



## **SOP DHA/ANA304 v01**

### **Détection et confirmation d'Antibiotiques dans les fientes de volaille par LC-MS/MS (D,I)**

Mise en fonction : 24/06/2016

Pages : 14  
Annexes : 3

	Nom, fonction	Date	Signature
Rédaction :	Robert Christelle Responsable méthode		
Vérification :	Jean-Luc Beudart Responsable AQ		
Approbation :	Gillard Nathalie Directeur		

**Toute reproduction interdite**

Vérification : JL Beudart (RQ)  
Mise en fonction : 24.06.2016

## Historique de la méthode

N° Version	Date	Evolution de la méthode
SOP DHA/ANA304 v01	24/06/2016	Nouvelle méthode

## Destinataires : Département Santé / labo LC-MS/MS

### Opérateurs

Pierre-Yves BRASSEUR  
Christelle ROBERT

### Responsable

Christelle ROBERT

## Sommaire

1. Définitions .....	4
2. Champ d'application et références légales .....	4
3. Principe général .....	4
4. Matériel, réactifs et standards .....	5
4.1. Matériel.....	5
4.2. Réactifs et solvants .....	5
4.3. Standards.....	5
5. Echantillons .....	6
5.1. Réception des échantillons et enregistrement.....	6
5.2. Préparation des échantillons .....	6
6. Mode opératoire.....	6
6.1. Fortification des échantillons.....	6
6.1.1. Fientes de volaille .....	6
6.2. Extraction.....	7
6.2.1. Extraction.....	7
6.2.2. Purification .....	7
6.3. Analyse par LC-MS/MS .....	7
6.4. Traitement des données acquises.....	8
6.5. Acceptation de la séquence d'analyse .....	8
6.6. Interprétation des résultats et rapport .....	9
6.6.1. Interprétation des résultats .....	9
7. Sauvegarde des données .....	9
8. Cartes de contrôle .....	9
9. Références.....	9
ANNEXE 1. Préparation des solutions stock et des pools.....	10
A.1.1. Solutions stock.....	10
A.1.2. Validité des solutions stocks.....	10
A.1.3. Préparation des pools .....	10
A.1.3.1. Pool P304-faeces .....	11
A.1.3.2. Pool P304-ISTD.....	12
ANNEXE 2. Composés recherchés, données chromatographiques et MRM .....	13
ANNEXE 3. Composés recherchés.....	14

## **1. Définitions**

- ✦ UPLC-MS/MS : Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
  - ✦ QC : Quality Control, Echantillon contenant toutes les molécules cibles recherchées
- Les codes abrégés des substances à rechercher sont définis dans la procédure QA/REA02

## **2. Champ d'application et références légales**

Afin de diminuer le risque de développement de la résistance aux antimicrobiens, l'arrêté royal belge (C-2007/22784) concernant l'élimination de Salmonella interdit le traitement des volailles avec des antimicrobiens contre Salmonella spp.

Afin de vérifier un éventuel usage abusif d'antimicrobiens, une méthode plus respectueuse des animaux a été développée. La plupart des antimicrobiens utilisés sont éliminés dans les excréta de volaille comme composé parent.

## **3. Principe général**

La méthode de confirmation qualitative (D,I) décrite dans cette SOP s'applique à la détection des antimicrobiens dans les fientes de volaille. La liste des composés est reprise en annexe.

La méthode comprend une étape d'extraction avec de l'HCl suivi d'une purification sur SPE avant analyse par LC-MS/MS.

## **4. Matériel, réactifs et standards**

### **4.1. MATERIEL**

- a. Verreries diverses et godets en plastique Nalgene (VWR) et Falcon ou équiv.
- b. Centrifugeuses, équipements M442, M502
- c. Balances, équipements M446, M387
- d. Agitateur magnétique
- e. Fioles "Packard"
- f. Rampe d'évaporation sous azote + azote N28 (Air Liquide), équipem. **M157, M316, M314, M315**
- g. Vortex, équipements **M10 à M13**
- h. Bain à ultrasons, équipements **M576**
- i. Agitateurs horizontaux M8, M246
- j. Micropipettes Gilson P10000, P1000, P200, P20, ou équivalent
- k. Pipettes Pasteur + poire
- l. Vials d'injection en verre de 1.5 ml
- m. Pince à sertir les vials
- n. Bain d'eau thermostaté avec dispenseur d'azote, équipem. **M515, M3, M194, M120, M594, M326**
- o. Chaîne ULPL Acquity TQ MS Xevo (**M655 à M658**)
- p. Colonne Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1 x150 mm (ou équivalent)
- q. Agitelec, équipements M261, M184, M505
- r. Colonnes Oasis HLB 6cc (200mg) (Waters)
- s. Papier filtre (Whatman 595 ½, diam 125), ref. 10311644

### **4.2. REACTIFS ET SOLVANTS**

Note : tous les solvants et réactifs sont de qualité « pour analyse » (PA), excepté les solvants HPLC qui sont de qualité HPLC

- a. Eau (ULC, Biosolve)
- b. Acétonitrile (ULC, Biosolve)
- c. Acide formique (ULC, Biosolve)
- d. Eau (LC-MS, Biosolve)
- e. Méthanol (LC-MS, Biosolve)
- f. Acétonitrile (LC-MS, Biosolve)
- g. Acétone (Pestnorm, VWR)
- h. Solutions stocks de standards, dans le méthanol, eau, DMSO, acétone (voir SOP QA/REA02 et annexe 1)
- i. HCL 0.1 M : (Acros Organics, ou équivalent, Densité de HCl à 37% =1,19 ; masse molaire de HCl= 36,5g/mol ; ajouter 8.2 ml à 991.8 ml d'eau distillée)

### **4.3. STANDARDS**

- a. Pool de standards dont la description en fonction des matrices et des composés à rechercher est donnée en Annexe 1. (P304-faeces)
- b. Solution de standards internes (P304-ISTD)

## **5. Echantillons**

### **5.1. RECEPTION DES ECHANTILLONS ET ENREGISTREMENT**

La réception des échantillons, leur enregistrement et encodage sont réalisés selon la procédure SOP QA/GEN07A. Les feuilles de route sont imprimées sur base de cette même procédure.

L'analyse débute dès la réception des échantillons. Dans le cas contraire, les échantillons doivent être entreposés au congélateur et remis à température ambiante avant le début de l'analyse. Les dates de début et de fin d'analyse sont enregistrées sur la feuille de route.

Les échantillons de substances destinées à l'alimentation humaine (excepté les produits animaux) seront conservés conformément à une note de service de l'AFSCA (Procédure QA/GEN07A)

### **5.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS**

Il est essentiel que l'entièreté des échantillons reçus au laboratoire soit broyé et mélangé avant prélèvement de sous-échantillons d'analyse. Afin d'augmenter l'homogénéité des échantillons solides, ceux-ci sont broyés très finement à l'aide des moulin Waring.

## **6. Mode opératoire**

### **6.1. FORTIFICATION DES ECHANTILLONS**

#### **6.1.1. Fientes de volaille**

##### **6.1.1.1. Echantillons de contrôle**

Lors de chaque série d'analyse, des échantillons de contrôle supplémentaires doivent également être préparés et extraits comme les autres échantillons:

- **Un Blanc** (5 gr) est préparé à l'aide d'un échantillon de matrice blanche (fientes) supplémenté avant extraction avec 50 µl de pool de standard interne (P304-ISTD).
- **Un QC** (5 gr) est préparé à l'aide d'un échantillon de matrice blanche (fientes) supplémenté avant extraction avec 50µl de pool P304-faeces et 50 µl de pool de standard interne P304-ISTD. Pour la composition exacte des pools, se référer aux annexes.

Laisser reposer 15 min et extraire suivant le mode opératoire décrit en 6.2.1.

##### **6.1.1.2. Echantillons de routine**

Les échantillons (5 gr) sont fortifiés avec 50 µl du pool de standards internes (P304-ISTD).

Laisser reposer 15 min et extraire suivant le mode opératoire décrit en 6.2.1.

## 6.2. EXTRACTION

### 6.2.1. Extraction

1. Peser  $5 \pm 0,1$  g de fientes dans un tube falcon de 50 ml
2. Ajouter environ 10 ml HCl 0.1 M
3. Agiter énergiquement pendant 15 minutes sur un agitateur va-et-vient
4. Centrifuger pendant 10 minutes à environ 4650 x g, à environ 4°C
5. Filtré le surnageant sur filtre plissé

### 6.2.2. Purification

6. Conditionner la colonne Oasis HLB-6cc-200 ml (3 ml MeOH, 3 ml d'eau distillée)
7. Déposer l'extrait
8. Laver la colonne avec 2 ml d'eau
9. Eluer avec environ 1.5 ml de MeOH 10% Acide acétique dans un tube de 15 ml
10. Eluer avec environ 1.5 ml de MeOH 70% +0.2% d'acide formique
11. Eluer avec environ 1.5 ml de MeOH
12. Evaporer l'extrait sous N<sub>2</sub> à 45°C
13. Reprendre avec 2 ml d'ACN/eau 10/90
14. Centrifuger environ 1.5 ml pendant 5 min à environ 11750 x g, à environ 20°C
15. Placer dans un vial

## 6.3. ANALYSE PAR LC-MS/MS

### 6.3.1. Conditions HPLC-Acquity

Le programme LC utilisé présente les caractéristiques suivantes :

- Débit d'élution : 0,5 ml/min.
- Volume 50 µl de l'extrait purifié
- Colonne Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1 x150 mm (ou équivalent)
- Température du four à environ 50 °C ( $\pm 1$ °C)
- Température de la chambre à échantillons : environ 15 °C ( $\pm 1$  °C)
- Le gradient LC appliqué est le suivant :

Time (min)	ACN + 0.05% FA(%)	Eau + 0,05 % FA (%)
0	5	95
0,5	5	95
9	0	100
10	0	100
10.1	5	95
11	5	95

### 6.3.2. Conditions MS-MS Xevo

L'acquisition des données se fait en mode MS/MS en « multiple reaction monitoring » (MRM). Les programmes MRM de screening des médicaments vétérinaires comprennent les données reprises dans le tableau en annexe (Annexe 2). La détection des composés par spectrométrie de masse est basée sur une ionisation par électrospray en mode positif et négatif. Le programme présente les caractéristiques suivantes :

- Source ESI en mode positif et négatif avec une température de désolvatation d'environ 500 °C
- Le voltage du capillaire est d'environ de 2,5 kV
- La pression dans la cellule de collision est située d'environ  $2.10^{-3}$  mbar.
- La température de source est d'environ 150 °C.
- Flux post-colonne  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% à 50 $\mu\text{l}/\text{min}$  de 4 à 6 min

### 6.3.3. Contenu d'une séquence d'analyse.

La succession des échantillons injectés au cours d'une séquence d'analyse s'établit comme suit :

- QC au cc $\beta$
- 1 Lavage
- Les échantillons
- QC au cc $\beta$  (réinjection du premier QC pour vérifier stabilité du détecteur)

## 6.4. TRAITEMENT DES DONNEES ACQUISES

Le programme Targetlynx est utilisé pour le traitement des données acquises et l'intégration des pics chromatographiques de chaque composé et du standard interne. Une fois les données traitées, il est possible de visualiser pour chaque composé le chromatogramme de sa transition de screening et de déterminer la réponse relative par rapport au standard interne (surface du pic).

## 6.5. ACCEPTATION DE LA SEQUENCE D'ANALYSE

Les critères suivants doivent être rencontrés pour permettre l'acceptation de la séquence d'analyse :

- Les standards internes avec un S/N supérieur à 10 doivent être présents dans chaque échantillon d'analyse ainsi que dans tous les échantillons de contrôle (QC) et dans tous les blancs de contrôle associés à la série ;
- L'absence d'un standard interne dans un échantillon conduira obligatoirement à sa réanalyse.
- Dans tous les échantillons de contrôle associés à la série d'analyse, chaque composé devra présenter un rapport signal/bruit supérieur à 3 pour la transition de screening.
- Le temps de rétention relatif de chaque composé ne pourra différer de plus de 2,5 % par rapport à celui mesuré dans le QC au cc $\beta$ .
- Dans le(s) blanc(s) de contrôle associé(s) à la série d'analyse il ne pourra être détecté au temps de rétention de chaque composé un pic chromatographique dont la réponse est supérieure à 1/2 de la réponse du QC au cc $\beta$ .

Lorsque le technicien devra vérifier si le rapport signal sur bruit est égal ou supérieur à 10, il le fera visuellement. En cas d'hésitation, il le vérifiera manuellement.



## 6.6. INTERPRETATION DES RESULTATS ET RAPPORT

### 6.6.1. Interprétation des résultats

- Un échantillon sera déclaré **Positif** pour un composé si la réponse obtenue (réponse relative entre surface du composé et surface du standard interne) est supérieure au  $cc\alpha$  avec un temps de rétention relatif conforme.
- Le temps de rétention relatif du composé dans l'échantillon ne pourra différer de plus de 2,5 % par rapport à celui mesuré dans le QC.
- Le rapport des intensités (aires) des deux transitions est en accord avec le rapport correspondant du QC, suivant le tableau ci-dessous :

Tableau 1. Tolérance admise pour les rapports ioniques (cf. Décision 2002/657/CE)

Rapport des 2 transitions	Tolérance relative permise
> 50 %	$\pm 20$ %
> 20 % - 50 %	$\pm 25$ %
> 10 % - 20 %	$\pm 30$ %
$\leq 10$ %	$\pm 50$ %

## 7. Sauvegarde des données

Tous les spectres MS sont enregistrés sur le support informatique en réseau. Les feuilles de route et les chromatogrammes d'échantillons confirmés non-conformes sont conservés dans les classeurs correspondants.

## 8. Cartes de contrôle

La méthode décrite dans cette procédure étant une méthode de Confirmation qualitative, aucun enregistrement dans des cartes de contrôle n'est réalisé.

## 9. Références

- Décision 2002/657/CE de la Commission européenne portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil concernant les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.
- Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 27 avril 2007 relatif à la lutte contre les salmonelles chez les volailles

## **ANNEXE 1. Préparation des solutions stock et des pools**

### **A.1.1. Solutions stock**

Les standards sont achetés sous forme de poudre ou de solution. Les solutions stocks sont préparées en solubilisant une quantité connue du standard pure dans un solvant approprié (Méthanol, eau, acétone, DMSO). Les solutions ainsi obtenues sont conservées au congélateur. La concentration exacte est déterminée d'après la valeur de la pesée et en corrigeant cette dernière par la pureté.

### **A.1.2. Validité des solutions stocks**

Chaque solution doit présenter une date limite de conservation après laquelle elle devrait normalement être éliminée. En pratique, une validité d'un an est attribuée à une solution à partir du moment de sa préparation. Pour les solutions certifiées, la date limite de conservation est celle déterminée par le fournisseur.

### **A.1.3. Préparation des pools**

Les tableaux ci dessous indiquent la teneur (en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de chaque composé dans un échantillon constitué de 5 g de matrice auquel ont été ajoutés un volume déterminé du pool correspondant à cette matrice.

### A.1.3.1. Pool P304-faeces

<b>Nom:</b>	<b>P304-faeces</b>
<b>Composition et concentration:</b>	Voir SOP DHA/ANA304

<u>Date de préparation :</u> .....	<u>Date d'expiration :</u> .....	<u>Signature opérateur :</u> .....
------------------------------------	----------------------------------	------------------------------------

<u>Date de contrôle :</u> .....	<u>Signature opérateur :</u> .....
---------------------------------	------------------------------------

<b><u>Volume final du Pool (ml):</u></b>	10.0
<b><u>Volume dopage du QC (µl):</u></b>	50.0
<b><u>Prise d'essai (g):</u></b>	5.0
<b><u>Solution de dilution :</u></b>	Méthanol

**Si pool concentré (à diluer avant dopage) ou pool intermédiaire**  
Facteur de dilution du pool:

Code	Nom du standard	N° Lot	Concentration de la solution stock (µg/ml)	Concentration dans la matrice (ppb)	Volume de solution stock à pipeter (µl)
F017	Amoxicilline		1000	50	50.0
F29	Chlortetracycline		1000	50	50.0
F93	Difloxacin		100	50	500.0
F23	Doxycycline		1000	50	50.0
F88	Enrofloxacin		100	50	500.0
F71	Flumequine		100	50	500.0
F34	Lincomycine		1000	50	50.0
F035	Phenoxyméthylpenicilline		1000	50	50.0
F64	Sulfachloropyridazine		1000	50	50.0
F169	Sulfaclozine		1000	50	50.0
F61	Sulfadiazine		1000	50	50.0
F76	Sulfaméthoxazole		1000	50	50.0
F126	Tilmicosin		1000	50	50.0
F13	Triméthoprime		1000	50	50.0
F33	Tylosine		1000	50	50.0
F153	Tylvalosine		1000	50	50.0

### A.1.3.2. Pool P304-ISTD

<u>Nom:</u> <b>P304-ISTD</b>	-
<u>Composition et concentration:</u>	Voir SOP DHA/ANA304

<u>Date de préparation :</u> .....	<u>Date d'expiration</u> .....	<u>Signature</u> .....
:	:	<u>opérateur :</u>

<u>Date de contrôle</u> .....	<u>Signature</u> .....
:	<u>opérateur :</u>

<b><u>Volume final du Pool (ml):</u></b>	10.0
<b><u>Volume dopage du QC (µl):</u></b>	50.0
<b><u>Prise d'essai (g):</u></b>	5.0
<b><u>Solution de dilution :</u></b>	méthanol

<b><u>Si pool concentré (à diluer avant dopage) ou pool intermédiaire</u></b>
<u>Facteur de dilution du pool:</u>

Code	Nom du standard	N° Lot	Concentration de la solution stock (µg/ml)	Concentration dans la matrice (ppb)	Volume de solution stock à pipeter (µl)
F117	Lomefloxacin		1000	250	250

## ANNEXE 2. Composés recherchés, données chromatographiques et MRM

Composé	ESI mode	Voltage Cone (v)	Ion Parent (m/z)	Ions Filles (m/z)	Energie Collision (eV)	RT (min)
Difloxacin	ES+	38	400	298.9	30	3.5
				356	20	
Enrofloxacin	ES+	30	360.0	244.9	26	3.2
				316.0	20	
Flumequin	ES+	24	262	215.9	25	5.2
				243.9	18	
Triméthoprim	ES+	38	290.98	110	32	3.0
				229.8	22	
Lincomycine	ES+	32	407	82.7	58	2.7
				126	26	
Pénicilline V	ES+	15	351	114	30	5.1
				160	12	
Tilmicosine	ES+	66	869.9	174	42	4.2
				87.9	66	
Tylosine	ES+	48	916.5	174	36	4.9
				773	30	
Tylvalosine	ES+	70	1042.6	174	40	6.0
				229	38	
Amoxicilline	ES+	0	366	114	16	2.1
				349	8	
Sulfadiazine	ES+	20	251	108	14	2.7
				156	15	
Chlortétracycline	ES+	26	478.9	97.9	38	3.8
				443.9	22	
Doxycycline	ES+	24	444.9	153.8	28	3.9
				427.9	20	
Sulfachlorpyridazine	ES+	30	285	92.3	28	3.8
				155.9	15	
Sulfaclozine	ES+	30	285	92.3	15	4.4
				155.9	28	
Sulfaméthoxazole	ES+	25	254	156	20	3.9
				108	25	
Lomefloxacin (ISTD)	ES+	35	838	679.5	25	3.2

### ANNEXE 3. Composés recherchés

Compounds	Family	ccβ μg/kg	cca μg/kg
Amoxicilline	Beta Lactam	50	39.57
Chlortetracycline	Tetracycline	50	37.62
Difloxacin	Quinolone	50	41.86
Doxycycline	Tetracycline	50	37.62
Enrofloxacin	Quinolone	50	44.15
Flumequine	Quinolone	50	37.62
Lincomycine	Lincosamide	50	41.32
Penicilline V	Beta Lactam	50	37.62
Sulfachlorpyridazine	Sulfonamide	50	40.59
Sulfaclozine	Sulfonamide	50	43.98
Sulfadiazine	Sulfonamide	50	39.93
Sulfamethoxazole	Sulfonamide	50	43.03
Tilmicosin	Macrolide	50	39.78
Trimethoprine	Diamino-pyrimidine derivative	50	42.71
Tylvalosine	Macrolide	50	37.94
Tylosine	Macrolide	50	37.62