QualiREG
La qualité pour le développement en Océan Indien

Unité Analytique CYROI
CYCLOTRON DE LA REUNION

Utilisation de la LC/MS/MS pour l'identification et la quantification des antibiotiques : Méthodes et Résultats 2012

Mr Jean Patrick IDOUMBIN (Ingénieur R&D)
Melle Tatiana MARLEUX (Technicienne)
Dr Jimmy CHANE-MING (Responsable de l'Unité)
Dr Vincent PORPHYRE (CIRAD)

Sommaire

I. Introduction

II. Étude de l'extraction

III. Validation de la Méthode

IV. Résultats

V. Conclusion

Introduction

1. Introduction
2. Extraction
3. Validation
4. Résultats
5. Conclusion

Contexte :

La présence de résidus d'antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance, ou comme remède thérapeutiques peut s'avérer dangereuse dans la chaîne alimentaire humaine lorsqu'il y a une utilisation inappropriée et le non respect des temps d'attente entre l'administration des antibiotiques à l'animal et la collecte de la viande

Législation :

La Directive 96/23/CE provenant de la législation européenne et concernant le contrôle des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires, impose aux États membres la mise en œuvre de plans nationaux pour le suivi des dépistages des produits médicamenteux et de leurs résidus chez les animaux.

Les limites maximales de résidus (LMR) déterminent les concentrations de résidus de substances autorisées dans les denrées alimentaires d'origine animale (Règlement CEE n°2377/90)

Objectif de la Méthode :

Le dosage de 8 familles d'antibiotiques dans le sérum animal par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem en respectant les limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale (règlement CEE N°2377/90).

Référence :
http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1990R2377:20050711:FR:PDF

Familles et molécules ciblées

1. Introduction
2. Extraction
3. Validation
4. Résultats
5. Conclusion

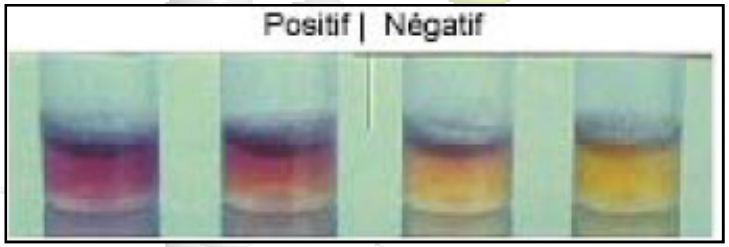
1) **Pénicillines dont l'amoxicilline et l'ampicilline**
2) **Sulfamides dont la sulfanilamide**
3) **Polypeptides dont la colistine**
4) **(Fluro) Quinolones dont l'enrofloxacine**
5) **Tétracyclines dont la tétracycline**
6) **Phénicolés dont le chloramphénicol**
7) **Céphalosporines dont la céphalothine**
8) **Aminoglycosides dont la gentamicine et la streptomycine**

Démarche suivie

1. Introduction
2. Extraction
3. Validation
4. Résultats
5. Conclusion

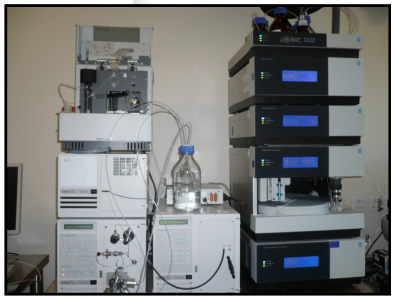
A l'abattage :

Criblage pour la détection de résidus d'antibiotiques dans le jus de viande (Premi ®Test)
Indiquant uniquement la présence ou l'absence d'antibiotiques
Prélèvement d'un échantillon de sérum sur l'animal



Prise en charge au laboratoire :

Pré-traitement du sérum, extraction des molécules de la matrice et injection en LC/MS/MS
Identification et quantification des antibiotiques ciblés.



Chromatographie Liquide

Spectromètre de Masse

Plasma : Une matrice complexe

1. Introduction
2. Extraction
3. Validation
4. Résultats
5. Conclusion

Matrice des échantillons : plasma de porc

Concentration en protéines du plasma humain: 70-80 g/L

Concentration en protéines du plasma de porc : > 80 g/L

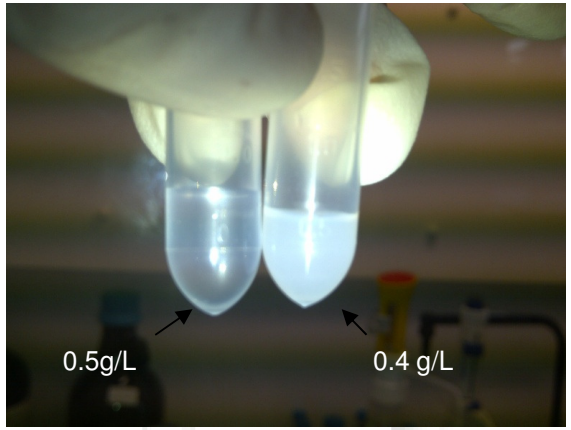
Les protéines constituent un obstacle majeur dans le dosage des antibiotiques en LC/MS/MS

- **Diminution de la durée de vie de la colonne LC : Colmatage**
- **Risque de colmatage au niveau de l'orifice du spectromètre de masse**
- **Effet de matrice important : Diminution des intensités des composés d'intérêts et augmentation du bruit de fond.**

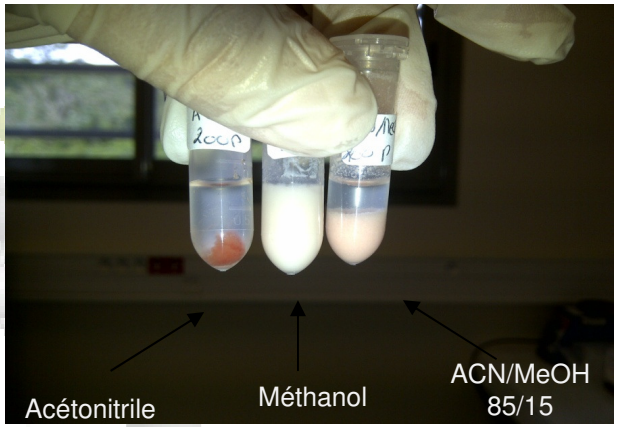
Le prétraitement de l'échantillon est capital pour la pertinence des résultats.

La déprotéination

1. Introduction
2. Extraction
3. Validation
4. Résultats
5. Conclusion



Déprotéination Acide (centrifugation nécessaire)



Déprotéination avec solvant (centrifugation nécessaire)

Déprotéination sur plaque (sans centrifugation)

Dans les 3 cas :
Utilisation de 200µL d'échantillon

L'extraction en Ligne

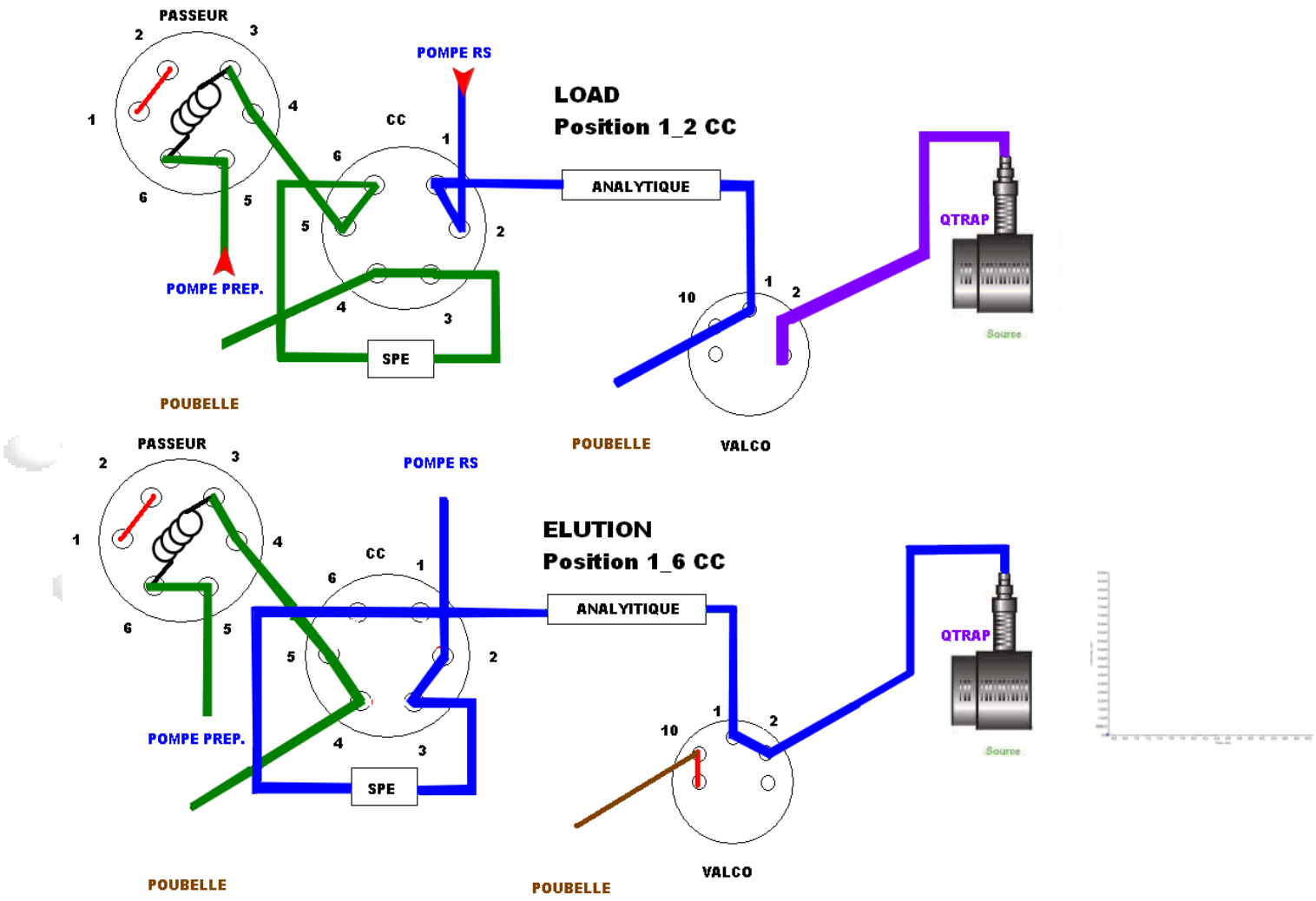
1. Introduction

2. Extraction

3. Validation

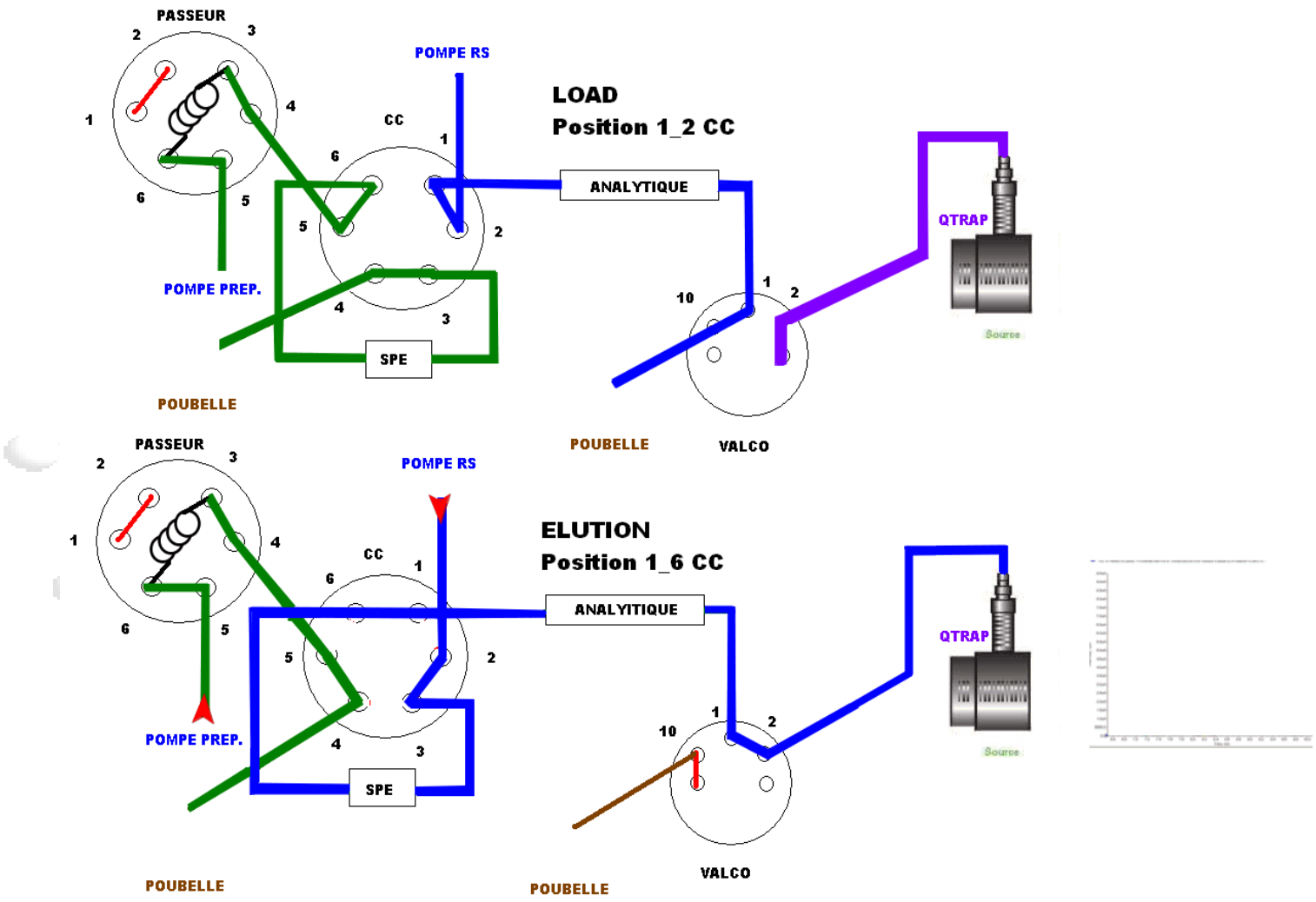
4. Résultats

5. Conclusion



L'extraction en Ligne

1. Introduction
2. Extraction
3. Validation
4. Résultats
5. Conclusion



La détection MS/MS

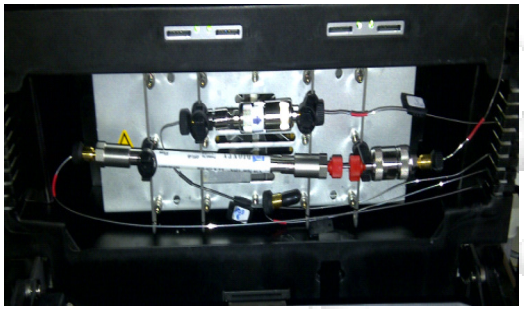
1. Introduction

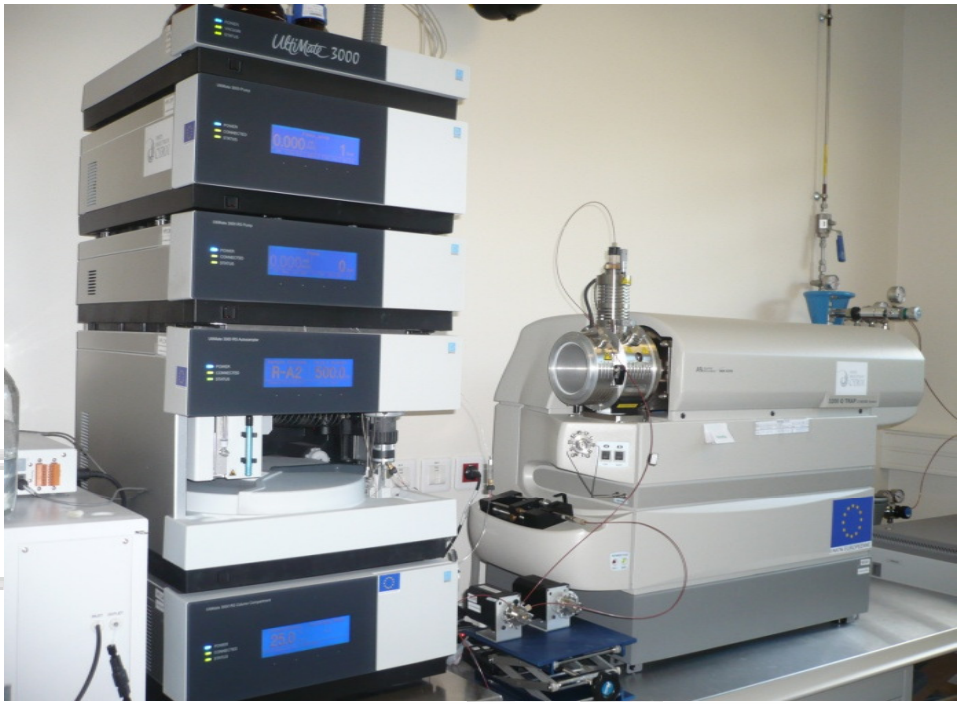
2. Extraction

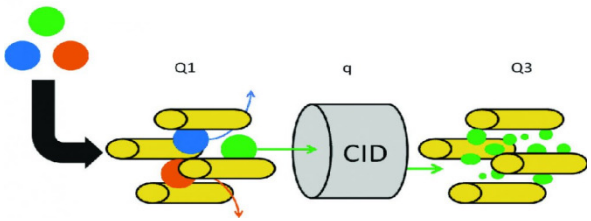
3. Validation

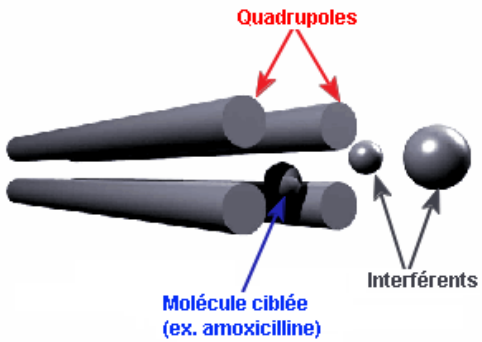
4. Résultats

5. Conclusion









Exemple de Chromatogramme

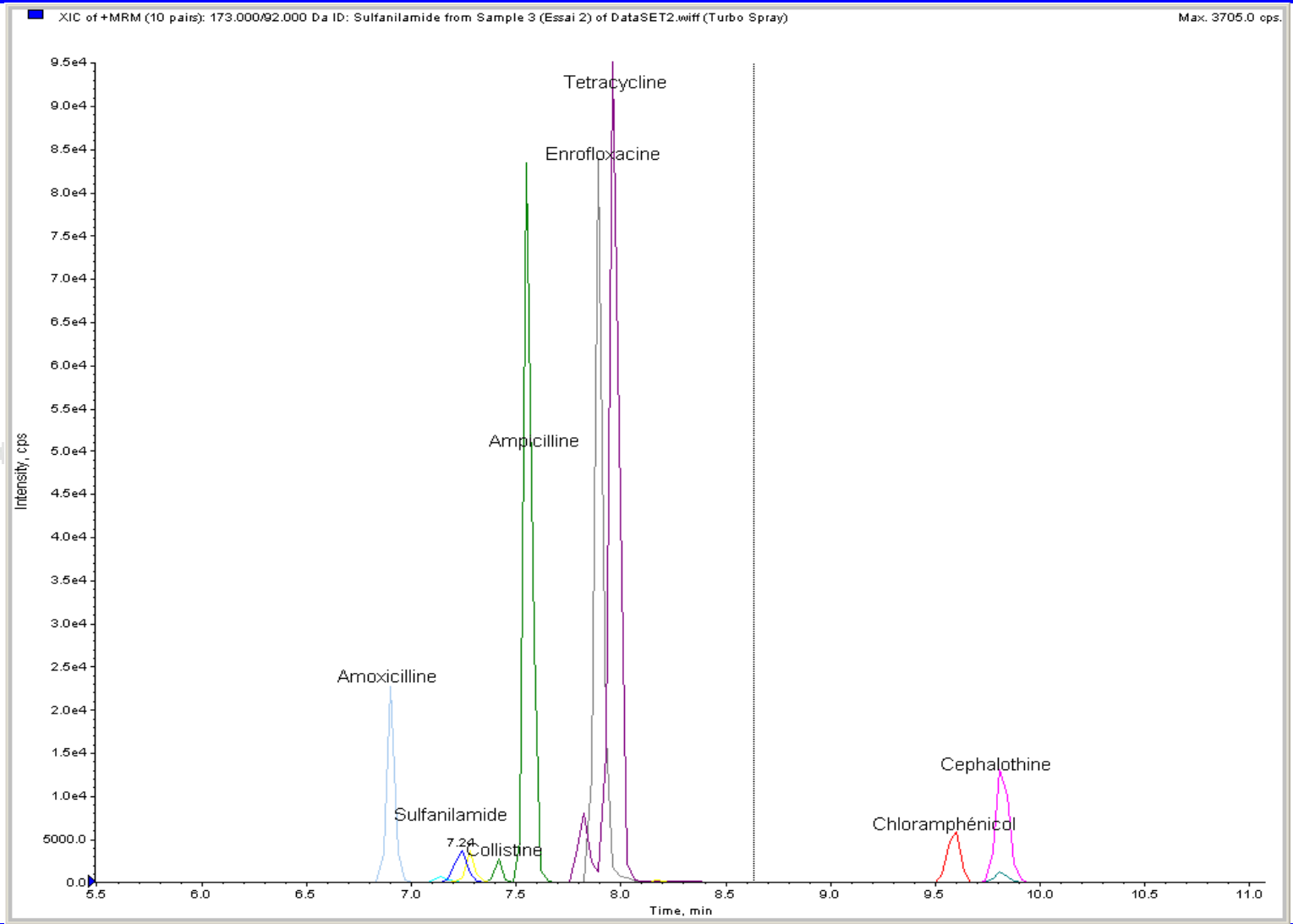
1. Introduction

2. Extraction

3. Validation

4. Résultats

5. Conclusion



Critères de validation

Transitions MRM retenues pour la validation

ANTIBIOTIQUES	Q1	Q3	DP	EP	CEP	CE	CXP
Sulfanilamide	173	92	31	10	18	23	4
Streptomycin	292	407	36	7	22	15	6
Chloramphenicol	323	275	41	8	20	19	4
Ampicillin	350	106	41	6.5	20	27	4
Enrofloxacin	360	316	56	4.5	32	21	4
Amoxicilin	366	114	31	5	12	29	4
Cephalothin-NH4	414	337	26	4.5	20	17	6
Tetracyclin	445	410	41	6	22	25	4
Gentamycin	478	157	111	3.5	22	27	4
Colistin B	578.5	101.2	80	4	20	55	4
Colistin A	585.5	101.2	80	4	25	55	4

Étude de la Spécificité, Sélectivité, Limites de détection et de quantification, Linéarité

Critères de validation

1. Introduction
2. Extraction
3. Validation
4. Résultats
5. Conclusion

Spécificité (Absence d'interférents dans les fenêtres de détections) :

L'étude de la spécificité sur différents sérums négatifs montre qu'aucun interférents issus de la Matrice n'apparaissent dans les fenêtres de détections de nos composés.

Sélectivité (transitions sélectives uniquement aux antibiotiques) :

Différents sérums ont été dopés avec des médicaments et des produits prohibés. L'analyse de Ces échantillons montrent que les transitions sélectionnées sont sélectives uniquement aux Antibiotiques ciblés.

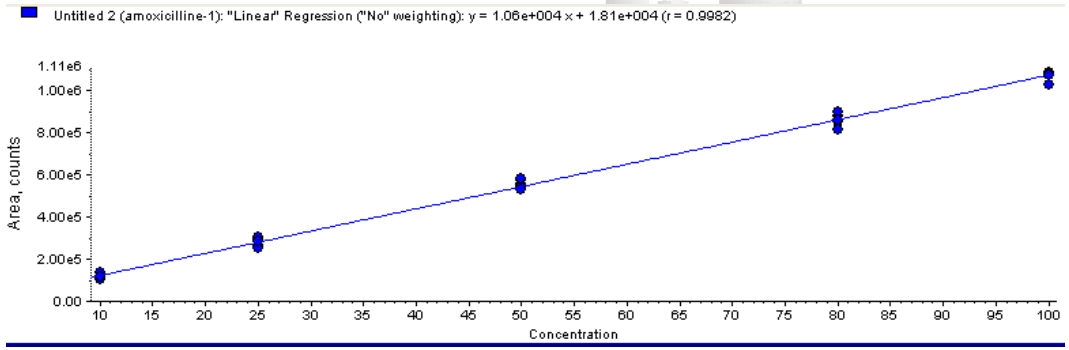
Limite de détection et Quantification (Rapport S/N > 10) :

Différents sérums ont été dopés à des concentrations allant de 1,25µg/L à 10µg/L et de 5 à 40µg/L pour la colistine. L'étude des rapports signal/bruit (S/N) permet de valider une limite de détection égale à **1,25µg/L** pour 7 antibiotiques (S/N allant de 140 à 14600) et **5µg/L** pour la Colistine (S/N = 170).

La limite de quantification a été fixée à **10µg/L** pour tous les composés

Étalonnage :

Etalonnage Interne validée en mode linéaire pour tous les composés



Essais et Résultats

1. Introduction

2. Extraction

3. Validation

4. Résultats

5. Conclusion

280 échantillons prélevés dans différentes abattoirs de Madagascar.

90 échantillons de jus de viande contrôlés positifs au Kit Premi®Test.

135 échantillons analysés en LC/MS/MS dont les 90 positifs au Kit Premi®Test.

échantillons	Positif sur le terrain	LC/MS/MS
X1	Positif	Traces amoxicilline
X2	Positif	Traces amoxicilline
X3	Positif	Traces amoxicilline
X4	Positif	Amoxicilline
X5	Positif	Amoxicilline

Uniquement 5 échantillons / 90 contrôlés positif en LC/MS/MS

Les 85 échantillons restant sont ils des « Faux Positifs » ?

Utilisation d'autres antibiotiques non ciblés dans la méthode ?

Le sérum animal est il une matrice représentative au moment de l'abattage ?

Recherche d'autres antibiotiques

Développement d'une méthode de criblage qualitative de 40 molécules (Présence/Absence)

	Y1	Y2	Y3	Y4
Sulfamethazine	Présence	/	Présence	/
Sulfadoxine	Présence	/	Présence	/
Sulfadimethoxin	/	/	Présence	/
Pénicilline G	/	Présence	/	/
Oxytétracycline	/	/	/	Présence

Retrouver une teneur d'antibiotique élevée dans le plasma est une indication de la récente administration avant l'abattage

Conclusion et Perspective

1. Introduction

2. Extraction

3. Validation

4. Résultats

5. Conclusion

La méthode est développée et validée pour la recherche de 8 antibiotiques dont l'Ampicillin, Amoxicillin, Enrofloxacin, Tetracyclin, Sulfanilamide, Chloramphénicole, Cephalothine, Colistine, dans le sérum.

L'étude de la validation a montré que la méthode est juste (linéarité),spécifique et sélective aux composés ciblés.

Le criblage d'antibiotiques dans le sérum animal n'est pas comparable aux résultats obtenus par l'utilisation du Kit Premi®Test sur les jus de viande au moment de l'abattage.

Le sérum n'est pas un indicateur pour évaluation de l'utilisation d'antibiotique chez l'animal (porc)

Cette méthode sera évaluée sur la matrice « jus de viande » au titre de comparaison avec le Kit Premi®Test.

Une méthode de criblage plus élargie est en cours de validation

QualiREG
La qualité pour le développement en Océan Indien

Unité Analytique CYROI
CYCLOTRON DE LA REUNION

Merci de votre attention !

Mr Jean Patrick IDOUMBIN (Ingénieur R&D)
Melle Tatiana MARLEUX (Technicienne)
Dr Jimmy CHANE-MING (Responsable de l'Unité)
Dr Vincent PORPHYRE (CIRAD)