

# Animaux

## Analyse des aliments pour animaux par microscopie

Alexandra Roetschi, Geneviève Frick et Heinrich Hauswirth, Station fédérale de recherches en production animale (RAP), CH-1725 Posieux  
E-mail: heinrich.hauswirth@rap.admin.ch, tél. (+41) 26/40 77 238.

### Résumé

**L**es aliments pour animaux de rente produits ou vendus en Suisse sont régulièrement contrôlés pour en assurer la qualité. L'étude des farines animales fait partie des critères importants, particulièrement depuis l'apparition de la maladie de la vache folle (ESB). La méthode utilisée pour la détection de composants d'origine animale se base sur un fractionnement de l'échantillon (sédimentation et tamisage), suivi d'une coloration et de son observation au microscope. Les particules d'origine animale sont reconnaissables à leur couleur, leur forme et leur structure caractéristiques. Cette méthode permet la détection de traces (< 0,1%) de matériel animal ainsi que la distinction entre poissons et animaux terrestres, si des fragments d'os sont présents. Des fragments typiques d'os ou de fibres musculaires ainsi que d'autres particules de poissons et d'animaux terrestres sont alors documentés photographiquement. La mise en valeur des résultats des contrôles effectués entre 1991 et 2002 montre, dès l'année 2001, une nette diminution des cas contrôlés positifs en ce qui concerne la présence de fragments d'os d'animaux terrestres et une augmentation du nombre d'échantillons analysés.

La microscopie est actuellement la méthode la plus rapide, la plus précise et la moins coûteuse pour détecter la présence de composants d'origine animale dans les aliments pour animaux.

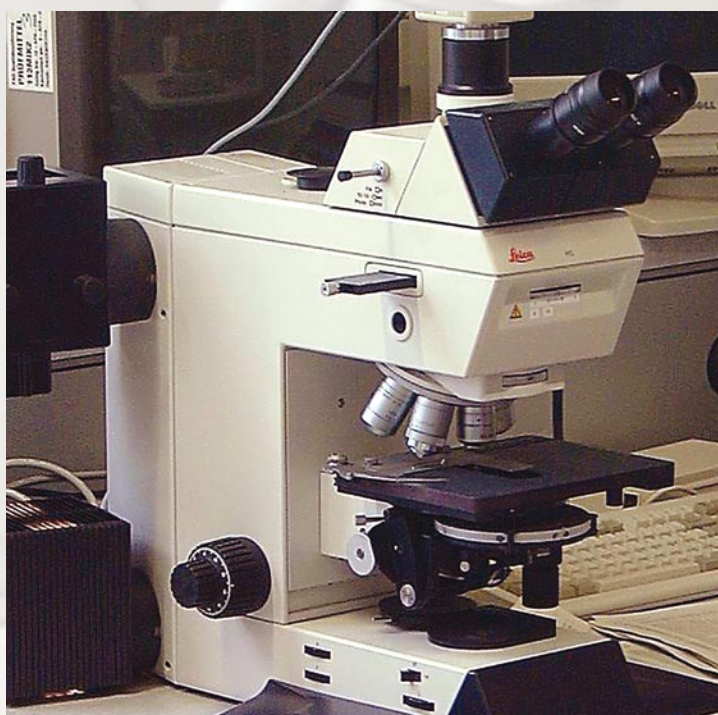
C'est à la Station fédérale de recherches en production animale de Posieux (RAP) que les aliments pour animaux de rente sont contrôlés. Ces derniers sont soumis à des analyses chimiques (nutriments, oligoéléments, par ex.) et microbiologiques, ainsi qu'à des analyses par microscopie. Comme déjà décrit par Hauswirth (1988), un aliment pour animaux ne peut pas être analysé de manière exhaustive sans passer par la microscopie, seule capable de nous indiquer de quel produit il s'agit.

La microscopie est actuellement utilisée dans deux domaines, d'une part pour la détection de particules d'origine animale et d'autre part pour le contrôle de la composition des aliments. Avec cette méthode, les analyses nécessitent peu de temps et la limite de détection est basse.

### Mise en évidence de composants d'origine animale

La maladie de la vache folle, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), doit sa progression dans différents pays fort probablement à la mise en circulation d'aliments contenant des farines animales contaminées et affouragées à des ruminants (Dahms *et al.*, 2001). En Suisse, l'utilisation de farines animales a été interdite pour les ruminants depuis décembre 1990. Comme certains bovins nés bien après cette interdiction ont présenté des signes cliniques de la maladie, les mesures de sécurité ont peu à peu été renforcées. Depuis

Un microscope de bonne qualité apporte une meilleure lumière.



### Lexique:

**ELISA** (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*): des protéines spécifiques sont marquées grâce à des anticorps, eux-mêmes conjugués à un réactif coloré.

**PCR** (*Polymerase Chain Reaction*): les acides nucléiques de gènes connus sont amplifiés s'ils sont présents et mis en évidence dans un échantillon.

**ADN** (acide désoxyribonucléique): importante composante des chromosomes dans lesquels sont contenues les informations génétiques.

**Unité ESB de la Confédération**: groupe de travail avec mandat limité dans le temps et dont le but est l'éradication de l'ESB chez les bovins, de manière à assurer la sécurité des êtres humains. Cette unité s'efforce de faire appliquer, à chaque échelon, les mesures prises pour la lutte contre l'ESB. Elle est composée de collaborateurs des Offices fédéraux de la santé publique, de l'agriculture et vétérinaire. Pour plus d'informations: [www.unite-esb.ch](http://www.unite-esb.ch).

**Polarisation** (observation en lumière polarisée): procédé d'illumination qui permet la distinction, par microscopie, de structures qui possèdent un certain indice de réfraction.

**Otolithe**: concrétion minérale contenue à l'état normal dans l'organe de l'équilibration (oreille interne) des poissons.

**Cristaux de guanine**: sécrétion, chez les poissons, se trouvant à la surface de la peau et qui n'est pas détruite par un traitement thermique.

janvier 2001, tous les aliments pour animaux de rente doivent être exempts de la plupart des composants d'origine animale. La farine de poisson constitue une exception, autorisée dans la fabrication d'aliments pour porcs, volailles et poissons.

Depuis février 1993, les farines animales doivent être soumises à un traitement thermique (133 °C, 20 minutes, 3 bars) de manière à ce que l'agent causal de la maladie de la vache folle soit atténué. Par ce traitement, la détection de matériel animal par certaines méthodes d'analyses (ELISA, PCR) est compromise, car les protéines et l'ADN sont en grande partie dégradés par le procédé (Hofmann, 2000; Lahiff *et al.*, 2001). Par contre, les fragments d'os, qui constituent une des caractéristiques typiques repérables à la microscopie, ne sont pas touchés par le traitement.

Depuis novembre 2000, tant les contaminations par du matériel d'origine animale, qu'elles soient croisées ou non, que les traces ne sont plus tolérées dans les produits destinés à l'alimentation des ruminants.

Pour lutter de manière plus efficace contre l'ESB, le nombre d'échantillons analysés par microscopie a été intensifié en 2001 et une Unité ESB, dépendante de la Confédération, a été créée.

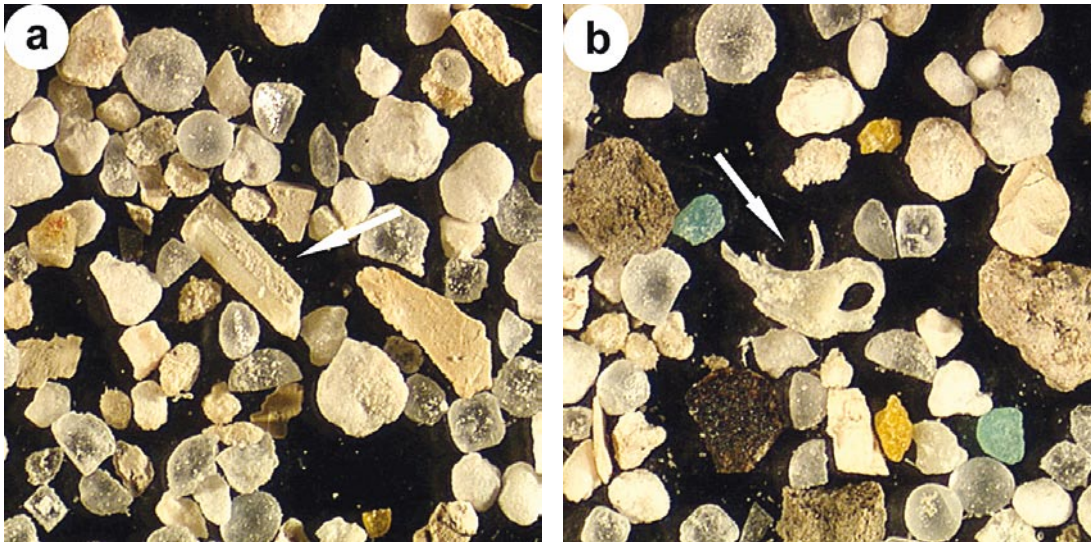
### Description de la méthode

L'échantillon (de 10 à 40 g selon la quantité de sédiment attendue) est séparé à l'aide de tétrachloréthylène (solvant organique de densité 1,62; Michard et Ziebal, 1999) en un sédiment et un flotat. Le sédiment, composé principalement de minéraux, peut contenir des fragments d'os, des arêtes ainsi que des écailles et des dents. Le flotat,

que l'on appelle aussi fraction organique, est composé de particules végétales, il peut aussi contenir des produits d'animaux terrestres tels que fibres musculaires, cartilages, soies ou encore de la corne. Après décantation, les deux fractions sont séchées séparément sur des plaques de verre dans une chapelle. Le sédiment est pesé, puis ce dernier et le flotat sont tamisés de manière à obtenir trois fractions (>1 mm; ≥ 0,35 mm; < 0,35 mm). L'ensemble de l'échantillon est d'abord observé au stéréomicroscope (agrandissement 10 à 50 fois). Les fractions moyennes et fines sont ensuite observées au microscope, soit en général une préparation pour la fraction moyenne et deux pour la fraction fine. Comme milieu d'inclusion pour le sédiment, une solution de phénolglycérine (9 parts de phénol pour 1 part de glycérine) est utilisée; ce type de solution permet un éclaircissement de la préparation et une mise en évidence des caractéristiques des fragments d'os. Le flotat est, quant à lui, observé dans une solution de iodure de potassium (1 g I<sub>2</sub>, 2 g IK dans 100 ml H<sub>2</sub>O), ce qui permet une coloration rouge-orange des structures contenant des protéines. Chaque préparation est observée en son entier à l'agrandissement 100, avec une mise au point répétée afin de bien pouvoir observer les structures présentes. Lorsque des fragments douteux sont localisés, une observation avec des agrandissements supérieurs (200 et 400 fois) est utile. Une observation en polarisation est aussi parfois pratiquée.

### Reconnaissance optique de particules d'origine animale

La méthode utilisée se base sur le fractionnement, la coloration et l'observation de l'échantillon. Si l'aliment pour animaux est principalement composé de substances végétales, par frac-



**Fig. 1.** Sédiment tel qu'il apparaît au stéréomicroscope (agrandi 25 x). Un fragment d'os de poisson (a) et un fragment d'os de volaille (b) peuvent être détectés parmi différents minéraux (flèches).

tionnement, il sera plus facile de trouver des fragments d'os, s'il y en a, que dans l'échantillon original. La séparation permet aussi d'effectuer des colorations différentes. Dans la solution de phénolglycérine, les différentes caractéristiques des fragments d'os apparaissent clairement, tandis que les fragments de fibres musculaires colorés en rouge-orange grâce à la solution de iodure de potassium peuvent être facilement repérés.

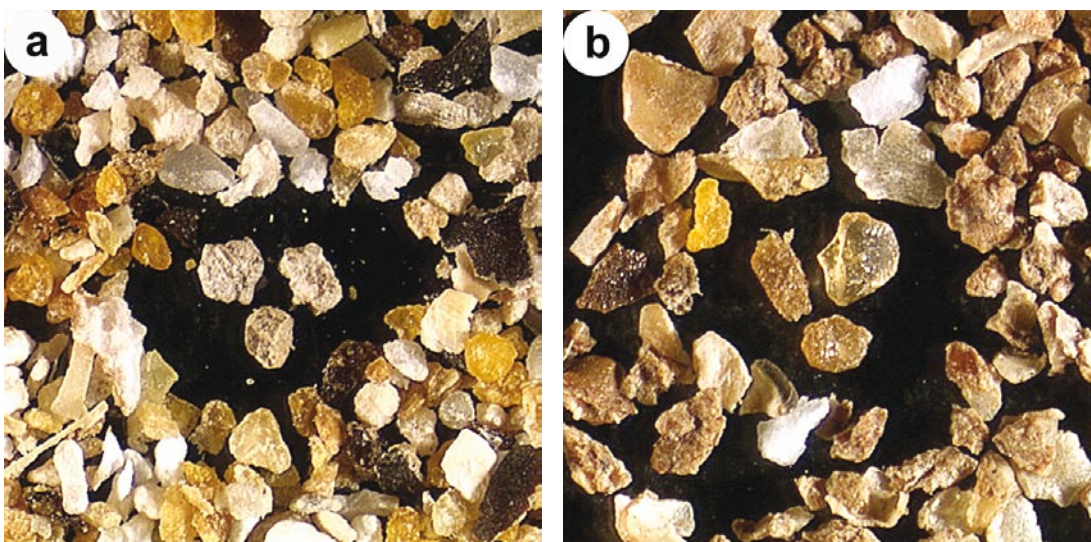
Dans un premier temps, les fractions grossières et moyennes du sédiment sont observées au stéréomicroscope. Parmi des

cristaux et d'autres composants minéraux, des fragments d'os typiques peuvent être repérés. Les fragments d'os de poissons présentent une couleur laiteuse, voire transparente et les arêtes ont une forme allongée typique (fig. 1a).

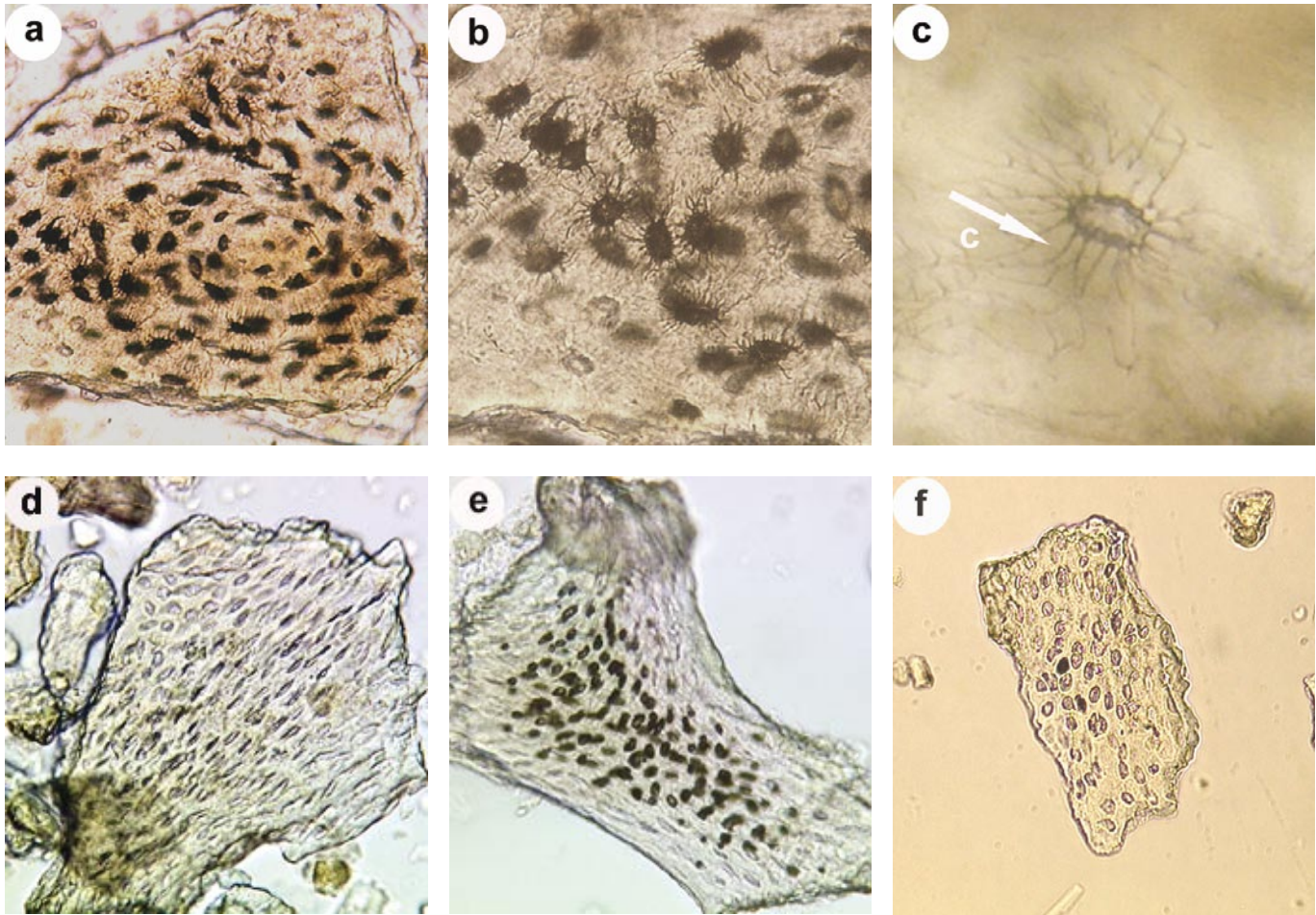
Les fragments d'os d'animaux terrestres peuvent présenter diverses couleurs allant du blanc au brun clair en passant par le jaune. Les fragments sont opaques, mats et présentent des bords arrondis (mammifères) ou tranchants (oiseaux) (fig. 1b). Des trous peuvent être observés, correspondant à des canaux qui

ont contenu des vaisseaux sanguins.

Dans les fractions grossières et moyennes du flotat, des particules d'origine animale peuvent être trouvées même si elles ne sont pas toujours aisées à déceler parmi les fragments végétaux, car elles ne se distinguent guère par leur couleur et leur forme. Malgré tout, des particules de farine animale (fibres musculaires, tendons, cartilages) peuvent être reconnues (fig. 2). En ce qui concerne la farine de poisson, les particules sont plutôt mates, de couleur grise à brune (fig. 2a), pour la farine de viande, elles



**Fig. 2.** Flotat tel qu'il apparaît au stéréomicroscope (agrandi 25 x). Les particules de farines animales, que ce soit de poissons (a) ou d'animaux terrestres (b) peuvent être différenciées par rapport à des fragments d'origine végétale par leur couleur et leur brillance.



**Fig. 3. Fragments d'os d'animaux terrestres tels qu'ils apparaissent au microscope. De nombreuses lacunes présentes dans des fragments d'os d'animaux terrestres peuvent être observées aux agrandissements 100 (a) et 200 (b); c: des canalicules typiques émergent d'une lacune (flèche) (agrandi 400 x). Les lacunes peuvent être réfringentes (e) ou bien transparentes (d, f) lorsque l'air a été remplacé par le milieu d'inclusion (100 x).**

sont plutôt brillantes et brunes claires (fig. 2b). Dans ces fractions, des poils, des plumes, de la corne ou encore des soies peuvent aussi être trouvés.

### Caractéristiques microscopiques

Les fragments douteux de la fraction grossière et de petites quantités des fractions moyennes et fines sont placés dans le milieu d'inclusion correspondant et observés au microscope. Les fragments d'os attirent l'œil par leur couleur et leur forme ainsi que par la présence de lacunes (aussi appelées logettes). Celles-ci représentent les cellules des os et sont distribuées de manière régulière dans la matrice osseuse. Ces lacunes sont réfringentes dans des préparations fraîches, apparaissant noires du fait de l'air qui y est encore em-

prisonné et transparentes lorsque l'air a été remplacé par le milieu d'inclusion.

La figure 3 (3a-c) présente les traits caractéristiques des os d'animaux terrestres. Les lacunes sont rondes, voire elliptiques et dotées de nombreux canalicules fins non ramifiés que l'on peut observer aux agrandissements 200 (fig. 3b) et 400 (fig. 3c). A noter que toutes les lacunes ne présentent pas ces canalicules (fig. 3d-f).

Les fragments d'os de poisson s'illustrent le plus souvent par des lacunes en forme de lentille ou de fuseau, parfois de tailles différentes. Les canalicules sont moins nombreux et offrent une certaine ressemblance avec un neurone (fig. 4a). Certains fragments d'os ne présentent pas de

lacunes distinctes, mais une surface brunâtre d'aspect rugueux (fig. 4b). La présence de farine de poisson peut aussi être déduite de l'observation de certaines structures caractéristiques, comme des fragments de branchies (fig. 4c), des fragments de la tête de consistance cartilagineuse (fig. 4d), des écailles (fig. 4e) ou encore des dents et des otolithes (fig. 4f).

Dans les observations du flotat, préparé dans une solution de iode de potassium, les particules riches en protéines sont colorées en rouge-orange alors que l'amidon réagit en se colorant en noir (fig. 5a). Des fragments de musculature striée (fig. 5b et 5c) se distinguent des autres constituants par leurs stries caractéristiques, fines et perpendiculaires à l'orientation des fibres. Des

fragments de musculature lisse (fig. 5d) ainsi que de cartilage peuvent aussi être reconnus (fig. 5e). Cependant, pour toutes ces particules, il n'est pas possible de déterminer, du moins par microscopie, s'il s'agit de fibres musculaires de poissons ou d'animaux terrestres. Dans ce cas, une observation en polarisation peut donner une indication supplémentaire, car les fibres musculaires des poissons possèdent des cristaux de guanine qui brillent (fig. 5f). Une grande quantité de ces cristaux peut indiquer la présence de fibres musculaires provenant de farines de poisson.

#### Intensification des contrôles

Grâce à cette méthode, la RAP a été en mesure d'analyser et d'évaluer un grand nombre d'échantillons depuis plusieurs années. La statistique des années

1991 à 2000 montre que, pour les aliments destinés aux ruminants, le nombre d'échantillons positifs reste relativement stable (fig. 6), malgré l'augmentation du nombre d'échantillons analysés en 1999 et 2000. Par cas positif, on peut distinguer les traces (<0,1%) des contaminations ( $\geq 0,1\%$ ). Le nombre de contaminations est faible, le maximum ayant été observé en 1996 avec 6 échantillons, ce qui représente 4,5%. Les traces et contaminations atteignent un maximum de 45% en 1995 mais ce nombre s'est abaissé en 1999 et 2000 à 22,6, respectivement 15,8%.

En 2001 et 2002, un plus grand nombre d'échantillons a été analysé, dont davantage d'aliments pour des animaux autres que les ruminants (tabl. 1). La proportion d'échantillons contenant des fragments d'os d'animaux terrestres a par contre bien dimi-

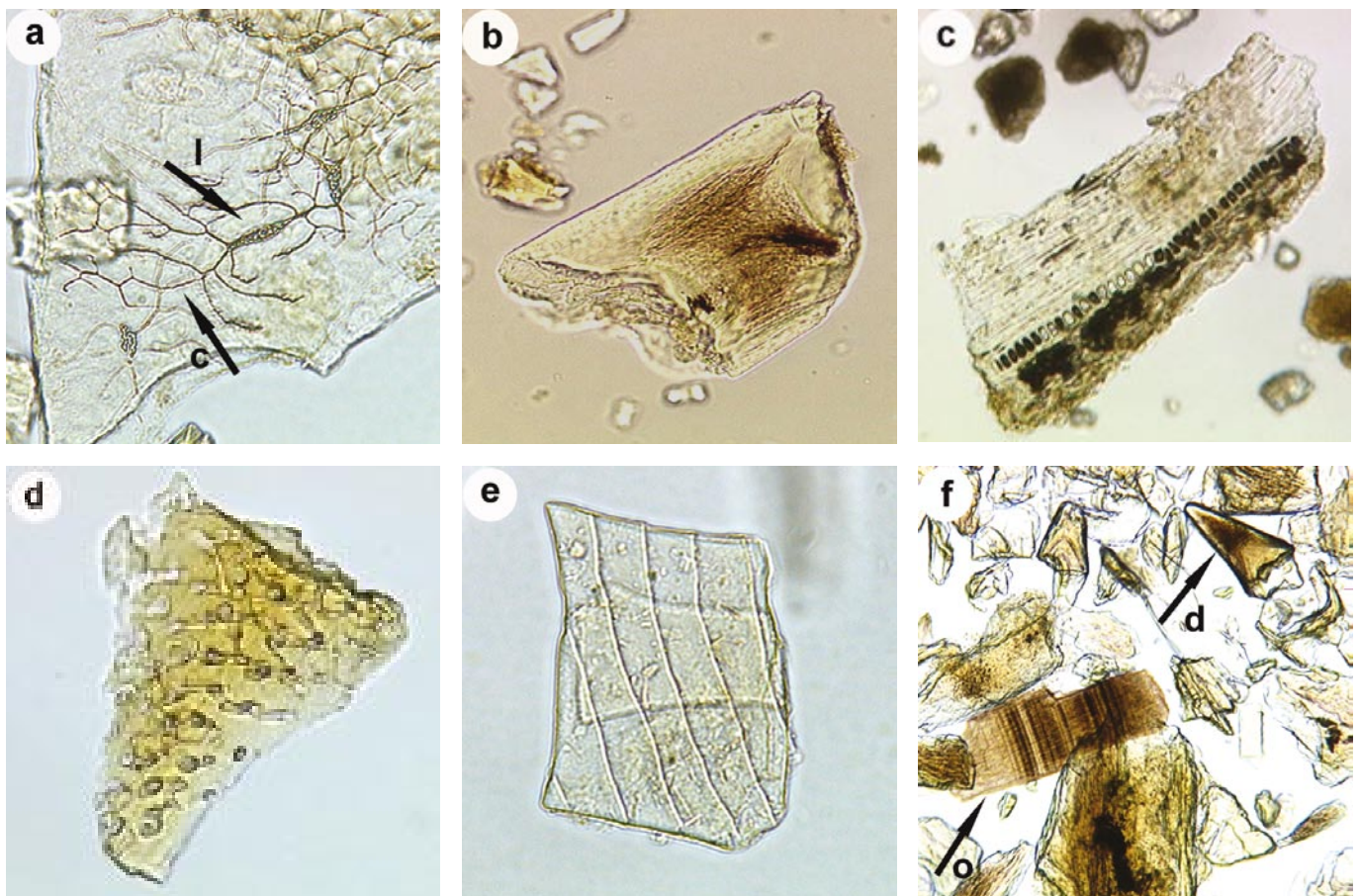
nué: 3,4% en 2001 et 2,4% pour les sept premiers mois de 2002. Des contaminations ont été détectées dans deux cas, ces deux dernières années, mais aucune n'a concerné des aliments destinés aux ruminants.

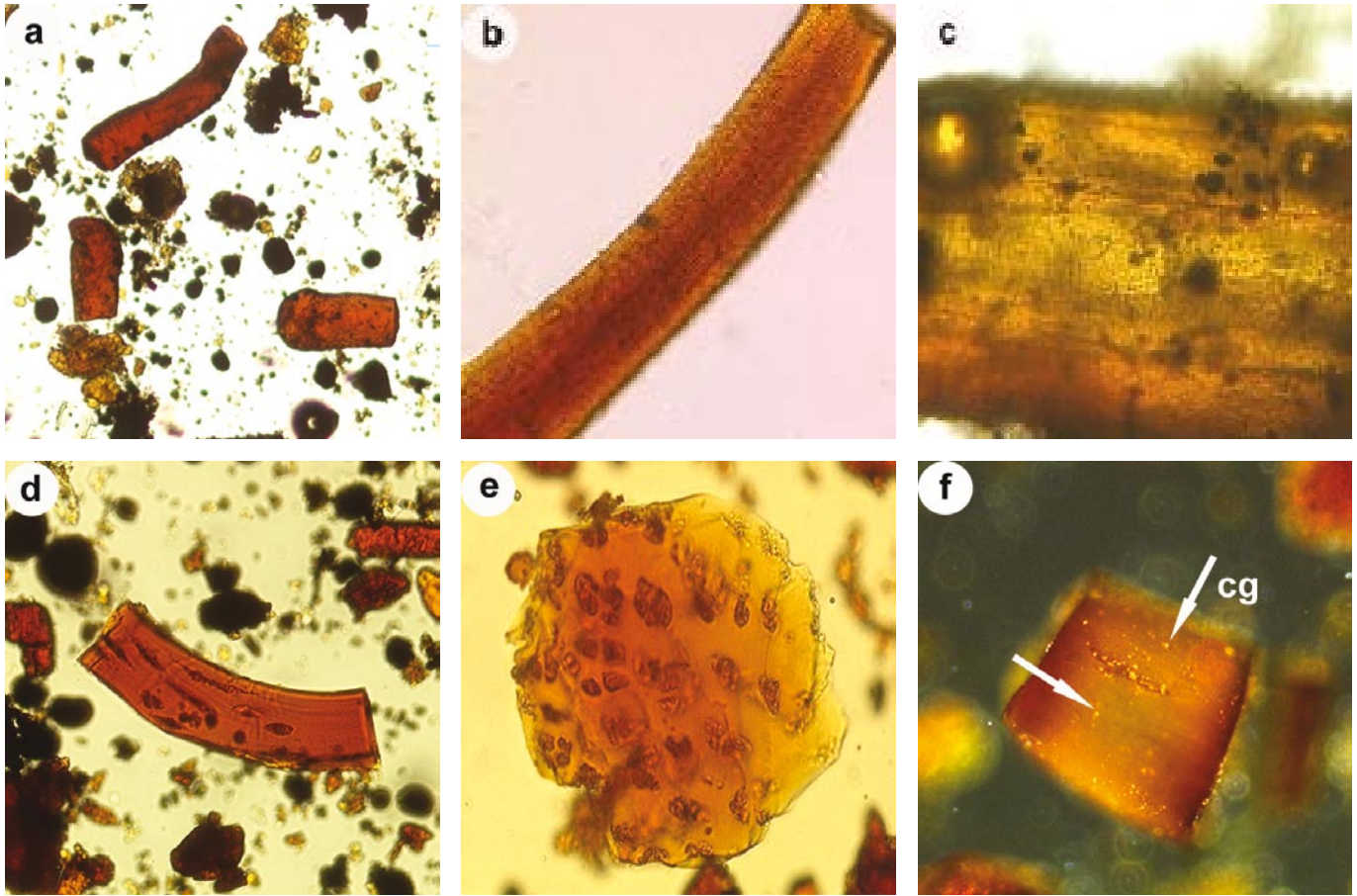
Ce qui n'apparaît pas dans ce tableau, sont les échantillons contenant des traces de farines de poisson. Ce genre de traces est régulièrement observé dans les échantillons provenant de fabricants qui possèdent une autorisation de mélanger de la farine de poisson à certains aliments. Ceci est observé dans les aliments pour ruminants ainsi que pour d'autres animaux de rente.

#### Etat actuel de la microscopie

Grâce à la microscopie, il est possible d'examiner des échantillons d'aliments destinés aux animaux de rente quant à la

**Fig. 4. Particules de poissons telles qu'elles apparaissent au microscope.** a: fragment d'arête de hareng avec des lacunes (l) et leurs canalicules caractéristiques (c) (agrandi 200 x); b: surface brune fibreuse d'un fragment d'os de hareng (100 x). Fragments de branchies (c) et de tête de hareng (d) (100 x); e: écaille de morue (200 x); f: dent (d) et otolithes (o) de morue (40 x).





**Fig. 5. Particules de viande telles qu'elles apparaissent au microscope. a: trois fragments de fibres musculaires entourées de grains d'amidon peuvent être observées à un faible agrandissement (40 x); b et c: fragments de fibres musculaires avec la striation transversale caractéristique (200, resp. 400 x); d: fragment de fibre musculaire ne présentant pas de striation transversale (100 x); e: particule de cartilage de volaille (200 x); f: des cristaux de guanine (cg) peuvent être observés en polarisation dans un fragment de fibre musculaire de poisson (100 x).**

présence de particules d'origine animale non autorisées, en l'espace de quelques heures, avec des moyens relativement simples. Comme on l'a montré précédemment, le seuil de détection est bas (<0,1%) pour un microscopiste expérimenté. Une quantification, par pesage et comptage, de la contamination est aussi tout à fait possible, pour autant que la quantité de sédiment soit suffisante.

Si des fibres musculaires sont observées dans un échantillon en l'absence de fragments d'os, il n'est alors pas possible de déterminer avec certitude s'il s'agit de particules de farines animale ou de poisson. Il convient alors d'éclaircir si le fabricant de l'aliment composé en question mélange de la farine de poisson dans certains de ses aliments. Dans l'affirmative, il est alors convenu

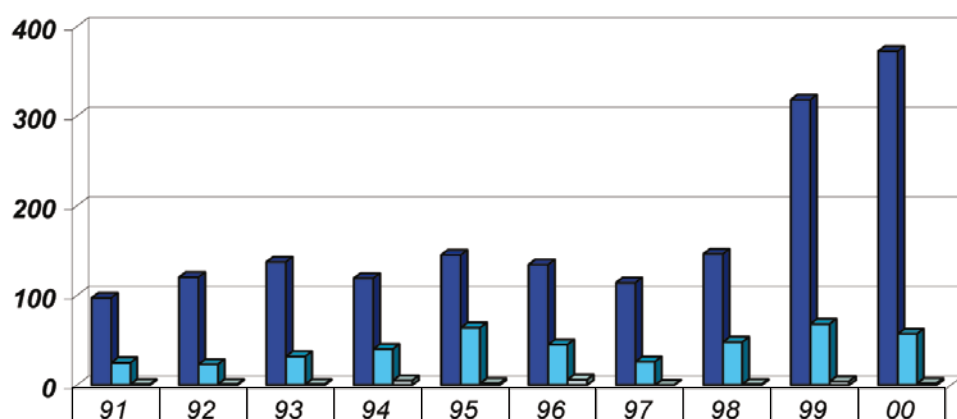
d'attribuer ces fibres musculaires à de la farine de poisson.

Lorsque des fragments d'os sont présents, une distinction est faite entre os de poissons et os d'animaux terrestres. Des traces de farine de poisson sont tolérées. Par contre, l'ajout de farine de poisson dans les aliments pour ruminants est totalement interdit. La présence inexplicquée de farine animale ou de fibres musculaires, même sous forme de traces, est aussitôt contestée, ceci indépendamment de la nature de l'aliment. Le résultat des contrôles effectués montre cependant que les prescriptions sont généralement bien respectées. Les cas positifs, sauf dans quelques rares cas, sont à mettre sur le compte de contaminations involontaires, dont il est important de déterminer la cause. Ceci est un des buts de l'Unité ESB

de la Confédération et c'est pour cela que les matières premières, ainsi que les issues de mouture, sont plus intensément examinées que par le passé.

#### Limites et perspectives

Les limites de la microscopie sont perceptibles dans deux domaines d'investigation. Premièrement, la reconnaissance de particules de viande sans caractéristiques, comme par exemple des entrailles chauffées, est pratiquement impossible. Dans des échantillons contenant 2% de ce genre de matériel, différents laboratoires n'ont pas été à même de reconnaître ces structures. Dans ce cas, la méthode par PCR, qui repose sur l'amplification de gènes spécifiques, a de plus grandes chances d'aboutir à un résultat concret. Cependant, il convient de préciser qu'une contamination par des entrailles seules a peu de chance



	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00
■ Echantillons pour ruminants analysés	97	120	137	119	145	134	114	146	318	372
■ Cas positifs (traces farines animales)	25	23	32	40	64	45	26	48	68	57
■ Cas positifs (contaminations farines animales)	1	1	1	5	2	6	0	1	4	2

Fig. 6. Statistique des analyses effectuées dans des aliments pour ruminants de 1991 à 2000. Une distinction est effectuée entre la présence de traces (<0,1%) et de contaminations ( $\geq 0,1\%$ ) par des fragments d'os d'animaux terrestres.

Tableau 1. Nombre d'échantillons analysés depuis l'interdiction d'affourager tous les animaux de rente avec des aliments contenant des farines animales.

	2001			Janvier - Juillet 2002		
	Echantillons analysés	Cas positifs*		Echantillons analysés	Cas positifs*	
		Traces (< 0,1%)	Contam.** (> 0,1%)		Traces (< 0,1%)	Contam.** (> 0,1%)
<b>Aliments composés pour</b>						
Ruminants	281	6	-	216	3	-
Porcs	173	3	2	154	1	-
Volailles	63	3	-	67	-	2
Chevaux	35	3	-	30	2	-
Lapins	4	-	-	8	1	-
Poissons	1	-	-	5	-	-
<b>Autres</b>						
Aliments simples	103	9	-	125	9	-
Farines de poisson	4	-	-	1	-	-
Minéraux	26	-	-	43	-	-
Prémélanges	17	-	-	5	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>707</b>	<b>24</b>	<b>2</b>	<b>639</b>	<b>16</b>	<b>2</b>

\* Fragments d'os d'animaux terrestres.

\*\* Contam. = contamination.

de survenir dans un aliment pour animaux de rente.

Deuxièmement, il est difficile d'effectuer une différenciation plus poussée entre fragments d'os de poissons et d'os d'animaux terrestres. La loi actuelle n'exige pas une séparation entre les carcasses de ruminants et celles d'autres animaux, mais ceci pourrait être modifié dans le futur. Ces différents points et les progrès de la PCR (Bellagamba *et al.*, 2001) conduiront certainement à une complémentarité plus poussée entre ces deux méthodes d'analyse.

### Bibliographie

- Bellagamba F., Moretti V. M., Comincini S., Valfrè F., 2001. Identification of species in animal feed-stuffs by Polymerase Chain Reaction - Restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3775-3781.
- Dahms S., Hörnlimann B., Wilesmith J. W., 2001. Die Ursache der BSE-Epidemie. *In: Prionen und Prionkrankheiten* (Eds. B. Hörnlimann, D. Riesner und H. Kretschmar). Walter de Gruyter, Berlin, 330-336.
- Hauswirth H., 1988. Futtermittelmikroskopie bringt die Qualität von Futtermitteln ans Tageslicht. *Landwirtschaft Schweiz* **1** (7), 419-421.
- Hofmann K., 2000. BSE-Prophylaxe durch Tiermehlkontrolle. *Fleischwirtschaft* **4**, 140-143.
- Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M., Shilton N., 2001. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* **15**, 27-35.
- Michard J., Ziebal R., 1999. Mise au point d'une méthode microscopique de détection des farines de viande, d'os et de poisson dans les aliments pour animaux. *Ann. Fals. Exp. Chim.* **92** (947), 209-223.

## ZUSAMMENFASSUNG

### Mikroskopische Untersuchung von Futtermitteln

Im Zusammenhang mit der Rinderkrankheit BSE werden die in der Schweiz produzierten und verkauften Futtermittel für Nutztiere im Rahmen der amtlichen Futtermittelkontrolle auf tierische Bestandteile untersucht. Die angewandte Methode basiert auf Fraktionierung (sedimentieren und sieben), Färbung und Beobachtung mittels Mikroskop. Tierische Bestandteile werden an ihren charakteristischen Farben, Formen und Strukturen erkannt. Die Methode erlaubt den Nachweis von tierischem Material bis in den Spurenbereich (<0,1%) und die Trennung zwischen Fisch und Landtier, soweit Knochen- oder andere charakteristische Bruchstücke anwesend sind. Typische Knochen- und Muskelfaserbruchstücke sowie andere Partikel von Fisch oder Landtier werden fotografisch dokumentiert. Die Zusammenstellung der Ergebnisse der durchgeführten Kontrollen von 1991 bis 2002 zeigt, ab 2001 einen deutlichen Rückgang der positiven Fälle und eine Zunahme der analysierten Proben.

Die Mikroskopie ist gegenwärtig die schnellste, kostengünstigste und genaueste Methode um tierische Bestandteile in Futtermitteln nachzuweisen.

## SUMMARY

### Animal feed analysis using microscopy

Since the appearance of „mad cow disease“ (BSE), most of the animal feeds sold or produced in Switzerland are officially and systematically tested for contamination with animal by-products. The method of analysis consists in fractionating (sedimenting and sieving), followed by coloration and observation under the microscope. Particles of animal origin are recognized by their color, form and characteristic structures. This method makes it possible to detect traces (< 0,1 %) of animal compounds and to distinguish between fish and land animal matter if fragments of bones or other mineralized particles are present. Micrographs are made to demonstrate the presence of bone and muscle fiber particles as well as other typical parts of fish or other vertebrates. Results of controls from 1991 to 2002 show that the proportion of positively tested samples for fragments of land animal bones has markedly decreased; at the same time, the number of analyzed samples has increased, particularly since 2001.

At present, microscopy is the fastest, cheapest and most accurate method to analyze the presence of animal by-products in animal feeds.

**Key words:** animal feeds, microscopy, BSE, animal by-products, fishmeal, micrographs.