

# Stabilité des antibiotiques en présence de biocides désinfectants dans l'eau d'abreuvement des porcs

Anne HÉMONIC (1), Patrick PUPIN (2), Cécile JACOB (2), Jean LÉORAT (3), Pierre MARIS (4), Isabelle CORRÉGÉ (1)

(1) IFIP-Institut du porc, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35104, 35651 Le Rheu

(2) Laboratoire LCV, 35221 Châteaubourg

(3) Chêne vert conseil, 35220 Châteaubourg

(4) Anses-Laboratoire de Fougères, 35133 Javené

anne.hemonic@ifip.asso.fr

## Stability of antimicrobials in contact with disinfectants in drinking water for pigs

In farms, when antimicrobials are administered through drinking water, they may be in contact with a disinfectant used to improve the bacteriological quality. The objective of this study is to evaluate the stability of antimicrobials in this situation. Six antimicrobials (amoxicillin, colistin, doxycycline, tylosin, trimethoprim and sulfadiazine) and three disinfectants (sodium hypochlorite, hydrogen peroxide and electrolyzed water) were tested. Each antimicrobial was tested as an active ingredient and as a veterinary medicinal product to assess the potential effect of the formulation. In a first step, antimicrobial assay was performed by high performance liquid chromatography in a stock solution with and without disinfectant, at T0, T12 and T24 hours, which is the usual storage period in farms. In a second step, the same assay was performed after neutralization of the disinfectant by sodium thiosulfate or sodium bisulfite. In a third step, the stock solution was incorporated at 5 % into disinfected water, to simulate a treatment administered by a dosing pump. All antimicrobials were stable with sodium hypochlorite. With hydrogen peroxide, amoxicillin was deteriorated by 13 % in step 1, but not in step 2 with sodium bisulfite. This disinfectant also impacted tylosin in step 3 (- 11 %). With electrolyzed water, colistin and sulfadiazine were rapidly deteriorated in step 1 (respectively -20 % and - 11 %), but not in step 2 with sodium thiosulfate. However, with the exception of trimethoprim, no antimicrobial was stable in step 3, which implies to connect the dosing pump to a circuit without electrolyzed water.

## INTRODUCTION

En élevage, l'eau d'abreuvement est fréquemment traitée par un biocide désinfectant afin d'en améliorer la qualité bactériologique. Cette eau peut également servir de vecteur de médicaments, dont les antibiotiques. Cependant, la compatibilité entre les biocides désinfectants et les antibiotiques est mal documentée. L'objectif de cette étude est d'évaluer la stabilité des antibiotiques en présence de désinfectants dans l'eau de boisson.

### 1. MATERIEL ET METHODES

Les antibiotiques testés ont été choisis parmi les familles les plus utilisées dans l'eau de boisson en élevage porcin d'après les données de l'Anses-ANMV (2014). Les principes actifs retenus sont la colistine, la doxycycline, l'amoxicilline, le triméthoprim (TMP), la sulfadiazine et la tylosine. Chaque principe actif a été testé seul (PA) et intégré dans une spécialité vétérinaire (SV) de façon à évaluer l'effet potentiel de la formulation sur la sensibilité de l'antibiotique au désinfectant. Le choix de la spécialité vétérinaire a été réalisé de façon arbitraire parmi les offres du marché. Tous les antibiotiques ont été dilués dans l'eau en respectant la posologie définie dans l'autorisation de mise sur le marché. Les biocides désinfectants retenus sont l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène stabilisé à 50 %, fréquents en élevage,

ainsi que l'eau électrolysée, en développement. Pour les deux premiers, les doses appliquées visent les seuils recommandés par les fabricants, à savoir 0,5 mg/l de chlore actif et entre 30 et 50 mg/l de peroxyde d'hydrogène. Pour l'eau électrolysée, de l'anolyte neutre fabriquée en élevage a été récupérée et incorporée à 2 % lors des essais, ce qui correspond à la fourchette basse du fabricant : le taux de chlore actif ainsi obtenu était supérieur à 5 mg/l et celui du peroxyde d'hydrogène était compris entre 3 et 10 mg/l. Les dilutions ont été réalisées dans une eau de source du commerce.

L'étape 1 du protocole a consisté à doser chaque antibiotique, dilué avec chaque désinfectant, par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), à T0, T12 et T24 heures, ce qui correspond à la durée de stockage usuelle des solutions mères en élevage. Les dosages ont été réalisés par le laboratoire LCV selon les conditions chromatographiques de la pharmacopée européenne, après validation de la phase de préparation des échantillons par des solutions témoins étalons aux concentrations visées. Dans l'étape 2, le même protocole a été appliqué après neutralisation des désinfectants. L'hypochlorite de sodium et l'eau électrolysée ont été neutralisés par du thiosulfate de sodium, incorporé respectivement à 0,01 g/l et 0,025 g/l. Le peroxyde d'hydrogène a été neutralisé par du bisulfite de sodium incorporé à 0,265 g/l. Dans l'étape 3, les solutions mères contenant l'antibiotique et le désinfectant neutralisé ont été incorporées à 5 % dans une eau avec le désinfectant non neutralisé, pour reproduire une

administration de traitement par pompe doseuse. Les dosages ont été réalisés à T0 et T1 heure, afin de simuler le temps de circulation de l'antibiotique de la pompe doseuse à un abreuvoir. Parallèlement aux trois étapes, des échantillons témoins ont été réalisés pour doser chaque antibiotique dans une eau non désinfectée, afin d'évaluer sa stabilité naturelle après dilution. Tous les dosages ont été réalisés en double et l'analyse a été faite avec la moyenne des deux résultats obtenus.

Deux indicateurs ont été retenus pour vérifier la stabilité des antibiotiques : la variation entre les concentrations réelles et attendues à T0, ce qui a permis de connaître l'impact du désinfectant sur l'antibiotique dès la mise en contact; la variation des concentrations obtenues entre T24 et T0 (étape 1) ou entre T1 et T0 (étape 3) pour caractériser l'évolution dans le temps de cet impact. Un antibiotique a été considéré stable quand la concentration mesurée était comprise entre 90 et 110 % de la concentration attendue, ce qui correspond aux marges retenues dans les tests de stabilité (Directive 2004/28/CE et lignes directrices EMEA/CVMP/846/99-REV.1).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les principes actifs de TMP et de sulfadiazine étant insuffisamment solubles, les tests ont été réalisés sur une seconde spécialité vétérinaire combinant ce couple de molécules. La solubilité médiocre de cette seconde spécialité vétérinaire a été suffisante pour valoriser les résultats de sulfadiazine mais pas de TMP, qui n'a donc pu être testé que sur la première spécialité vétérinaire qui était bien soluble. Pour la tylosine, seuls les résultats de la spécialité vétérinaire constituée de 100 % de tylosine ont été valorisés. Les essais sur une spécialité vétérinaire constituée de 9 % de tylosine ont donné des résultats incohérents par la méthode HPLC.

Aucun antibiotique n'a été dégradé au contact de l'hypochlorite de sodium (Tableau 1). Avec le peroxyde d'hydrogène, les concentrations en amoxicilline, sous forme de principe actif et spécialité vétérinaire, ont baissé de plus de 13 % à 24 heures dans l'étape 1, sachant qu'à 12 heures, la baisse était déjà respectivement de 12 et 9 % (non présentée dans le tableau). Une stabilité normale a été retrouvée avec la neutralisation du peroxyde d'hydrogène dans l'étape 2 (non présentée dans le tableau). La tylosine est également sensible à ce désinfectant dans l'étape 3 avec une baisse de la concentration de 11,3 % dès T0, puis légère aggravation de 6,2 % sur 24 heures. La dégradation moins marquée de la tylosine dans l'étape 1 peut s'expliquer par sa concentration plus forte lui conférant une meilleure stabilité. Ce résultat est cohérent avec le principe de réaliser les tests de stabilité à la plus basse concentration prévue afin de se positionner dans la situation la plus à risque (lignes directrices EMEA/CVMP/846/99-REV.1). Avec l'eau électrolysée, la sulfadiazine et la colistine sont respectivement dégradées de plus de 11 % et 20 % dès T0 dans l'étape 1. L'ajout de thiosulfate de sodium dans l'étape 2 a corrigé ce problème. Dans l'étape 3, seul le TMP semble stable à T0. Tous les autres antibiotiques sont dégradés : baisse de 12 % pour la tylosine, de 15-18 % pour la sulfadiazine et entre 42 et 52 % pour la doxycycline, l'amoxicilline et la colistine. A T1, la situation se dégrade peu, sauf pour la tylosine dont la concentration baisse

encore de 12,5 %. Enfin, l'ensemble des conclusions tirées pour les principes actifs et les spécialités vétérinaires étant similaires, il ne semble pas y avoir d'effet de la formulation sur la sensibilité de l'antibiotique au désinfectant.

**Tableau 1** – Variations (en %) des concentrations en antibiotiques dans une eau témoin et traitée avec désinfectant

		Témoin		Hypochlorite de sodium		Peroxyde d'hydrogène		Eau Electrolysée	
		ét. 1 <sup>(1)</sup>	ét.3	ét.1	ét.3	ét.1	ét.3		
<b>Δ entre les concentrations réelles et attendues à T0</b>									
<b>ΔC<sup>(2)</sup> entre T24 et T0 (ét. 1) ou entre T1 et T0 (ét. 3)</b>									
Doxycycline	PA <sup>(3)</sup>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	<b>3,5</b>	<b>-2,6</b>	<b>-51,7<sup>(4)</sup></b>	
	SV <sup>(3)</sup>	-0,1	-0,5	-0,2	-2,1	-0,6	-0,3	-1,6	
Amoxicilline	PA	<b>-2,3</b>	<b>-4,7</b>	<b>-4,3</b>	<b>-3,8</b>	<b>-3,4</b>	<b>-8</b>	<b>-44,2</b>	
	SV	-0,6	-0,5	-0,3	-0,4	0,3	-0,3	-0,3	
Colistine	PA	<b>-2,6</b>	<b>-2,1</b>	<b>-5,3</b>	<b>-2,7</b>	<b>-3,5</b>	<b>-5,3</b>	<b>-41,5</b>	
	SV	-0,1	0,1	-0,2	-13,7	-2,9	0,7	0,3	
TMP	PA	<b>-2,3</b>	<b>-2,4</b>	<b>-4,4</b>	<b>-2,3</b>	<b>-1,9</b>	<b>-4,5</b>	<b>-42</b>	
	SV	-0,5	-0,3	-0,1	-13,3	-4,3	0,5	0,3	
Sulfadiazine	PA	<b>0,3</b>	<b>-0,1</b>	<b>-6,9</b>	<b>0,3</b>	<b>1,6</b>	<b>-20,4</b>	<b>-51,7</b>	
	SV	-0,7	-0,7	-3,3	-0,9	-2,9	-3,1	-1,6	
Tylosine	PA	<b>-0,2</b>	<b>1,4</b>	<b>-7,7</b>	<b>1,3</b>	<b>5,9</b>	<b>-20,7</b>	<b>-44,2</b>	
	SV	-4,8	-4,9	-3,7	-8,6	-2,4	-5	-0,3	
Sulfadiazine	SV	<b>-4,2</b>	<b>-3,9</b>	<b>-5,1</b>	<b>-4</b>	<b>-5,1</b>	<b>-4,3</b>	<b>-5,6</b>	
	SV	-5	-1,7	0,5	-1,9	-0,1	-0,4	NE <sup>(5)</sup>	
Sulfadiazine	SV1	<b>-2,9</b>	<b>-3,1</b>	<b>-3,1</b>	<b>-3</b>	<b>-2,8</b>	<b>-11,3</b>	<b>-18,4</b>	
	SV2	-1,4	0,1	0,3	0,2	0,2	0,7	5,1	
Tylosine	SV1	<b>0,2</b>	<b>-1,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>-7,9</b>	<b>-15,3</b>	
	SV2	-2,6	-0,4	0,2	-2,8	0,1	0,3	5,2	
Tylosine	SV	<b>-1,1</b>	<b>-0,9</b>	<b>-2,1</b>	<b>-5,2</b>	<b>-11,3</b>	<b>-3,2</b>	<b>-12</b>	
	SV	3,1	3,4	-0,1	4,3	-6,2	2,5	-12,5	

<sup>(1)</sup> ét = étape; <sup>(2)</sup> ΔC = Variation des concentrations ; <sup>(3)</sup> PA = principe actif, SV = spécialité vétérinaire ; <sup>(4)</sup> Cases grisées pour les résultats hors gamme de stabilité ; <sup>(5)</sup> Non Exploitable (résultats contradictoires entre les deux analyses)

## CONCLUSION

Cette étude contribue à connaître la stabilité de plusieurs antibiotiques en présence de désinfectants dans l'eau d'élevage : aucun antibiotique n'a été dégradé au contact de l'hypochlorite de sodium. L'amoxicilline et la tylosine sont légèrement sensibles au peroxyde d'hydrogène. A part le TMP, aucun antibiotique n'est stable dans l'eau électrolysée. Dans ce cas, il est donc indispensable de raccorder la pompe doseuse à un circuit d'eau non désinfectée par ce type de biocide.

## REMERCIEMENTS

Etude financée par France Agrimer. Les auteurs remercient le comité de pilotage : H. Amar et T. Moréac (Anses-ANMV), J. Dupuis (AFMVP), M. Liber (AVPO-SNGTV), M.A. Barthélémy (SIMV), N. Capdevielle (CEVA), C. Carles (Biove), R. Fleury (Coophavet).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anses-ANMV, 2014. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2013. 57 p.
- Directive 2004/28/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires.
- Lignes directrices EMEA/CVMP/846/99-REV.1. Guideline on Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products.