



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

Résumé

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-triméthoprim, tiamuline et colistine ont été testées avec deux biocides (peroxyde d'hydrogène-H₂O₂ 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 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 en eau dure sauf les sulfamides. 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.

1. Contexte et objectifs

En élevage, l'eau d'abreuvement est fréquemment traitée par un biocide désinfectant pour améliorer sa qualité bactériologique. Elle est également utilisée comme vecteur de médicaments pour le traitement collectif des animaux. Or, la vérification de la compatibilité entre les biocides et les médicaments n'est actuellement pas exigée dans les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Cette étude vise 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 démontré deux résultats majeurs : 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.

2. Matériel et méthode

L'étude a été réalisée en deux phases : la première avec une eau standard de laboratoire selon la ligne directrice européenne (2); la seconde avec une eau de puits prélevée en élevage.

Phase 1 dans une eau standard de laboratoire

Sept substances actives ont été choisies en fonction des volumes de ventes en 2015 (3), de leur utilisation dans l'eau de boisson dans au moins deux des trois filières considérées et de leur intérêt en médecine vétérinaire : la doxycycline, l'amoxicilline, la sulfadiazine et la sulfadiméthoxine associées au triméthoprim, la tiamuline et la colistine. Pour chaque substance active, deux spécialités vétérinaires (SV1 et SV2) ont été testées, à l'exception de la sulfadiazine et de la sulfadiméthoxine où 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 en fonction des pratiques usuelles en élevages : le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 50 ppm, stabilisé à l'acide orthophosphorique et l'hypochlorite de sodium (NaClO) à 0,5 ppm de chlore actif. Les antibiotiques et les biocides ont été dilués dans deux types d'eau standard : une eau acide et douce (pH = 6, dureté = 6 °F) et une eau basique et dure (pH = 8, dureté = 35 °F).

Le premier essai a comparé la concentration d'antibiotiques dans une solution mère concentrée, 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.

Le second essai a comparé la concentration d'antibiotiques dans une solution diluée au vingtième, avec et sans biocide, pour simuler une administration par pompe doseuse réglée à 5 %. Le dosage des antibiotiques a été effectué au moment de la dilution de la solution mère (T0') et six heures après (T6'), pour représenter le temps de circulation de l'eau dans les canalisations entre la pompe doseuse et les abreuvoirs. Une dilution et un dosage ont également eu lieu 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 supposée maximale de la substance active.

Les analyses ont été faites par Chromatographie Liquide couplée à un détecteur UV. 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 [C_{moy}] en substance(s) active(s) présentes dans les échantillons avec le biocide par rapport à la concentration moyenne dans les échantillons témoins sans biocide :

Stabilité en %

$$= 100 \times \frac{\text{C}_{\text{moy de l'antibiotique avec biocide}}}{\text{C}_{\text{moy de l'antibiotique sans biocide}}}$$

Une substance active ayant perdu plus de 10 % de sa concentration par rapport à l'échantillon témoin et avec une différence significative (T-test, p<0,05) a été considérée dégradée. Ce seuil de 10 % de perte correspond au maximum acceptable dans les dossiers d'AMM.

Phase 2 dans une eau de puits prélevée en élevage

L'objectif de cette phase était de se rapprocher de conditions du terrain. 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. Cette eau était également acide (pH = 6) et douce (dureté = 9°F). Trois antibiotiques ont été testés en présence de peroxyde d'hydrogène (50 ppm): l'amoxicilline (SV2), la tiamuline (SV1) et la doxycycline (SV2). La méthodologie décrite pour la phase 1 a été reprise à l'identique pour la phase 2.

3. Résultats et discussion

Phase 1 dans une eau standard de laboratoire

L'amoxicilline a été le seul antibiotique sensible à l'action du peroxyde d'hydrogène (Tableau 1), ce qui confirme le résultat de Hémonic et al (2017). Cette sensibilité a présenté un effet « spécialité-dépendant » : SV1 a mieux résisté que SV2 à cette action oxydante, sans doute en raison d'une différence d'excipients.

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) et d'acide hypochloreux (très actif et prépondérant pour des pH compris entre 4 et 7,5). Pour obtenir 0,5 ppm de chlore actif dans les échantillons d'eau basique, l'hypochlorite de sodium a donc dû être incorporé à un niveau trois fois plus élevé que dans l'eau acide. Or, l'ajout des antibiotiques dans l'eau basique a provoqué une diminution du pH et donc une hausse du taux de chlore actif à des niveaux très supérieurs à 0,5 ppm, entraînant 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 recommandée pour désinfecter des eaux basiques et dures, justement 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 pour éviter d'impacter la stabilité des antibiotiques. Ce seuil de 0,5 ppm peut notamment être dépassé lors 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 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. (2017) : aucune dégradation de colistine n'y 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 à T1'. Or, ici, SV1 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. (2017). Une autre explication possible est une différence entre les spécialités étudiées : l'effet « spécialité-dépendant » est bien démontré ici avec SV2 qui a été un peu plus sensible au chlore que SV1. 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 sulfamides-triméthoprime 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.

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. 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.

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 d'eau utilisée pour l'analyse de stabilité de la doxycycline, 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. 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 au plus proche des critères définis pour l'eau destinée à la consommation humaine.

4. 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 définir des mesures assurant l'utilisation efficace et sûre des médicaments administrés par voie orale en présence de biocides. Il s'agira de recommandations générales car seules deux spécialités par substance active ont été testées dans cette étude si bien que les résultats obtenus ne peuvent 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'AMM, à la fois pour les antibiotiques, mais aussi pour les autres produits administrés par eau de boisson (anti-inflammatoires, vermifuges...).

Tableau 1 : 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 - Triméthoprim		sulfadiméthoxine - Triméthoprim		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 grises 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.

Références bibliographiques

- Hémonic A., Pupin P., Jacon C., Léorat J., Maris P., Corrége I., 2017. Journées Rech. Porcine, 49, 223-224.
- EMEA Guideline EMEA/CVMP/540/03 Rev 1, 2005.
- Anses-ANMV, 2016. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015. 97 pages.

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

In 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, the verification of compatibility between biocides and medicines is not required in the Marketing Authorization dossiers. This study aims to evaluate the impact of biocides on the stability of antibiotics. Ten veterinary medicinal products (MP) containing doxycycline, amoxicillin, sulfonamides-trimethoprim, tiamulin and colistin were tested with two biocides (hydrogen peroxide-H₂O₂ at 50 ppm and sodium hypochlorite at 0.5 ppm of active chlorine) in two standardized water: a soft one (6 ° F, pH = 6) and a hard one (35 ° F, pH = 8). Then, amoxicillin, tiamulin and doxycycline were diluted with H₂O₂ in water from a well 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 an administration by a dosing pump or a tank. For each analysis, the stability of a substance was considered insufficient if its average 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 the hard water, only one amoxicillin MP in the soft water and one doxycycline MP in the well water. Chlorine degraded colistin in soft water and all MPs in hard water except sulfonamides. This study confirms the impact of disinfectants on the stability of some antibiotics in the water and demonstrates the multifactorial and complex nature of this stability.