of three measurements

et al. 2014b; Boulouf. 2015). Establishment of a withdrawal time depends on different criteria (type of used antibiotic, quantity of given antibiotic, the way of applications, and as well age, health status, lactation stage and individual features of dairy animals) (Nikolić et al. 2011). Certain studies indicated that some African breeds may differ in terms of their genetic heritage making them more suited to local climatic conditions (water consumption, volume of distribution, and renal clearance) but non directly comparable to antibiotics withdrawal time as determined for breeds representative of a large-scale production in developed countries (Mensah et al. 2014a). Therefore, certain adaptation to local conditions could be envisaged.

Milk samples collected from the markets were provided by different private milk collectors that brought milk in isotherm tanks collected from private and/or governmental farms, and from small-scale cow's milk producers. The latter are widely dispersed in rural Algerian territories and located very far from urban areas and far away from any control by competent authorities. Actually, the accurate detection of low levels of antimicrobial drug residues in milk, as it was done in the study, is not only of great importance for governmental control laboratories and the dairy industry, but also for farmers to enable them to ensure that contaminated milk from individual cows is not consigned to the bulk tank (Stead et al. 2008) and prevent the further transfer of antibiotics in the food chain.

Algerian executive decree N°14-366 of December 15th, 2014 that regulates the conditions and the applicable modalities regarding contaminants tolerated in foodstuffs, does not mention sufficient information on the control plan and the dosage of the residues of antibiotics (Décret exécutif 2014). In fact, auto-control in dairy industries is commonly done following the European legislation. In contrast, quality assurance is rather low or not strictly followed in many African countries like in Algeria. Hence, the lack of statutory legal framework in Algeria may be a contributor to a high presence of the forbidden or regulated antibiotics residues in animal-derived foodstuffs (Mensah et al. 2014b).

In this study lben samples were highly contaminated. The fermented milk 'lben' is prepared by letting raw cow's milk to be naturally fermented within 24 h at room temperature. Fermentation of milk mainly involves lactic acid bacteria (LAB), but micrococci, coryneforms, yeasts and moulds can also occur (Zamfir et al. 2006). After that, it must be subjected to churning and removing of butter. Literature suggests that the presence of antibiotics in milk may affect fermentation processes in food production industries (Hsieh et al. 2011). Therefore, the fermentation during lben production may be affected if residues of antibiotics are present by possibly inhibiting the growth of the starter cultures (Nikolić et al. 2011). For this reason,

the performance of Delovtest SP-NT was questioned. Whereas no specific limitations for analyzing antibiotic residues in fermented milk are neither mentioned by the manufacturer nor verified in some studies (Hennart and Faragher 2012), the fate of antibiotics in milk type as lben is not fully evaluated. Except a study on raibi milk from Morocco (Zinedine et al. 2007), there is a lack of scientific data on fate of antibiotic residues in fermented milk (lben). This milk type is sour milk and may be a product of mostly lactic acid bacteria fermentation (Ouahghiri et al. 2009) and therefore may contain some byproducts, certain natural antimicrobial substances of that fermentation type. In turn, results obtained may represent the reaction of the test to those antibiotics already present in raw milk (Zinedine et al. 2007).

The shelf life of 'lben' is about 3 days at 4 °C. However, it was reported that sometimes "lben" may be kept at room temperature in the countryside with limited electricity supply. In this conditions 'lben' reaches high acidity levels after 2–3 days (Benkerroum and Tamime 2004). The results from our study have shown that in these conditions the antibiotic concentration appears to increase. This was independent of the temperature conditions (both 4° and 21 °C). More studies would be necessary to reveal whether these antibiotics would be easier bioavailable increasing the exposure to the consumers.

Recently, few studies in Algeria were performed on the presence of antibiotic residues in milk. Using Delvotest SP NT, Hakem et al. (2012) had found no contamination of raw milk collected from two Dairies Mitidja's Farms. However, in the present study, around 10 % of bulk tank milk samples and 20 % of samples of untreated cow's milk were positive. The latter was higher than the contamination prevalence in Algiers (9.87 %) indicated by Ben-Mahdi and Ouslimani (2009). Other authors, Zinedine et al. (2007) in Morocco Tarzaali et al. (2008) in Mitidja, Aggad et al. (2009) in the west of Algeria, Titouche et al. (2013) in Tizi-Ouzou, reported higher frequency of antibiotics positive milk samples (57, 89, 29, and 46 %, respectively). Similarly, frequency of positive farm bulk tank milk (40 %) was found to be higher in a study from Serbia (Petrović et al. 2008). Also results obtained for market raw cow's milk in the present study were comparable to those found in a study from Iran (19.78 %) (Aalipour et al. 2015). Nevertheless, contamination of marketed fermented cow's milk was lower than results attained for raibi milk (50 %) in the study of Zinedine et al. (2007). In general, 65.5 % of all analyzed samples using LC-MS/MS contained antibiotic residues at levels exceeding MRL. This positive frequency is much higher than 15 % (Li et al. 2012), 16.66 % (Meng et al. 2015) in China, 1.76 % (Martins et al. 2014) in Brazil, and 28 % (García et al. 2016) in Spain. Pereira et al. (2014) indicated that 47.17 % of analyzed samples were at

detectable concentration whereas Han et al. (2015) found 12 % at levels lower than MRL. Delvotest SP-NT has varying sensitivity to different antibiotics groups. According to the manufacturer and several reports (Althaus et al. 2003; Stead et al. 2008; Sierra et al. 2009a; DSM 2012, and Beltran et al. 2015), the sensitivity of Delvotest SP NT to  $\beta$ -lactams, as a main group of veterinary drugs used in therapy of cows in many countries is high except for cloxacillin. This one may be detected at levels higher than the MRL (Petrović et al. 2008). Delvotest SP-NT sensitivity to macrolides is limited to tylosin but erythromycin and spiramycin are detected at levels higher than MRL (DSM 2012). Althaus et al. (2003); Stead et al. (2008); Sierra et al. (2009b) and Beltran et al. (2015) also confirmed that the detection of erythromycin was at levels higher than MRL whereas, there are no data linked to Delvotest SP-NT sensitivity for the other macrolides (tilmicosin, tulathromycin, tylvalosin and josamycin). Furthermore, Delvotest SP-NT sensitivity to sulfonamides is limited only to sulfathiazole (DSM 2012). Enrofloxacin and doxycycline detection levels of this test were described by Sierra et al. (2009b). The latter argued that when the milk sample contained residues below the detection limit (LOD), the spores germinated and grew, thus, their metabolic activity made the indicator change the color. Althaus et al. (2003), Sierra et al. (2009b), Le Breton et al. (2007), and Comunian et al. (2010) noticed that Delvotest SP-NT demonstrated a lower ability to detect some other tetracyclines.

Both methods were in accordance for some milk samples that were found positive. The most frequently detected antibiotics were  $\beta$ -lactams. Mainly, amoxicillin (the most abundant residue in the studied milk) and ampicillin were found in half of the samples; which was still less than penicillin (97 %) and/or tetracycline (88 %) as reported by Ben-Mahdi and Ouslimani (2009), and Titouche et al. (2013), respectively where standard microbiological methods were used. The low cost of  $\beta$ -lactams in Algeria makes them easily available. The latter facilitated the use of penicillin by private farmers without veterinarian supervision in isolated places. Moreover, the presence of macrolides with low frequencies of tilmicosin and tylvalosin as -a residue without MRL - could be explained by their sporadic use. Aminoglycosides were not analyzed by LC-MS/MS method due to their relatively high MRL in comparison to meat. Fundamentally, Delvotest SP-NT manufacturer reported that the sensitivity of Delvotest SP-NT for dihydrostreptomycin and streptomycin is higher than MRL and lower than MRL for neomycin. Neomycin, in its turn, could be present within the 20 positive results of both methods. The high levels of contamination of milk samples by antibiotic residues can mainly be explained by massive and uncontrolled intermammary pharmaceutical preparations used for the treatment and prevention of bovine

mastitis, while the withdrawal times after treatment were probably not correctly respected. Similarly, the voluntary addition of bacterial growth inhibitors (antibiotics, antiseptics) in order to stop microbial growth and stabilize the microbial quality of milk (Zinedine et al. 2007) may also be considered as a possible cause. Another argumentation is supported by the study of Reybroeck (2010) where it was stipulated that the main reason for antibiotic residues in milk was the accidental milking of treated cows that went unnoticed in 66 % of the cases and the non-compliance of withdrawal time deadlines in 41 % of the cases.

### Conclusion

To conclude, the study findings preliminary revealed that the presence of antibiotics in raw and fermented cow's milk collected in Guelma region and intended for either direct consumption and/or fermentation was high. The results highlighted 65.5 % of non-conform samples contained authorized residues at levels higher than the MRL, residues without set MRL, or non-authorized residues. The occurrence of antibiotic starting from farm's milk and ending in milk purchased from markets in Guelma province indicated the necessity of further control of milk. Providing that there is a lack of data in this domain, the control and assessment might be considered on a national level. Additionally, to obtain results an extraction method with LC-MS/MS detection was validated following regulatory criteria and demonstrated satisfactory results for all parameters. The comparison of results of both methods showed that Delvotest SP-NT could not be accurately trusted under these circumstances. However, LC-MS/MS represented a better screening alternative with a possibility to further investigate each group of compounds applying the specific extraction to increase the sensitivity of the method and decrease the LOD. The present LC-MS/MS method could be used in Algerian National Residue Control Plan as a versatile analytical tool to monitor and determine the occurrence of antibiotic multi-residues in milk and other food matrices after optimization.

### Acknowledgements

The authors are thankful to those farmers who kindly provided milk samples and cows treatment data. The authors are very grateful for the financial support of the Algerian Ministry of the Superior Education and Scientific Research and University of Guelma for the training. A great acknowledgement goes to the technical support for LC-MS/MS analysis given by Khariklia Tsilikas, Jean-Yves Michelet, and Tim Reyns from Scientific Institute of Public Health (ISP.WIV) Brussels, Belgium. Special acknowledgments goes to Radhia Layada for the considerable work on refining the language of the manuscript. As well as, appreciations are delivered to Mr. Joens Vinas (Spain) and DSM food specialties (Netherlands) for providing Delvotest SP-NT Kits.

### Authors' contributions

SL and DEB conceived the study. SL performed the collection of the samples, all practical work, the interpretation of the results, and drafted the manuscript with supervision of MA. MA designed the stability study and the

LC-MS/MS analytical method approach. WC performed the statistical analysis of all the results. All authors took parts in drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 8 December 2015 Accepted: 19 October 2016

Published online: 28 October 2016

### References

- Aalipour F, Mirlohi M, Jalali M, Azadbakht L. Dietary exposure to tetracycline residues through milk consumption in Iran. *J Environ Health Sci Eng.* 2015;13:80. doi:10.1186/s40201-015-0235-6.
- Aggad H, Mahouz F, Ammar YA, Kihal M. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Revue de Méd Vét.* 2009;160(12):590–5.
- Althaus RL, Torres A, Montero A, Balasch S, Molina MP. Detection limits of antimicrobials in ewe milk by delvotest photometric measurements. *J Dairy Sci.* 2003;86:457–63.
- Belhadia M, Yakhlef H, Kouache B (2011) Filière lait, performances et insuffisances de la production et de la collecte du lait cru, cas des élevages bovins laitiers dans la région du haut Chélif. Dans : Résumés papier présenté dans le Premier Séminaire National sur le lait et ses dérivés : « entre réalité de Production et réalités de transformation et de consommation », Université de Guelma, Algérie, 4–5 Octobre 2011
- Beltran MC, Berruga MI, Molina A, Althaus RL, Molina MP. Performance of current microbial tests for screening antibiotics in sheep and goat milk. *Int Dairy J.* 2015;41:13–5.
- Benkerroum N, Tamime AY. Technology transfer of some Moroccan traditional dairy 28 products (Iben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 2004;21:399–413.
- Ben-Mahdi M, Ouslimani S. Mise en évidence des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérie. *Eur J Sci Res.* 2009;36(3):357–62.
- Bilandzic N, Kolanovic BS, Varenina I, Scorticini G, Annunziata L, Brstilo M, Rudan N. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control.* 2011;22:1941–8.
- Bogjalli S, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Laganà A, Nicolardi S. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. *Food Chem.* 2008;108:354–60.
- Boix C, Ibanez M, Sancho JV, Leon N, Yusa V, Hernandez F. Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chem.* 2014;160:313–20.
- Borràs S, Companyó R, Granados M, Guiteras J. Analysis of antimicrobial agents in animal feed. *TrAC Trends Anal Chem.* 2011;30(7):1042–64.
- Boultif L. Détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Thèse de Doctorat: Université Mentouri Constantine, Algérie; 2015.
- Cepurnieks G, Rjabova J, Zacs D, Bartkevics V. The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;102:184–92.
- Commission Decision (2002/657/EC) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun L* 221: 8–36
- Commission Regulation (EU) N° 37/2010 text with EEA relevance of 22/12/2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun L* 15: 1–72
- Commission Regulation (EU) N° 2377/1990 Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun L* 224
- Community Reference Laboratories Residues (CRL) (2010) Guidelines for the Validation of Screening Method for residues of Veterinary Medicines (Initial Validation and Transfer). Available on [http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs\\_vet-med-residues\\_guideline\\_validation\\_screening\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf)
- Comunian R, Paba A, Dupré I, Daga ES, Scintu MF. Evaluation of a microbiological indicator test for antibiotic detection in ewe and goat milk. *J Dairy Sci.* 2010; 93:5644–50.
- Council Regulation No 1831/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union L* 268: 29–43
- Décret exécutif n° 14–366 du 22 Safar 1436 correspondant au (15 décembre 2014) de la République Algérienne fixant les conditions et les modalités applicables en matière de contaminants tolérés dans les denrées alimentaires. *J.O.R.A* 74: 13–14
- DSM food Specialties (Netherlands) (2012) Bulletin technique Delvotest® SP NT. Available on <https://www.hygielim.com/Assets/Client/images/HYGIALIM/Schema/1008123.pdf>.
- Ferrini AM, Agrimi U, Appicciafuoco B, et al. *Accred Qual Assur.* 2015;20:267. doi:10.1007/s00769-015-1127-2.
- Freitas A, Barbosa J, Ramos F. Development and validation of a multiresidue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk. *Int Dairy J.* 2013;33(1):38–43.
- García ND, Junza A, Zafra-Gomez A, Barron D, Navalón A. Simultaneous determination of quinolone and b-lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control.* 2016;60:382–93. doi:10.1016/j.foodcont.2015.08.008.
- Hakem A, Yabrir B, Khelef D, Laoun A, Mouffok F, El-gallas N, Titouche Y, Ben-aissa R. Evaluation of microbial quality of raw milk into two dairies Mitidja's Farms (Algeria). *Bulletin USAMV Veterinary Medicine.* 2012;69(1–2). <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/view/8850>.
- Han RW, Zheng N, Yu ZN, Wang J, Xu XM, Qu XY, Li SL, Zhang YD, Wang JQ. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS. *Food Chem.* 2015;181:119–26.
- Hennart SL, Faragher JJ. Validation of the Delvotest SP NT DA "Performance Tested Method" 011101". *J AOAC Int.* 2012;95(1):252–60. doi:10.5740/jaoacint.11-138.
- Hermo MP, Nemutlu E, Kir S, Barron D, Barbosa J. Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC-UV, LC-FD, LC-MS and LC-MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC. *Anal Chim Acta.* 2008;613:98–107.
- Hillerton JE, Halley BI, Neaves P, Ros MD. Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using delvotest microbial inhibitor tests. *J Dairy Sci.* 1999;82(4):704–11.
- Hou XL, Chen G, Zhu L, Yang T, Zhao J, Wang L, Wu YL. Development and validation of an ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014;962:20–9.
- Hsieh MK, Shyu CL, Liao JW, Franje CA, Huang YJ, Chang SK, Shih PY, Chou CC. Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. *Vet Med-Czech.* 2011;56(6):274–85.
- Jank L, Martins MM, Arsand JB, Motta TM, Hoff RB, Barreto F, Pizzolato TM. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC–MS/MS). *Talanta.* 2015;144:686–95. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.078.
- Kassaify Z, Abi Khalil P, Sleiman F. Quantification of antibiotic residues and determination of antimicrobial resistance profiles of microorganisms isolated from bovine milk in Lebanon. *FNS.* 2013;4:1–9.
- Le Breton MH, Savoy-Perroud MC, Diserens JM. Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *Anal Chim Acta.* 2007;586:280–3.
- Li H, Xia X, Xue Y, Tang S, Xiao X, Li J, Shen J. Simultaneous determination of amoxicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2012;900:59–63.
- Martins MT, Melo J, Barreto F, Hoff RB, Jank L, Bittencourt MS, Arsand JB, Schapoval EES. A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2014;129:374–83.
- Meng Z, Shi Z, Liang S, Dong X, Li H, Sun H. Residues investigation of fluoroquinolones and sulfonamides and their metabolites in bovine milk by quantification and confirmation using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2015;179:597–605. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.067.
- Mensah SEP, Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M, Mensah GA, Abiola FA. Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: public health risks. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2014a;33(3):975–86.



- Mensah SEP, Aboh AB, Salifou S, Mensah GA, Sanders P, Abiola FA, Koudandé OD. Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin *J Appl Biosci*. 2014b;80(1) doi:10.4314/jab.v80i1.9
- Nikolić N, Mirecki S, Blagojević M. Inhibitory substances in raw milk. *Mljekarstvo*. 2011;61(2):182–7.
- Ouadghiri M, Vancanneyt M, Vandamme P, Naser S, Gevers D, Lefebvre K, Swings J, Amar M. 14 Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 15 'lben'. *J Appl Microbiol*. 2009; 106:486–95.
- Pereira RV, Siler JD, Bicalho RC, Warnick LD. Multiresidue screening of milk withheld for sale at dairy farms in central New York State. *J Dairy Sci*. 2014;97:1513–9.
- Petrović JM, Katić VR, Bugarski DD. Comparative examination of the analysis of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk by enzyme, receptor–enzyme, and inhibition procedures. *Food Anal Methods*. 2008;1:119–25. doi:10.1007/s12161-007-9007-y.
- Pikkemaata MG, Rapallinib MLBA, Oostra-van Dijkstra S, Elferinka JWA. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Anal Chim Acta*. 2009;637(1–2) doi:10.1016/j.aca.2008.08.023
- Ramírez A, Gutiérrez R, Díaz G, Gonzalez C, Pérez N, Vega S, Noa M. High-performance thin-layer chromatography–bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. *J Chromatogr*. 2003;874:315–22.
- Reybroeck W. Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey. Doctorat dissertation: Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent; 2010.
- Sidak Z. Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *J Am Stat Assoc*. 1967;62:626–33.
- Sierra D, Sánchez A, Contreras A, Luengo C, Corrales JC, Morales CT, de la Fe CI, Guirao I, Gonzalo C. Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for  $\beta$ -lactams in goat's milk. *J Dairy Sci*. 2009a;92:3585–91.
- Sierra D, Contreras A, Sánchez A, Luengo C, Corrales JC, Morales CT, de la Fe CI, Guirao I, Gonzalo C. Short communication: detection limits of non- $\beta$ -lactam antibiotics in goat's milk by microbiological residues screening tests. *J Dairy Sci*. 2009b;92:4200–6.
- Stead SL, Ashwin H, Richmond SF, Sharman M, Langeveld PC, Barendse JP, Stark J, Keely BJ. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest® SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *Int Dairy J*. 2008;18:3–11.
- Suhren G, Luitz M. Evaluation of microbial inhibitor tests with indicator in micro-titer plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft*. 1995;50:467–70.
- Tarzaali D, Dechicha A, Gharbi S, Bouaissa MK, Yamnaine N, Guetarni D (2008) Recherche des résidus des tétracyclines et des bêta-lactamines dans le lait cru par le MRL Test (ROSA TEST) à Blida, Algérie. Papier présenté dans : 6èmes Journées Scientifiques Vétérinaires sur le médicament vétérinaire : nouvelles approches thérapeutiques et impact sur la santé publique. E.N.V, Algérie, 23–24 Avril 2008.
- Titouche Y, Hakem A, Houali K, Yabrir B, Malki O, Chergui A, Chenouf N, Yahiaoui S, Labiad M, Ghenim H, Kechih-Bounar S, Chirilă F, Nadăș G, Fiț NI. Detection of antibiotics residues in Raw Milk produced in freha area (Tizi-Ouzou), Algeria. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*. 2013;70:1843–5378.
- Wang J, Leung D, Lenz SP. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2006;54:2873–80.
- Zamfir M, Vancanneyt M, Makras L, Vaningelgem F, Lefebvre K, Pot B, Swings J, De Vuyst L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst Appl Microbiol*. 2006;29(23):487–95.
- Zinedine A, Faid M, Benlemlih M. Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique. *REMISE*. 2007;1:1–9.
- Zoubeidi M, Gharabi D. Impact du PNDA sur la performance économique des filières stratégiques en Algérie: cas de la filière lait dans la wilaya de Tيارت. *Revue Ecologie-Environnement* 9. 2013
- Žvirauskienė R, Šalomskienė J. An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk. *Food Control*. 2007;18:541–7.

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)