

# Contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : évaluation préliminaire du transfert vers les denrées d'origine animale et du risque d'émergence d'antibiorésistance

Cristina SANTOS-SANTORUM, Murielle GAUGAIN, Agnès PERRIN, Michel LAURENTIE, Pascal SANDERS

ANSES – Laboratoire de Fougères, 10 B rue Claude Bourgelat – Javené - CS 40608 35306 FOUGERES Cedex, France

cristina.santossantorum.ext@anses.fr

Avec la collaboration de Alexis VIEL, Jean-François TAILLANDIER, Marie-Pierre LAGREE, Charlotte VALENTIN et Paméla HOUÉE

## Cross-contamination of feedstuffs by antibiotics: assessment of transfer to food of animal origin and risk of emergence of antibiotic resistance

The use of the same production lines for medicated and non-medicated feedstuffs can lead to cross-contamination with antibiotics, which can also occur during transport or storage of feeds. Animal exposure to low concentrations of antibiotics may have several consequences, such as a risk to human health due to antibiotic residues in animal products (e.g. meat) and an increase in the emergence of resistant bacteria. The objective of this preliminary project was to assess, after exposure of pigs to contaminated feed, the risk of transferring residues to tissues and the emergence of antibiotic resistance. A pilot study was conducted with six pigs divided in three groups to which low concentrations of different antibiotics (amoxicillin, oxytetracycline and sulfadimethoxine/trimethoprim, one per group) were administered through feed for 18 days at maximum. Samples of blood, feces, muscle, liver and kidney were collected periodically or at slaughter and analyzed. This pilot study served to adjust experimental and technical conditions for later studies that had more animals. Results of this study allowed us to draw some preliminary conclusions: sulfadimethoxine seems to be well absorbed and accumulated in muscles and the liver, in which concentrations were detected that exceeded the Maximum Residue Limit (MRL) allowed by European Union regulations (100 ng/g). In contrast, oxytetracycline seems to have low oral absorption; thus, the concentrations detected in feces were high, while those in muscles and the liver lay below the MRL. Finally, amoxicillin is below the limit of quantification (LOQ) of the analytical method in all matrices.

## INTRODUCTION

La présence fortuite d'antibiotiques dans les aliments pour animaux peut être occasionnée par l'utilisation de chaînes de production communes aux aliments médicamenteux et non médicamenteux ou avoir lieu pendant le transport et le stockage (Borràs *et al.*, 2011 ; Sandegren, 2014). La consommation de ces aliments par les animaux d'élevage peut entraîner un transfert d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale (McEvoy, 2002) ou favoriser l'émergence et le développement de bactéries résistantes au niveau du microbiote intestinal (Sandegren, 2014 ; Peeters *et al.*, 2018). L'objectif de ce projet préliminaire est i) d'évaluer le risque de transfert de ces antibiotiques vers les tissus après administration d'un aliment contaminé ii) d'étudier la cinétique plasmatique des molécules iii) de mesurer l'évolution des populations bactériennes sensibles et résistantes dans le microbiote intestinal.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Etude pilote

Une expérimentation animale pilote a été réalisée sur six porcs, divisés en trois groupes de deux animaux. Chaque groupe a reçu

deux fois par jour un aliment supplémenté d'un pré-mélange médicamenteux pour obtenir des concentrations en antibiotique équivalentes à un taux de contamination toléré par les bonnes pratiques de fabrication (2% de la dose posologique), soit amoxicilline (AMOX) 10 mg/kg aliment, oxytétracycline (OTC) 20 mg/kg ou sulfadiméthoxine (SDMT) associé au triméthoprime (TMP) 14,9:3,2 (SDMT : TMP) mg/kg aliment.

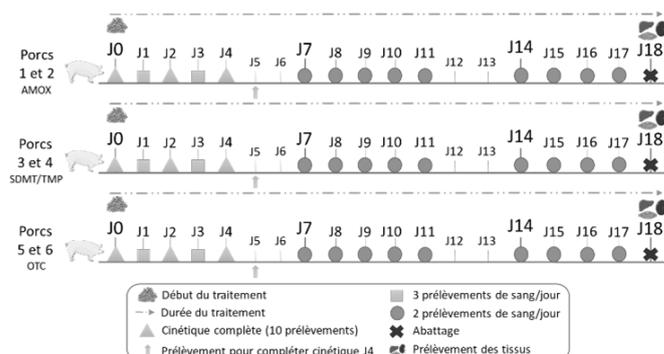


Figure 1 – Dispositif de l'expérimentation animale

AMOX : amoxicilline, OTC : oxytétracycline, SDMT/TMP : sulfadiméthoxine/triméthoprime

Le plan initial prévoyait un suivi sur 18 jours pour tous les animaux. Pour les analyses physico-chimiques, du sang a été prélevé plusieurs fois par jour et pendant plusieurs jours pour étudier la cinétique plasmatique des molécules (Figure 1).

Le muscle, le foie et les reins ont été récupérés au moment de l'abattage des animaux. Les fèces ont été prélevées tous les jours. Pour évaluer le risque d'antibiorésistance, des prélèvements de fèces ont été effectués deux fois avant le traitement, une fois au milieu du traitement et une fois à la fin de l'étude.

### 1.2. Analyses physico-chimiques

Le dosage des antibiotiques AMOX, OTC, SDMT et TMP (Sigma-Aldrich) a été effectué par spectrométrie de masse. L'AMOX-D<sub>4</sub>, la tétracycline, le SDMT-D<sub>6</sub> et TMP-D<sub>9</sub> ont été utilisés comme standard interne (Sigma-Aldrich). Une extraction liquide- ou solide-liquide (acétonitrile, Na<sub>2</sub>EDTA) a été appliquée pour les échantillons de plasma, foie, muscle et rein. Après ultra-centrifugation, une évaporation sous flux d'azote et une reprise dans l'eau ultra-pure, les extraits ont été injectés dans un système LC-MS/MS (TSQ Vantage, Thermoscientific). Une extraction en phase solide (SPE), avec tampon Mcllvaine puis purification sur cartouche Oasis HLB (Waters), a été appliquée pour les échantillons de fèces. Après évaporation sous flux d'azote et reprise dans l'eau, les extraits ont été injectés et analysés avec le même système LC-MS/MS.

### 1.3. Analyses microbiologiques

Les populations d'*E. coli* ont été dénombrées à partir des fèces congelées, sur milieu avec et sans antibiotique, pour estimer le pourcentage de résistance dans cette population bactérienne, avant et après administration d'un aliment contaminé.

Les résultats quantitatifs des dosages physicochimiques ont été analysés par des statistiques descriptives.

## 2. RESULTATS

Certains animaux présentant des symptômes d'infection, l'expérimentation animale n'a pas été menée jusqu'au terme des 18 jours pour un des porcs dans chaque groupe, la durée réelle étant de sept jours pour le porc 3, de neuf jours pour le porc 2 et de 10 jours pour le porc 5. Néanmoins, malgré le petit nombre d'animaux traités dans cette étude pilote et la durée de traitement différente, les concentrations d'antibiotique retrouvées dans les tissus après abattage sont similaires entre les porcs traités du même groupe. L'absorption de la SDMT est élevée, avec des concentrations plasmatiques qui augmentent progressivement les deux premiers jours pour ensuite se stabiliser au bout de 48 heures à des concentrations comprises au minimum à 1580 ng/ml avant la prise alimentaire et au maximum à 2440 ng/ml après la deuxième prise alimentaire. Que ce soit à 7 ou à 18 jours, les concentrations tissulaires de

SDMT atteignent deux fois la Limite Maximale de Résidus (LMR) dans le muscle et cinq fois la LMR dans le foie. Les concentrations de TMP sont en dessous de la limite de quantification (LOQ) de 10 ng/ml pour environ la moitié des prélèvements de plasma et en dessous de la LOQ de 20 ng/g pour tous les prélèvements de fèces. En ce qui concerne le muscle, les concentrations moyennes de TMP restent en dessous des LMR (Tableau 1), et dépassent la LMR dans le foie pour un des deux porcs. Pour l'OTC, la concentration plasmatique augmente progressivement pour ensuite se stabiliser au bout de 24 heures à des concentrations comprises au minimum à 11 ng/ml avant la prise alimentaire et au maximum à 37 ng/ml après la deuxième prise alimentaire. Cette molécule est présente dans les fèces à une concentration moyenne de 12 707 ng/g ( $\pm 920$ ), ce qui semble indiquer qu'elle est faiblement absorbée. Pour les tissus, l'OTC se retrouve en dessous des LMR (Tableau 1). Finalement, l'AMOX se retrouve en dessous de la LOQ de nos méthodes dans toutes les matrices analysées (25 ng/ml pour le plasma et 10 ng/g pour les tissus). L'AMOX dans les fèces n'a pas été dosée car la méthode analytique n'a pas pu être validée.

**Tableau 1** – Concentration moyenne de chaque antibiotique dans les différents tissus<sup>1</sup>

Matrice	Antibiotique (LMR en ng/g)	Concentration moyenne, ng/g	LOQ, ng/g
Muscle	AMOX (50)	<LOQ	10
	SDMT (100)	196,88 $\pm$ 11,46	
	TMP (50)	19,39 $\pm$ 1,82	
	OTC (100)	40,79 $\pm$ 5,96	
Foie	AMOX (50)	<LOQ	10
	SDMT (100)	563,03 $\pm$ 27,8	
	TMP (50)	59,35 $\pm$ 18,04	
	OTC (300)	15,3 $\pm$ 3,87	

<sup>1</sup>LMR : Limite Maximale de Résidus ; LOQ : limite de quantification. Voir le texte pour les noms d'antibiotique

Quel que soit l'antibiotique étudié et avant même le début du traitement, le nombre de *E. coli* résistants est équivalent au nombre de *E. coli* totaux dans la flore fécale des animaux.

## CONCLUSION

Les résultats préliminaires obtenus dans les conditions de cette étude pilote montrent que sur les trois prémélanges testés à des concentrations tolérées par les bonnes pratiques de fabrication, i) la présence de résidus de SDMT dans le muscle et le foie à des teneurs dépassant les LMRs pourrait entraîner un risque d'exposition pour le consommateur et ii) la présence d'OTC dans les fèces à des concentrations sub-inhibitrices pourrait favoriser l'émergence de populations bactériennes résistantes chez des animaux hébergeant une flore de départ sensible. Ces résultats préliminaires seront à confirmer dans une étude principale où le nombre d'animaux sera plus élevé.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Borràs S., Companyó R., Granados M., Guiteras J., Pérez-Vendrell A.M., Brufau J., Medina M., Bosch J., 2011. Analysis of antimicrobial agents in animal feed. Trends Anal. Chem., 30, 1042-1064.
- McEvoy J.D.G., 2002. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. Anal. Chim. Acta, 473, 3-26.
- Peeters L.E.J., Croubels S., Rasschaert G., Imberechts H., Daeseleire E., Dewulf J., Heyndrickx M., Butaye P., Haesebrouck F., Smet A., 2018. Effect of residual doxycycline concentrations on resistance selection and transfer in porcine commensal Escherichia coli. Int. J. Antimicrob. Agents, 51, 123-127.
- Sandegren L., 2014. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. Ups. J. Med. Sci., 119, 103-107.