

Impact de la désinfection de l'eau d'abreuvement des porcs, des volailles et des lapins sur la stabilité des antibiotiques

Anne HEMONIC (1), Pierre GUICHARD (1,2), Adeline BORDAS (2), Tiphaine MOREAC (5), Anne CHEVANCE (5), Jérôme BLOT (5), Angélique TRAVEL (3), Bernadette LENORMAND (4), Mélanie LIBER (4), Jean LEORAT (4), Jocelyne VERDON (5), Dominique HURTAUD-PESSEL (2), Jean-Pierre ORAND (5), Hélène AMAR (5), Pierre MARIS (2), Laure BADUEL (5), Sophie MOMPÉLAT (2)

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

(2) Anses, laboratoire de Fougères, 35300 Fougères

(3) ITAVI – Institut technique de l'aviculture, 41 Rue de Beaucemaine, 22440 Ploufragan

(4) SNGTV – Société nationale des groupements techniques vétérinaires, 5 Rue Moufle, 75011 Paris

(5) Anses, Agence Nationale de Médicament Vétérinaire, 35300 Fougères

anne.hemonic@ifip.asso.fr

Impact de la désinfection de l'eau d'abreuvement des porcs, des volailles et des lapins sur la stabilité des antibiotiques

En élevage, l'eau d'abreuvement est fréquemment traitée par un biocide désinfectant pour améliorer sa qualité bactériologique. Cette eau peut également servir de vecteur de médicaments pour le traitement collectif des animaux. Or, la vérification de la compatibilité entre les biocides et les médicaments n'est pas exigée dans les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché. Cette étude vise à évaluer l'impact des biocides sur la stabilité des antibiotiques. Dix spécialités vétérinaires (SV) de doxycycline, amoxicilline, sulfamides-triméthoprime, tiamuline et colistine ont été testées avec deux biocides (peroxyde d'hydrogène à 50 ppm et hypochlorite de sodium à 0,5 ppm de chlore actif) dans des eaux standardisées douce (6°f, pH=6) et dure (35°f, pH=8). Puis l'amoxicilline, la tiamuline et la doxycycline ont été diluées avec du H₂O₂ dans une eau de puits riche en fer et en manganèse. Les antibiotiques ont été dosés par Chromatographie Liquide-UV à plusieurs échéances dans une solution-mère concentrée et dans une solution diluée au vingtième pour simuler une administration par pompe doseuse ou par bac. Pour chaque analyse, la stabilité d'une substance était considérée insuffisante si sa concentration moyenne était inférieure de plus de 10 % à celle de l'échantillon témoin sans biocide et si la différence était significative (T-test, p<0,05).

Le peroxyde d'hydrogène a impacté la stabilité des deux SV d'amoxicilline en eau dure, d'une SV d'amoxicilline en eau douce et d'une SV de doxycycline dans l'eau de puits. Le chlore a dégradé la colistine en eau douce et toutes les SV sauf les sulfamides en eau dure. Cette étude confirme l'impact des désinfectants sur la stabilité de certains antibiotiques dans l'eau et démontre le caractère multifactoriel et complexe de cette stabilité.

Impact of disinfection of water for pigs, poultry and rabbits on the stability of antibiotics

On farms, drinking water is frequently treated with a disinfectant to improve its bacteriological quality. This water can also be used to administer collective treatments for animals. However, verifying the compatibility between biocides and medicines is not required for marketing authorization. This study aimed to evaluate the impact of biocides on the stability of antibiotics. Ten veterinary medicinal products (MP) containing doxycycline, amoxicillin, sulfonamides-trimethoprim, tiamulin or colistin were tested with two biocides (hydrogen peroxide at 50 ppm and sodium hypochlorite at 0.5 ppm of active chlorine) in two standardized water: soft (6°f, pH = 6) and hard (35°f, pH = 8). Then, amoxicillin, tiamulin and doxycycline were diluted with H₂O₂ in well water rich in iron and manganese. Antibiotics were dosed by UV-liquid chromatography at different defined times in a stock solution and in a 1:20 diluted solution to simulate administration by a dosing pump or a tank. For each analysis, a substance was considered insufficiently stable if its mean concentration was more than 10% lower than that of the control sample without biocide and if the difference was significant (T-test, p <0.05).

Hydrogen peroxide impacted the stability of both amoxicillin MPs in hard water, only one amoxicillin MP in soft water and one doxycycline MP in the well water. Chlorine degraded colistin in soft water and all MPs except sulfonamides in hard water. This study confirms the impact of disinfectants on the stability of some antibiotics in water and demonstrates the multifactorial and complex nature of this stability.

INTRODUCTION

En élevage de porcs, volailles et lapins, l'eau d'abreuvement est fréquemment traitée par un biocide désinfectant pour améliorer sa qualité bactériologique et ainsi protéger la santé des animaux (Anses, 2010). L'eau d'abreuvement est également utilisée comme vecteur de médicaments (antibiotiques, anti-inflammatoires, vaccins, vermifuges...) pour le traitement collectif des animaux. Dans les trois filières concernées, il s'agit même de la principale voie d'administration pour les antibiotiques oraux, l'aliment arrivant en seconde position (Anses, 2018). Par rapport à ce dernier, l'eau présente notamment l'avantage de permettre des traitements plus ciblés, réactifs et flexibles, à condition toutefois que les élevages soient équipés d'une pompe doseuse ou d'un bac et que les éleveurs maîtrisent les conditions de leur utilisation (Hémonic *et al.*, 2016).

Deux types de produits peuvent donc se retrouver simultanément dans l'eau : des biocides désinfectants et des médicaments. Or, la vérification de la compatibilité entre ces produits n'est pas exigée dans les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Cette étude vise donc à évaluer l'impact des biocides désinfectants de l'eau sur la stabilité des antibiotiques, afin de compléter les résultats précédemment obtenus par Hémonic *et al.* (2017), qui avaient montré que tous les antibiotiques étaient restés stables au contact de l'hypochlorite de sodium alors qu'ils avaient tous été dégradés, à des degrés plus ou moins importants, dans l'eau électrolysée.

1. MATERIEL ET METHODES

L'étude a été réalisée en deux phases. La première phase a évalué la stabilité des antibiotiques en présence de biocides dans des « eaux standards » de laboratoire telles que définies par la ligne directrice européenne EMEA/CVMP/540/03 Rev.1. La seconde phase a évalué la stabilité d'une sélection de couples antibiotiques-biocides dans une eau de puits prélevée en élevage.

1.1. Phase 1 dans des « eaux standard » de laboratoire

Les antibiotiques testés ont été choisis selon les volumes de vente en 2015 (Anses, 2016), leur utilisation dans l'eau de boisson dans au moins deux des trois filières considérées et leur intérêt en médecine vétérinaire. Sept substances actives ont ainsi été retenues : la doxycycline, l'amoxicilline, la tiamuline, la colistine, et le triméthoprime combiné à la sulfadiazine ou à la sulfadiméthoxine. Pour chaque substance active, deux spécialités vétérinaires (SV 1 et SV 2) ont été testées, à l'exception de la sulfadiazine et de la sulfadiméthoxine dont seule une spécialité a été testée. Le choix des SV a été réalisé de manière à étudier des formulations (liquide, poudre) et des excipients variés avec une bonne représentativité des différents titulaires d'AMM concernés et des filières d'élevages étudiées. Les antibiotiques ont été dilués dans l'eau en respectant la posologie définie dans les Résumés des Caractéristiques du Produit (RCP).

Deux biocides ont été retenus et choisis selon les pratiques usuelles en élevages : le peroxyde d'hydrogène stabilisé à l'acide orthophosphorique (H_2O_2) à 50 ppm et l'hypochlorite de sodium ($NaClO$) à 0,5 ppm de chlore actif.

Les antibiotiques et les biocides ont été dilués dans deux eaux standards : une eau acide et douce (pH = 6, dureté = 6°f) et une eau basique et dure (pH = 8, dureté = 35°f).

Le premier essai (Figure 1) a consisté à comparer la concentration d'antibiotiques dans une solution mère avec et sans biocide. Les antibiotiques ont été dosés au moment de la préparation de la solution-mère (T0), six heures après (T6) et 24 heures après (T24). La durée de 24 heures correspond au temps maximal conseillé de conservation de la solution médicamenteuse dans le bac de solution mère d'une pompe doseuse.

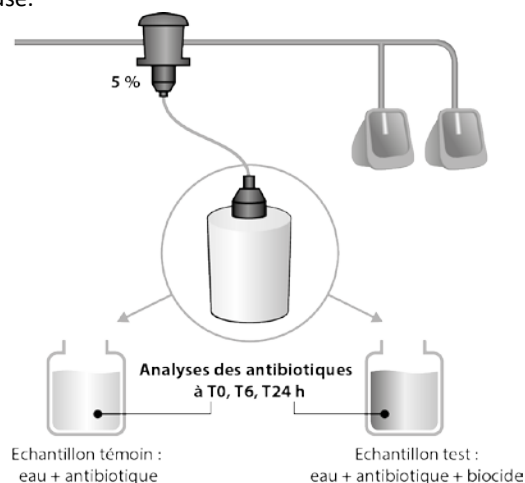


Figure 1 - Dilution et analyse des antibiotiques dans la solution mère concentrée

Le second essai (Figure 2) a consisté à comparer la concentration d'antibiotiques dans une solution diluée au vingtième, avec et sans biocide, pour simuler une administration par pompe doseuse réglée à 5% ou une administration directe par bac. Le dosage des antibiotiques a été effectué au moment de la dilution de la solution mère (T0') et six heures après (T6'). Cette durée de six heures a été choisie arbitrairement pour représenter la durée maximale pendant laquelle la solution de traitement pouvait circuler dans les canalisations entre la pompe doseuse et les points d'abreuvement. Une dilution et un dosage ont également été réalisés à T24' et T30'. L'échéance T24' correspond au moment où la solution mère, déjà conservée depuis 24 heures dans le bac, est diluée au vingtième pour être distribuée dans les canalisations. Puis l'antibiotique est dosé six heures après à T30'. Ce dernier cas de figure représente donc une situation de dégradation maximale de la substance active.

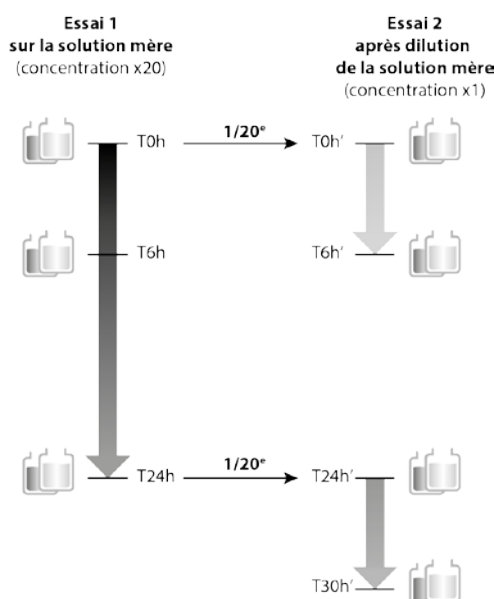


Figure 2 - Dilution et analyse des antibiotiques dans la solution diluée au vingtième à partir de la solution mère

Des méthodes analytiques par Chromatographie Liquide couplée à un détecteur UV ont été validées sur la gamme de concentrations d'intérêt pour chaque principe actif, puis utilisées pour les dosages de l'étude, excepté pour la méthode de dosage de la colistine pour laquelle la linéarité et la répétabilité des réponses n'ont pu être vérifiées.

A chaque échéance, tous les dosages ont été réalisés en double. La stabilité des médicaments a été exprimée en pourcentage de recouvrement des concentrations moyennes [Cmoy] en substance(s) active(s) présentes dans les échantillons avec le biocide par rapport à la concentration moyenne dans les échantillons témoins sans biocide :

$$\text{Stabilité en \%} = 100 \times \frac{\text{Cmoy de l'antibiotique avec biocide}}{\text{Cmoy de l'antibiotique sans biocide}}$$

Une substance active ayant perdu plus de 10 % de sa concentration par rapport à l'échantillon témoin à une échéance donnée, avec une différence ayant atteint un seuil de p-valeur inférieur à 0,05 (T-test) a été considérée comme significativement dégradée. Ce seuil de 10 % de perte correspond au maximum acceptable dans les dossiers d'AMM. Le logiciel Graph Pad® (Prism v. 5.04) a été utilisé pour ces analyses. Les données ont également été analysées statistiquement pour évaluer l'effet du biocide, de la dureté de l'eau et du temps de conservation des solutions sur la concentration en substance active de chaque SV. Les concentrations issues d'une même solution ayant été mesurées à différentes échéances, la condition d'indépendance des données, prérequis pour l'application de l'analyse de variance n'était pas satisfaite. L'utilisation de modèles mixtes a donc été retenue (logiciel R).

1.2. Phase 2 dans une eau de puits prélevée en élevage

L'objectif de cette phase était de se rapprocher de conditions potentiellement observables sur le terrain et d'évaluer la stabilité des antibiotiques en présence de peroxyde d'hydrogène (50 ppm) dans des eaux à fortes teneurs en fer et en manganèse. Une eau de puits superficielle, prélevée en élevage, a été retenue pour ses concentrations en fer (536 µg/L) et en manganèse (117 µg/L) dépassant d'au moins deux fois les limites réglementaires pour les eaux destinées à la consommation humaine (Arrêté du 11 Janvier 2007). Cette eau était également acide (pH = 6) et douce (dureté = 9°f), ce qui a permis de prendre comme référence les résultats obtenus avec l'eau de laboratoire acide et douce de la phase 1 (pH = 6, dureté = 6°f) pour comparer les résultats de la phase 2. Trois antibiotiques ont été sélectionnés dans cette phase 2 : l'amoxicilline (SV 2), la tiamuline (SV 1) et la doxycycline (SV 2). Le peroxyde d'hydrogène a été retenu pour les essais car c'est un biocide adapté au traitement des eaux très riches en fer et en manganèse, contrairement à l'hypochlorite de sodium. La méthodologie précédemment décrite pour la phase 1 a été reprise à l'identique pour la phase 2 (Figures 1 et 2).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Phase 1 dans une eau standard de laboratoire

L'analyse statistique à partir de modèles mixtes a montré que la dureté de l'eau et le temps de conservation des solutions ont eu un effet significatif sur la dégradation de quelques SV en présence de biocide (Tableau 1). Des résultats similaires (non présentés ici) ont également été trouvés avec les échantillons témoins sans biocide, mais estimés sans conséquence sur la stabilité de l'antibiotique, le seuil d'acceptabilité de 10 % de perte de la concentration n'étant pas dépassé. Ces résultats montrent donc que, malgré une légère dégradation de la substance active liée au temps post-dilution et à la dureté de l'eau, l'antibiotique reste dans une gamme de concentrations acceptables ne remettant pas en cause son efficacité thérapeutique.

Un effet significatif du biocide a également été constaté sur la quasi-totalité des SV dans les solutions mères et/ou diluées, ce qui confirme bien l'impact des biocides sur la dégradation des antibiotiques dans l'eau d'abreuvement (Tableau 1). Le tableau 2 précise les conditions dans lesquelles plusieurs substances actives ont significativement perdu plus de 10 % de leur concentration par rapport à l'échantillon témoin (p-valeur inférieure à 0,05 ; T-test).

Tableau 1 – Effet du biocide, de la dureté de l'eau et du temps de conservation des solutions sur les concentrations en substances actives dans les solutions mères et diluées

Principe actif	Type de solution	Spécialité	Effet dureté	Effet temps	Effet biocide
Amoxicilline	Solution mère	SV 1	S	ns	S
		SV 2	S	S	S
	Solution diluée	SV 1	ns	ns	S
		SV 2	ns	S	S
Doxycycline	Solution mère	SV 1	S	ns	ns
		SV 2	ns	ns	S
	Solution diluée	SV 1	S	ns	S
		SV 2	ns	ns	S
Sulfamides	Solution mère	SV 1	ns	ns	ns
		SV 2	ns	ns	ns
	Solution diluée	SV 1	S	ns	S
		SV 2	ns	S	S
Tiamuline	Solution mère	SV 1	ns	ns	S
		SV 2	S	ns	S
	Solution diluée	SV 1	ns	S	S
		SV 2	S	ns	S
Colistine	Solution mère	SV 1	ns	S	ns
		SV 2	ND	ND	ND
	Solution diluée	SV 1	S	ns	S
		SV 2	ND	ND	ND

Effet ND = Non Déterminé ; S = Significatif (p < 0,05) ; ns = non significatif

Tableau 2 – Pourcentage de recouvrement des concentrations moyennes en substance active dans les échantillons avec biocide par rapport à la concentration moyenne dans les échantillons sans biocide, avec une eau standard de laboratoire

			Doxycycline		Amoxicilline		Sulfadiazine (SDA)- Triméthoprime (TMP)		Sulfadiméthoxine (SDX)- Triméthoprime (TMP)		Tiamuline		Colistine	
			SV 1	SV 2	SV 1	SV 2	SDA	TMP	SDX	TMP	SV 1	SV 2	SV 1	SV 2
Peroxide d'hydrogène	Eau acide et douce	T0	97,1	94,9	97,6	103,1	96,8	98,1	92,9	91,9	101,9	106	98,8	98,7
		T6	100,2	102,9	99,1	72,4	ND	ND	105,0	98,2	101,6	98,7	97,7	100,6
		T24	96,7	103,7	101,2	67,2	97,4	98,3	85,4	86,0	100,6	99,1	101,1	100,4
		T0'	95,0	105,9	97,4	99,6	100,7	101,9	99,1	99,5	100,9	102	95,3	98,8
		T6'	94,8	99,5	96,5	51,5	99,3	99,7	88,9	87,4	100,1	107	97,1	98,5
		T24'	97,0	97,3	96,9	66,7	100,4	100,3	99,7	100,9	99,1	98,0	101,3	100,4
		T30'	97,2	97,2	93,6	42,7	99,4	100,7	95,7	93,4	98,4	101,5	103,7	100,2
	Eau basique et dure	T0	103,1	100,3	96,6	95,7	96,8	95,2	101,2	100,6	101,8	98,4	98,0	99,7
		T6	100	99,6	95,4	68,2	98,2	98,1	99,8	93,2	101,4	100,3	99,9	100,6
		T24	101,7	101,5	88,0	70,2	100,2	100,3	99,7	99,6	101,5	99,2	100,6	99,7
		T0'	99,5	100,7	99,1	94,8	92,8	91,2	88,6	89,3	96,3	100,5	100,4	99,6
		T6'	99,3	98,7	66,1	33,9	100,0	101,3	101,4	101,7	93,6	101,3	100,3	98,6
		T24'	98,7	99,7	88,2	65,4	98,9	99,0	97,6	97,5	99,0	107,9	100,3	99,7
		T30'	104,0	99,6	61,4	27,2	100,2	101,2	98,7	97,6	100,0	101,5	100,9	99,5
Hypochlorite de sodium	Eau acide et douce	T0	98,6	96,3	95,3	101,1	100,6	101,1	93,6	91,7	97,8	99,3	104,2	98,8
		T6	98,9	93,1	100,1	95,3	102,9	102,7	91,8	92,1	99,0	96,7	96,1	100,1
		T24	97,6	87,9	100,3	93,6	101,9	100,7	100,8	98,0	100,2	98,0	98,8	99,1
		T0'	96,0	95,5	94,7	98,6	96,9	96,6	102,5	103,7	91,1	92,0	87,8	74,9
		T6'	98,3	94,6	95,2	98,6	98,2	97,2	84,8	84,6	97,0	91,7	82,7	73,3
		T24'	93,9	94,6	97,2	96,5	98,8	100,0	99,6	100,8	98,1	92,8	81,5	73,7
		T30'	95,5	94,1	101,1	97,4	96,6	97,1	97,2	95,2	95,7	93,8	79,9	73,5
	Eau basique et dure	T0	99,4	91,8	105,6	99,1	97,9	98,0	106,7	106,4	99,3	98,2	101,3	89,7
		T6	99,1	97,0	101,7	98,3	94,7	94,5	110,2	99,1	99,6	100,0	99,2	89,8
		T24	99,6	98,0	104,3	103,2	93,5	94,4	101,5	101,2	100,5	98,1	ND	89,7
		T0'	87,7	86,5	88,4	90,1	94,6	98,0	99,6	99,9	90,8	63,4	84,3	24,3
		T6'	87,8	83,6	86,3	87,5	100,2	103,5	91,2	92,3	91,9	63,2	75,5	29,6
		T24'	88,9	85,9	91,9	91,1	88,5	105,2	98,6	102,9	90,8	68,9	65,5	35,4
		T30'	88,5	84,5	90,7	89,8	101,0	104,6	93,9	104,1	85,1	70,2	64,5	33,6

Les cases grisées signifient que l'antibiotique a perdu plus de 10 % de sa concentration par rapport à l'échantillon témoin et que cette différence est significative ($p < 0,05$). Par exemple un résultat de 67 % signifie que l'antibiotique n'est plus qu'à 67 % de la concentration attendue par rapport à l'échantillon témoin : il a perdu 33 % de sa concentration en présence du biocide

Sur dix spécialités vétérinaires étudiées, le peroxyde d'hydrogène a impacté la stabilité des deux spécialités d'amoxicilline en eau dure et d'une seule spécialité d'amoxicilline en eau douce (Tableau 2). En eau dure, SV 2 a perdu presque 30 % de sa concentration dans la solution concentrée à T24 et 73 % dans la solution diluée à T30'. Aux mêmes échéances, SV 1 a respectivement perdu 12 et 39 % de sa concentration. En eau douce, SV 1 est restée stable alors que SV 2 a perdu jusqu'à 57 % de sa concentration. Ces résultats confirment ceux qui avaient été trouvés par Hémonic *et al.* (2019) : l'amoxicilline est le seul des antibiotiques étudiés qui soit sensible à l'action oxydante du peroxyde d'hydrogène. En effet, l'amoxicilline appartient à la famille des pénicillines présentant un cycle bêta-lactame dont l'hydrolyse et l'instabilité sont connues (Gozlan *et al.*, 2013 ; Längin *et al.*, 2009). En présence de peroxyde d'hydrogène, ce cycle bêta-lactame a été fragilisé.

Une des nouveautés révélée ici est qu'il y a un effet « spécialité-dépendant » : SV 1 a mieux résisté que SV 2 à cette action oxydante, sans doute en raison d'excipients différents incorporés dans les spécialités vétérinaires. Du fait de cet effet « spécialité-dépendant » et que seules deux spécialités par substance active ont été étudiées ici, les résultats obtenus ne peuvent pas être extrapolés à toutes les spécialités contenant la même substance active. Il sera donc utile, à terme, que les laboratoires pharmaceutiques mènent des études complémentaires sur la stabilité de leurs spécialités vétérinaires dans différents types d'eau contenant différents biocides pour préconiser des recommandations d'usage et signaler des points de vigilance à adopter lors de la préparation des solutions médicamenteuses dans les élevages.

Cette étude montre également que la chloration n'a impacté que les deux spécialités de colistine en eau douce, alors qu'en

eau dure, elle a impacté les huit spécialités vétérinaires à base d'amoxicilline, doxycycline, colistine et tiamuline. Cet effet est certainement lié à la plus forte concentration de chlore dans l'eau dure et basique (pH = 8 ; 35°f) par rapport à l'eau douce et acide (pH = 6 ; 6°f). En effet, il est connu que le pH de l'eau conditionne l'équilibre chimique du chlore sous forme d'ions hypochlorites, peu actifs et majoritaires pour des pH > 7,5, vs d'acide hypochloreux, très actif et prépondérant pour des pH < 7,5 (Anses, 2015). Pour obtenir 0,5 ppm de chlore actif dans les échantillons d'eau, l'hypochlorite de sodium a donc dû être incorporé à un niveau trois fois plus élevé dans l'eau basique par rapport à l'eau acide. Or, l'ajout des antibiotiques dans l'eau basique a provoqué une diminution du pH qui est descendu entre 4 et 6,5 pour la doxycycline (selon les SV utilisées et leurs teneurs dans les solutions concentrées ou diluées), entre 6,1 et 7,8 pour l'amoxicilline, entre 3,8 et 7,0 pour la tiamuline et entre 6,4 et 7,8 pour la colistine. Cette baisse du pH a entraîné une prépondérance de l'acide hypochloreux et donc une hausse du taux de chlore actif à des niveaux très supérieurs à 0,5 ppm (puisque le chlore avait été incorporé à un niveau trois fois plus élevé dans l'eau basique que dans l'eau acide). Cette hausse de la concentration en chlore actif est l'hypothèse principale pour expliquer la dégradation accrue des antibiotiques en eau basique et dure par rapport à l'eau acide et douce. En élevage, ce problème ne devrait théoriquement pas se rencontrer : l'hypochlorite de sodium n'est pas la méthode choisie pour désinfecter des eaux bassiques et dures, précisément parce qu'il faut incorporer des doses beaucoup trop importantes pour avoir un résultat équivalent à celui obtenu en eau acide. Néanmoins, quel que soit le type d'eau utilisée en élevage, une vigilance et des contrôles seront nécessaires pour vérifier que le taux de chlore actif n'excède pas la recommandation de 0,5 ppm et éviter ainsi d'impacter la stabilité des antibiotiques. Ce seuil de 0,5 ppm peut notamment être dépassé en cas d'erreur sur le taux de chlore incorporé, lors d'électrolyse de l'eau ou lors d'acidification de l'eau (incorporation volontaire d'acides organiques dans le circuit d'eau pour prévenir les problèmes digestifs par exemple ou utilisation de certains médicaments qui abaissent le pH).

Par ailleurs, la dégradation comprise entre 17 et 27 % de la colistine en solution diluée en eau douce chlorée est un résultat qui diffère des conclusions de l'étude de Hémonic *et al.* (2019), selon laquelle aucune dégradation n'avait été notée. Néanmoins, le protocole était différent car le dosage de l'antibiotique dans la solution diluée n'avait été réalisé qu'une seule fois à une échéance équivalent ici à T1'. Or, SV 1 a été significativement dégradée sur l'intervalle de six heures après dilution (T6') mais elle était encore peut-être stable au bout d'une heure (dosage à T1' non réalisé), ce qui serait alors cohérent avec le résultat de Hémonic *et al.* (2019). L'hypothèse pour expliquer la différence de résultat sur la colistine entre les deux études est donc soit l'effet du temps de contact avec le biocide dans la solution diluée, soit une différence entre les spécialités étudiées : l'effet « spécialité-dépendant » est bien démontré ici avec SV 2 qui a été un peu plus sensible au chlore que SV 1. Mais les spécialités ayant été anonymées dans les deux études, il n'est pas possible de vérifier si elles étaient identiques ou différentes.

Au final, seules les deux spécialités de sulfamidés-triméthoprime étudiées se sont révélées stables quelles que soient les conditions testées (type d'eau, nature du biocide, concentration en substance active). Ce sont notamment les seules qui n'ont pas été impactées par l'effet du chlore en eau

dure. Une explication possible est que leur dilution n'a provoqué aucune diminution du pH de la solution, contrairement aux autres spécialités.

Enfin, quel que soit le biocide utilisé, l'impact sur les concentrations des spécialités vétérinaires semble plus marqué dans les solutions diluées que dans les solutions concentrées, ce qui avait déjà été constaté par Hémonic *et al.* (2019). Un tel résultat est cohérent avec le principe de la ligne directrice européenne de réaliser les tests de stabilité à la plus basse concentration prévue afin d'appréhender la situation la plus à risque (lignes directrices EMEA/CVMP/846/99-REV.1).

2.2. Phase 2 dans une eau de puits prélevée en élevage

Les résultats obtenus lors de la phase 2 ont globalement convergé avec ceux obtenus lors de la phase 1 pour l'amoxicilline et la tiamuline (Tableau 3). L'amoxicilline a été impactée par le peroxyde d'hydrogène dès six heures de contact, dans la solution concentrée et dans la solution diluée. La tiamuline est restée stable sur toute la durée de l'essai. Les fortes teneurs en fer et en manganèse dans l'eau n'ont donc pas aggravé les résultats de stabilité de ces antibiotiques en présence de peroxyde d'hydrogène.

Tableau 3 – Pourcentage de recouvrement des concentrations moyennes en substance active dans les échantillons avec biocide par rapport à la concentration moyenne dans les échantillons sans biocide, avec une eau de puits

	Doxycycline SV 2		Amoxicilline SV 2		Tiamuline SV 1	
	Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
T0	94,9	99,7	103,1	91,2	101,9	96,9
T6	102,9	96,8	72,4	73,9	101,6	95,5
T24	103,7	88,2	67,2	66,2	100,6	100,5
T0'	105,9	99,2	99,6	98,5	100,9	91,7
T6'	99,5	68,7	51,5	85,9	100,1	97,2
T24'	97,3	89,6	66,7	66,7	99,1	92
T30'	97,2	73,6	42,7	51,9	98,4	99,7

Les cases grisées signifient que l'antibiotique a perdu plus de 10 % de sa concentration par rapport à l'échantillon témoin et que cette différence est significative ($p < 0,05$)

En revanche, les résultats obtenus pour la doxycycline sont contradictoires entre les phases 1 et 2. La stabilité de la molécule a été significativement affectée par la présence de peroxyde d'hydrogène dans l'eau de puits (phase 2) alors qu'elle était préservée dans l'eau standard (phase 1). Néanmoins, ces résultats sont difficilement interprétables. En effet, de fortes précipitations ont eu lieu juste avant le prélèvement de l'eau utilisée pour l'analyse de stabilité, provoquant une forte contamination bactérienne du puits et un taux de fer deux fois plus élevé que celui initialement ciblé (1040 µg/L). Pour comprendre la dégradation de la doxycycline, plusieurs hypothèses peuvent donc être avancées : le peroxyde d'hydrogène pourrait être en partie responsable de la dégradation de la doxycycline observée lors de la phase 2 mais il n'a certainement pas été le seul facteur puisque la doxycycline était restée stable en présence de ce biocide dans la phase 1.

De même, les très fortes teneurs en fer, manganèse et flore bactérienne ne sont pas les seuls éléments explicatifs puisqu'elles n'ont eu aucun impact sur la stabilité de la doxycycline dans les échantillons témoins (résultats non présentés). C'est donc peut-être la présence d'une interaction entre plusieurs facteurs (biocide, minéraux, flore bactérienne, voire d'autres caractéristiques de l'eau non explorées ici) qui est

à l'origine de ce résultat. Au final, la phase 2 de cette étude a permis de montrer que la stabilité des SV dans l'eau revêt un caractère multifactoriel et complexe en conditions d'élevage. Il est donc important de connaître et de maîtriser la qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau d'abreuvement pour qu'elle soit la plus stable possible et de caractéristiques les plus proches possibles des exigences pour l'eau destinée à la consommation humaine (Arrêté du 11 janvier 2007). Une eau superficielle (eau de surface ou eau de puits peu profond) est notamment à risque car sujette à une plus grande variabilité de qualité qu'une eau souterraine et profonde.

CONCLUSION

Cette étude confirme l'impact des désinfectants sur la stabilité de certains antibiotiques dans l'eau et démontre le caractère multifactoriel et complexe de cette stabilité. Le peroxyde d'hydrogène a impacté la stabilité des deux spécialités d'amoxicilline en eau dure, d'une spécialité d'amoxicilline en eau douce et de la doxycycline dans l'eau de puits. Le chlore a dégradé la colistine en eau douce et toutes les SV en eau dure sauf les sulfamides.

Les travaux conduits dans ce projet permettront aux autorités françaises de porter des recommandations dans le cadre de la nouvelle réglementation européenne pour assurer l'utilisation efficace et sûre des médicaments administrés par voie orale en présence de biocides. Il s'agira à ce stade de recommandations générales car seules deux spécialités par substance active ont été étudiées dans cette étude. Les résultats obtenus ne peuvent donc pas être extrapolés à toutes les spécialités contenant la même substance active. Puis, à terme, l'objectif est que la vérification de la compatibilité entre les principaux biocides et les médicaments soit exigée dans les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), pour les antibiotiques, mais aussi pour les autres produits administrés par eau de boisson (anti-inflammatoires, vermifuges...).

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le plan Ecoantibio. Les auteurs remercient l'éleveur pour l'accès à l'eau de son puits et les techniciens pour les prélèvements d'eau en élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine
- Anses, 2010. État des lieux des pratiques et recommandations relatives à la qualité sanitaire de l'eau d'abreuvement des animaux d'élevage. Saisine 2008-SA-0162.
- Anses, 2015. Note d'appui scientifique et technique relatif « aux solutions d'alimentation de substitution en eau destinée à la consommation humaine ». Saisine n° 2014-SA-0053.
- Anses-ANMV, 2016. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015. 97 pages.
- Anses-ANMV, 2018. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2017. 97 pages.
- EMEA Position Paper EMEA/CVMP/1090/02-FINAL, 2002. Position paper on the maximum in-use shelf-life for medicated drinking water.
- EMEA Guideline EMEA/CVMP/540/03 Rev 1, 2005. Guideline on quality aspects of pharmaceutical veterinary medicines for administration via drinking water.
- Gozlan I., Rotstein A. and Avisar D., 2013. Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere* 91, 985-992.
- Hémonic A., Hugues L., Richard R., Loiseau D., Corrége I., 2015. L'administration de médicaments via l'eau de boisson par pompe doseuse : motivations, freins et pratiques d'utilisation. *Journées Rech. Porcine*, 48, 357-358.
- Hémonic A., Pupin, P., Jacot, C., Léorat, J., Maris, P., Corrége, I., 2017. Stabilité des antibiotiques en présence de biocides désinfectants dans l'eau d'abreuvement des porcs. *Journées Rech. Porcine*, 49, 223-224.
- Hémonic A., Poissonnet A., Chauvin C., Corrége I., 2019. Evolution des usages d'antibiotiques dans les élevages de porcs en France entre 2010 et 2016 au travers des panels INAPORC. *Journées Rech. Porcine*, 51, 277-282.
- Längin A., Alexy R., König A. and Kümmerer K., 2009. Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere* 75, 347-354.