RAPPORT DE SYNTHESE DE L'ETUDE DE VALIDATION DU PREMI® TEST (R-BIOPHARM) :

TEST DE DETECTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE MUSCLE

VERSION 3 du 16 février 2011

Sommaire

1. UN RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE 2
1. Principe de la méthode alternative 2
2. Notice d'utilisation 4
3. Domaine d'application 4

2. UN RAPPEL SUR LA METHODE DE REFERENCE 5
1. Principe 5
2. Méthode 5
3. Interprétation des résultats 6

3. PRINCIPAUX RESULTATS DE LA VALIDATION INITIALE (2006) 8
1. Praticabilité 8
2. Sensibilité (limites de détection)/Spécificité 9
3. Comparaison de la méthode alternative et de la méthode de référence 9
4. Conclusion de l'étude préliminaire 13
5. Etude interlaboratoire 13

4. UNE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 15
1. Synthèse des publications apportant des informations sur la performance de la méthode alternative 15
2. Bilan des validations externes réalisées par d'autres organismes qu'AFNOR Certification (date, organisme, nature du protocole de validation, indication de la méthode de référence) 18

5. UN BILAN DES RECLAMATIONS UTILISATEURS 25

6. UN ETAT DES MODIFICATIONS INTERVENUES DEPUIS LA PRECEDENTE VALIDATION 26

7. UNE PRESENTATION DES MODIFICATIONS EVENTUELLES ENVISAGEES DANS LA METHODE ALTERNATIVE 32

8. UN PROJET DE COMPLEMENT D'ETUDE DE VALIDATION SI NECESSAIRE 32

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 33

10. ANNEXES 34

1. UN RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE

- Date de 1ère certification NF VALIDATION: 15 Juin 2006.
- Date de reconduction dans le cadre de la marque NF VALIDATION: 15 juin 2010

L'attestation de validation est disponible sur le site internet de la marque NF VALIDATION (www.afnor-validation.org).

La société R-Biopharm AG (Darmsdat, Allemagne) est responsable de la commercialisation du kit Premi®Test depuis début janvier 2011.

1. *Principe de la méthode alternative*

Le Premi®Test permet de détecter les substances antimicrobiennes présentes dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins, le poisson et les œufs. C'est un test à large spectre, qui permet de détecter un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande en moins de 4 heures, sur du jus de viande (extrait par pressage d'un morceau de viande).

PRINCIPE

Le Premi®Test est basé sur l'inhibition de la croissance du *Bacillus stearothermophilus*, bactérie très sensible à de nombreux antibiotiques et aux sulfamides. Des spores standardisées sont inclues dans de la gélose additionnée de nutriments sélectionnés.

METHODE

Le Premi®Test est d'une utilisation simple. Le **jus de viande** est déposé dans des tubes contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de Bacillus stearothermophilus. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus et préchauffage de l'incubateur pendant 20 minutes, il faut incuber le tube pendant environ 3 heures à 64°C et vérifier la couleur.

Figure 1. Instructions illustrées pour le Premi®Test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La lecture du résultat « oui/non » se limite à une comparaison de couleurs. En l'absence d'antibiotiques, les spores germent et se développent, entraînant l'acidification du milieu et un changement de couleur. Si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que la quantité de composés antimicrobiens se situe en deçà des limites de détection du Premi®Test. Inversement, en présence d'antibiotiques, les spores ne se développent pas, elles sont inhibées par l'antibiotique : une couleur violette indique un taux d'antibiotiques supérieur ou égal à la limite de détection du test.

Figure 2. Interprétation des résultats du Premi®Test

2. Notice d'utilisation

La validation a porté sur le protocole suivant : Notice **0609 (annexe 1a)**.La notice exploitée dans le cadre de l'étude de reconduction est référencée Notice **0911** (**cf. annexes 1b à 1d)**. Seul le nom DSM PremiTest a changé par rapport à la version de 2006.

Figure 3. Logo du Premi®Test.

Aucune modification n'y a été apportée depuis la première validation : pas de changement dans le contenu, ni dans le protocole.

Note : A la date de rédaction du rapport de synthèse version 3, une nouvelle version de notice **1011** a été éditée pour prendre en compte le changement de société responsable de la commercialisation du kit Premi®Test. Aucune modification n'a été apportée au protocole.

3. Domaine d'application

C'est indiqué sur la notice : « La certification NF VALIDATION porte sur les viandes de bovin, de porc et de volaille. »

2. UN RAPPEL SUR LA METHODE DE REFERENCE

Lors de la 1ère certification NF VALIDATION obtenue en Juin 2006, la méthode de référence était la méthode officielle française des 4 Boites (LMV/90/01). La méthode des 4 boites [1] est la méthode officielle française de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande. La méthode des 4 boites a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras.

Cette méthode a évolué fin 2008 (LMV/90/01 version 5 du 10/12/2008) car le **milieu ASS pH 7.4** n'est plus commercialisé.

Toutefois, le principe de la méthode n'a pas changé.

1. Principe

La détection des résidus de substances à activité antibiotique nécessite l'application d'une technique de diffusion en gélose qui comporte :

- La préparation des boîtes de milieu nutritif ;
- La préparation des souches de microorganismes utilisées pour les tests ;
- l'ensemencement, par un microorganisme sensible aux substances à activité antibiotique, d'un milieu nutritif solide coulé en boîte de Pétri.
- le dépôt, à la surface du milieu ensemencé, d'une **rondelle de muscle congelé**, suivi d'une incubation à la température optimale de développement du microorganisme-test.

Les substances à activité antibiotique éventuellement présentes inhibent la croissance du microorganisme-test : il en résulte la formation d'une zone d'inhibition autour de l'échantillon.

2. Méthode

La **précédente méthode** requérait l'utilisation des deux espèces suivantes : *Bacillus subtilis BGA* cultivé à trois pH différents (6, 7,4 et 8) (Bs6, Bs7.4 et Bs8) et *Micrococcus luteus* cultivé à pH 8 (Ml8). Pour la méthode de diffusion réalisée avec *Bacillus subtilis BGA* à pH 7,4, l'addition de triméthoprime (TMP) permet la détection des sulfamides dans le muscle grâce à la synergie triméthoprime-sulfamides.

La **nouvelle version 5 de la méthode** requiert l'utilisation des deux mêmes espèces : *Bacillus subtilis BGA* cultivé à 2 pH différents (6 et 8) (Bs6 et Bs8) et *Micrococcus luteus* cultivé à 2 pH différents (7,4 et 8) (Ml7.4 et Ml8). Pour la méthode de diffusion réalisée avec *Micrococcus luteus* à pH 7,4, l'addition de triméthoprime permet la détection des sulfamides dans le muscle grâce à la synergie triméthoprime-sulfamides.

Conclusion : Le **milieu ASS** à pH 7.4 a été remplacé par le **milieu DST (Diagnostic Sensitive Test)** à pH 7.4 (OXOID). De plus, le germe *Bacillus subtilis BGA* a été remplacé par le germe *Micrococcus luteus* avec ce milieu à pH 7.4 + TMP pour la détection des sulfamides. Seule cette boite a été modifiée sur les 4 boites.

Le principe de dépôt des échantillons n'a pas évolué :

- Sortir les échantillons du congélateur, quelques minutes avant d'opérer, et les déposer sur un plateau en acier inoxydable.
- Prélever sur chaque échantillon une "carotte" cylindrique de 8 mm de diamètre et de 2 cm de long environ, à l'aide d'un emporte-pièce.
- Tout en poussant le cylindre de muscle hors de l'emporte-pièce, découper à l'aide d'un bistouri huit rondelles de viande de 2 mm d'épaisseur.
- Placer deux rondelles en positions diamétralement opposées sur chacune des quatre boîtes d'essai, en utilisant des pinces.

Il est ainsi possible de déposer dans chacune de ces boîtes jusqu'à six rondelles, correspondant à trois échantillons à examiner, toutes ces rondelles devant se situer sur un cercle à environ 1 cm de la périphérie de la boîte.

Enfin, *l'interprétation des résultats* n'a pas évolué.

3. Interprétation des résultats

Pour chacune des quatre boîtes, sont considérés comme positifs, les échantillons de viande donnant des zones d'inhibition dont la taille de la zone annulaire est au moins égale à 2 mm.
Il faut recommencer l'essai chaque fois que le résultat semble douteux (pour un même échantillon une rondelle étant positive et l'autre négative, colonies éparses dans la zone d'inhibition, contaminations, etc...).
Si le second résultat n'est pas considéré comme positif, le résultat douteux doit être considéré comme négatif.

Conclusion

Sont considérés comme contenant des résidus de substances à activité antibiotique, les échantillons trouvés positifs par l'une au moins des quatre techniques de diffusion en gélose.
De plus chaque boite présente une sensibilité particulière pour certaines familles d'antibiotiques, ce qui permet de donner les orientations suivantes :

Tableau 1. La méthode des 4 boites versions 4 et 5 et orientations.

	Boite 1	Boite 2	Boite 3	Boite 4
Version 4	Bacillus subtilis à pH 6	Bacillus subtilis à pH 7,4	Bacillus subtilis à pH 8	Micrococcus luteus à pH 8
Orientation	Béta-lactamines ou tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Béta-lactamines et macrolides
Version 5	Bacillus subtilis à pH 6	Micrococcus luteus à pH 7,4	Bacillus subtilis à pH 8	Micrococcus luteus à pH 8
Orientation	Béta-lactamines ou tétracyclines	Sulfamides ou béta-lactamines	Aminosides	Béta-lactamines et macrolides

En conclusion, une seule des 4 boites a été modifiée.

Nous verrons plus loin les conséquences sur la sensibilité de la méthode.

3. PRINCIPAUX RESULTATS DE LA VALIDATION INITIALE (2006)

1. Praticabilité

Critères de praticabilité du kit : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13.

Tableau 2. Praticabilité du Premi®Test.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
1	Emballage	Emballage ou notice	1 boite polystyrène + 1 notice d'utilisation en plusieurs langues.
2	Volume des réactifs	Emballage ou notice	25 ampoules, 1 seringue doseuse de 1 ml (volume mesuré fixe = 100 µl), des embouts de seringues jetables
3	Conditions de stockage (+ date de péremption)	Emballage ou notice	Notice : A stocker au frais (<8°C). NE PAS CONGELER Date de péremption et numéro de lots indiqués sur l'emballage.
4	Mode d'utilisation après la 1ère utilisation	Emballage ou notice	Notice : A stocker au frais (<8°C). NE PAS CONGELER
5	Equipement ou locaux spécifiques	Notice	Incubateur DSM ou bain-marie (64°C)
6	Réactifs prêts à l'emploi ou réactifs à préparer (protocole)	Emballage ou notice	Aucun réactif à préparer. Tout est prêt à l'emploi.
7	Temps de formation d'un technicien inexpérimenté	Rapport	Entre 1 jour et 2 jours (formation de 6 LVD)
8	Temps réel de manipulation/Flexibilité de la technique en fonction du nombre d'échantillons à analyser,...	Rapport	**Fonction du nombre d'échantillons :** Temps de décongélation des échantillons (à 37°C), Dépôt des échantillons dans les ampoules, Lavages à l'eau **Indépendant du nombre d'échantillons :** Temps de pressage, Pré-incubation 20 minutes Incubation à 64°C entre 2H40 et 3H00 en moyenne
9	Délai avant les résultats	Rapport et attestation	*Environ 5 heures entre le début de préparation des échantillons et la lecture des résultats pour 15 à 20 échantillons.*
10	Type de qualification d'un technicien	Rapport	Qualification requise inférieure à la méthode de référence (car réactifs prêt à l'emploi).
11	Etapes communes avec la méthode de référence	Attestation	Aucune
12	Si oui, traçabilité des résultats	Notice	Saisie des résultats sous Excel (n°lot, validité, témoins négatifs et/ou positifs, résultats…)
13	Maintenance par le laboratoire	Rapport	Contrôle de l'incubateur ou bain-marie (t°)

2.

Sensibilité (limites de détection)/Spécificité

Résultats de la phase 1 :

Cette phase a été réalisée sur des jus de viande supplémentés uniquement par analyses avec le Premi®Test. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3. Limite de détection (échantillons avec des concentrations croissantes de 6 antibiotiques).

Famille	**SULFAMIDE**	**TETRACYCLINE**	**MACROLIDE**	**BETA-LACTAMINE**	**AMINOSIDE**	**BETA-LACTAMINE**
Antibiotique	Sulfadimérazine	Oxytétracycline	Tylosine	Amoxicilline	Gentamycine	Ceftiofur
LMR (muscle) (µg/kg)	100	100	100	50	50	1000
Limite de détection	**2xLMR**	**2xLMR**	**LMR**	**0.5xLMR**	**> 2xLMR**	**0.5xLMR**

LMR : Limite Maximale en Résidus

CONCLUSION DE LA PHASE 1 :

L'étude de jus de viande de porc supplémentés a permis de montrer que pour 6 molécules appartenant à 5 familles d'antibiotiques différentes, la limite de détection du Premi® Test se situe au niveau de la Limite Maximale de Résidu (LMR) correspondante. Pour un seul antibiotique (gentamycine), la limite de détection est supérieure à la LMR (40% de positifs à 2xLMR).
Avec 20 échantillons « blancs » testés et 6 molécules antibiotiques (5 échantillons par antibiotique), le **taux de faux-négatifs à 2 fois la LMR est de 8% et le taux de faux-positifs de 18%**.
Le résultat est satisfaisant puisque pour une méthode de dépistage le taux qui doit être minimal est le taux de faux négatifs, étant donné que les échantillons déclarés positifs (dont les faux positifs) doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification.

3. Comparaison de la méthode alternative et de la méthode de référence

a) Résultats de la phase 2 :

Cette phase a été réalisée sur des muscles naturellement chargés (animaux traités au laboratoire). Les analyses ont été réalisées en parallèle avec la méthode des 4 Boites et avec le Premi®Test. Le tableau suivant permet de résumer les résultats obtenus.

Tableau 4. Comparaison des performances de la méthode des 4 Boites et du Premi®Test.

Antibiotique	Oxytétracycline / Sulfadiméthoxine	Amoxicilline	Tylosine	**Global échantillons naturellement chargés**	Blanc 1
LMR (muscle porc) (µg/kg)	100 / 100	50	100		
Concentrations trouvée LC-MS-MS (en µg/kg)	760 / 150	270	750		
Nombre positifs Premi®Test	**5 / 5**	**5 / 5**	**5 / 5**	**15 / 15**	**0 / 5**
Nombre positifs **4 Boites**	5 / 5	4 / 5	1 / 5	**10 / 15**	2 / 5

CONCLUSION DE LA PHASE 2 :

- Cette phase de l'étude a montré que la méthode 4 Boites et le Premi®Test donnent des résultats concordants (« les 2 méthodes ne sont pas différentes »). Toutefois on observe que **lors de cette phase les taux de faux-négatifs et de faux-positifs (par rapport à la présence ou à l'absence réelle de résidus d'antibiotiques dans les échantillons, mesurés via la CL/SM-SM) sont meilleurs pour le Premi®Test que pour la méthode des 4 Boites.** En effet la sensibilité de la méthode des 4 Boites est parfois insuffisante pour certains antibiotiques (**amoxicilline et surtout tylosine**).
- Le fait d'avoir traité les animaux à l'ANSES ainsi que l'analyse des matrices naturellement chargées et des matrices « blanches » par CL/SM-SM **permet d'être certain du contenu de ces échantillons**.
- Enfin il faut noter que les concentrations des échantillons naturellement chargés sont très supérieures aux LMRs respectives des 4 antibiotiques (de 1.5 à 7.6 fois la LMR). Ceci est dû à des difficultés en pratique à produire des échantillons naturellement chargés à une concentration précise.

b) Résultats de la phase 3 :

Cette étude a été menée en utilisant des échantillons naturellement chargés provenant «du terrain». 1427 échantillons ont été analysés (objectif initial = 1000) dans 6 laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) en utilisant 2 méthodes : le Premi®Test et une boîte avec Bacillus cereus.

Cette phase 3 de l'étude a permis de travailler sur de très nombreuses espèces et ainsi de renforcer les résultats des phases 1 et 2 qui étaient basées uniquement sur du muscle de porc.

Les échantillons positifs avec au moins une des méthodes microbiologiques (Premi®Test, 4 Boîtes ou méthode européenne STAR) **ont été analysés en CL/SM-SM**.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus au niveau des LVD, puis à l'ANSES avec le Premi®Test, la méthode des 4 Boites, la méthode STAR et la méthode de confirmation par CL/SM-SM.

Tableau 5. Répartition par espèce.

	Espèce	Bovin	Porc	Volaille	Autres	Inconnu
LVD	Nombre échantillons analysés au LVD	379	671	205	26	146
	Nombre positifs et douteux LVD Premi®Test	63	26	1	5	7
ANSES	Nombre échantillons analysés à l'ANSES	65	31	4	5	7
	Nb échantillons positifs et douteux Premi®Test	45	19	2	5	7
	Nb Echantillons positifs 4 Boîtes	3	5	2	0	0
	Nb échantillons positifs STAR	13	13	4	0	2
ANSES CL/SM-SM	Nb échantillons testés	38	18	4	1	0
	Nb échantillons positifs (molécule identifiée)	14	8	3	0	0

On observe le manque de sensibilité de la méthode des 4 Boites vis à vis d'un certain nombre d'antibiotiques, puisque le nombre de positifs 4 Boites est bien inférieur au nombre de positifs CL/SM-SM (molécule identifiée). Par contre, la meilleure sensibilité du Premi®Test permet de détecter plus de vrais-positifs qu'avec la méthode des 4 Boites.

Toutefois, pour une partie des échantillons positifs en Premi®Test analysés ensuite en CL/SM-SM, aucun résidu d'antibiotique n'a été retrouvé. On ne peut toutefois être certains qu'il s'agisse de « faux-positifs » pour 2 raisons principales :

- soit un problème d'instabilité des molécules contenues initialement dans l'échantillon (stockage ou transport, délai avant l'analyse en CL/SM-SM trop long, molécules très instables….),
- soit la présence dans l'échantillon d'antibiotiques qui ne sont pas contenus dans le spectre de détection de la méthode CL/SM-SM ou pour lesquels la sensibilité est insuffisante.

Le Premi®Test a été utilisé, au niveau des LVD comme au niveau de l'ANSES, sur des jus provenant de toutes les espèces. Les conditions de mise en œuvre ne diffèrent pas entre les espèces. Les études bibliographiques (voir chapitre 4) ne font pas état de différence importante concernant les seuils de détection.

Ces données ont permis d'étendre la validation du Premi®Test du muscle de porc aux muscles de bovin et de volaille.

Corrélation méthode alternative/méthode de référence (4 Boites) à l'ANSES :

En conclusion, la concordance (exactitude relative) entre les résultats du Premi®Test et de la méthode des 4 Boites est très satisfaisante si on inclue tous les échantillons du panel.
Si les 2 méthodes sont déclarées différentes après un test statistique, c'est en raison d'un taux élevé de déviation positive (Premi®Test +/4 Boites -) qui est du au manque de sensibilité de la méthode de référence vis à vis d'un certain nombre d'antibiotiques (Bétalactames ou Sulfamides).

Comparaison méthode alternative (Premi®Test) /méthode de référence (4 Boites) à l'ANSES pour les échantillons retrouvés positifs avec la méthode CL/SM-SM à l'ANSES

Au bilan on constate que, sur l'ensemble des échantillons pour lesquels une molécule a pu être identifiée, grâce à la méthode CL/SM-SM, le pourcentage d'échantillons positifs en Premi®Test est comparable à celui des positifs en méthode des 4 boîtes. Toutefois, les molécules retrouvées ne sont pas exactement les mêmes : **meilleure détection des Bétalactames ou des Sulfamides pour le Premi®Test, meilleure détection de certaines tétracyclines pour la méthode des 4 boîtes.**

CONCLUSIONS DE LA PHASE 3 :

- Lors de cette phase 3, les taux de faux-positifs de la méthode des 4 Boites et du Premi®Test sont respectivement de 1% et de 30%. Par contre les taux de faux-négatifs de la méthode des 4 Boites et du Premi®Test sont respectivement égaux à 16 et 4%.
- Cette phase de l'étude a donc montré que la méthode des 4 Boites et le Premi®Test donnent des résultats différents (« les 2 méthodes sont différentes »). Toutefois, comme dans la phase 2, on observe que les taux de faux-négatifs sont meilleurs pour le Premi®Test que pour la méthode des 4 Boites, sachant que c'est le paramètre à minimiser pour une méthode de dépistage. En effet, la sensibilité de la méthode des 4 Boites est parfois insuffisante pour certains antibiotiques (Bétalactames ou des Sulfamides), ce qui explique aussi qu'elle donne moins de résultats faux-positifs que le Premi®Test.
- Il faut noter que, contrairement à la phase 2, ici nous ne sommes pas certains du contenu des échantillons. Ce sont les résultats de CL/SM-SM qui sont considérés comme la réalité du contenu des échantillons. Toutefois, pour les raisons évoquées précédemment (instabilité, problèmes liés à la CL/SM-SM), on ne peut garantir que les résultats de CL/SM-SM représentent la réalité.
- Le Premi®Test est applicable aux muscles de différentes espèces (porcins, bovins, volaille, ovin, lapin, …), à la condition de tester chaque fois un jus témoin négatif de chaque espèce à analyser.

4. Conclusion de l'étude préliminaire

- Les 3 phases de l'étude de validation du Premi®Test réalisée dans le cadre de la marque NF VALIDATION ont permis de réunir une grande somme de données et de résultats sur les performances du Premi®Test dans un 1er temps, mais aussi sur les performances comparées du Premi®Test et de la méthode des 4 Boites.
- En conclusion, le Premi®Test est applicable aux muscles de différentes espèces (porcin, bovin, ovin, …) en utilisant comme témoin négatif un muscle »blanc » de l'espèce analysée.
- La méthode des 4 Boites (prise comme méthode de référence) et le Premi®Test ont des performances comparables en terme de sensibilité et de spécificité lorsqu'on prend des échantillons non biaisés. Il y a par contre une différence si l'on ne prend en compte que des échantillons déjà sélectionnés par screening avec le Premi®Test.
- Le taux de faux-négatifs du Premi®Test a toujours été inférieur à celui de la méthode des 4 Boites. C'est ce taux qui doit être minimal pour une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques. On a observé une meilleure détection des Béta-lactamines ou des Sulfamides pour le Premi®Test, et une meilleure détection de certaines tétracyclines pour la méthode des 4 boîtes.

A l'inverse le taux de faux-positifs du Premi®Test s'est révélé, dans la phase 3, plus élevé que celui de la méthode des 4 Boites. Ceci ne remet pas en cause les performances de la méthode mais incite d'une part à améliorer la méthode de confirmation (CL/SM-SM) afin de retrouver une plus large palette d'antibiotiques, d'autre part un éventuel surcoût lié à la nécessité de confirmer les positifs par CL/SM-SM.

5. Etude interlaboratoire

L'étude interlaboratoire a été organisée en 2006, comprenant 11 laboratoires ont été sollicités.

Chaque laboratoire a reçu 32 échantillons de jus de viande supplémentés, provenant de 3 espèces différentes (bovin, porc, volaille), répartis de la manière suivante: 24 échantillons positifs en antibiotiques représentant 12 niveaux en double aveugle (4 antibiotiques différents et 3 niveaux par antibiotique) et 4 échantillons représentant le lot témoin sans antibiotique.

Toutes les analyses devaient être effectuées en double (2 séries d'analyse distinctes) et en aveugle, avec le Premi®Test uniquement, dans chacun des laboratoires collaborateurs. Les participants avaient un délai d'une semaine maximum après réception des échantillons.

Ils devaient impérativement analyser en plus des échantillons inconnus un témoin négatif ('blanc') par espèce et un échantillon positif (supplémenté avec de la pénicilline G à 10 µg/kg).

Les résultats sont présentés ci-dessous.

Tableau 6. Résultats par niveau de contamination.

Paires	Niveaux	Concentrations (µg/kg)	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs	% de résultats positifs	
Porc oxytetracycline	**L0**	**0**	36	0	0%	FP0 [(a)]
	L1	**20**	36	0	0%	FP1 [(b)]
	L2	**200**	32	4	11%	VP2 [(c)]
	L3	**400**	11	25	**69%**	VP3 [(d)]
Porc ceftiofur	**L0**	**0**	30	6	17%	FP0
	L1	**40**	34	2	6%	FP1
	L2	**400**	32	4	11%	VP2
	L3	**800**	0	36	**100%**	VP3
Bœuf sulfadimerazine	**L0**	**0**	32	4	11%	FP0
	L1	**20**	33	3	8%	FP1
	L2	**200**	30	6	17%	VP2
	L3	**400**	17	19	**53%**	VP3
Poulet Tylosine	**L0**	**0**	36	0	0%	FP0
	L1	**10**	36	0	0%	FP1
	L2	**100**	6	30	83%	VP2
	L3	**200**	0	36	**100%**	VP3

FP0[(a)] : Faux-positifs au niveau 0 ; FP1[(b)] : Faux-positifs au niveau 1 ; VP2 [(c)]: Vrais-positifs au niveau 2 ; VP3 [(d)]: Vrais-positifs au niveau 3.

D'une façon générale les résultats de l'étude inter laboratoire sont très satisfaisants. On retrouve les mêmes types de résultats que lors de l'étude préliminaire en terme de niveau de détection. Les résultats bruts de 9 laboratoires ont finalement été analysés, en plus de ceux du laboratoire expert. La spécificité a été estimée à 95.3 %, de plus la sensibilité du test au niveau L3 a été calculée à 72,5%. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de précédentes validations de kits de détection des résidus d'antibiotiques dans le lait.
Les résultats en terme de répétabilité et de reproductibilité sont très satisfaisants, avec des pourcentages moyens de 94,8% et 92,7 % pour la répétabilité et de 89,1 pour la reproductibilité.

Les résultats complets obtenus dans le cadre de l'étude NF VALIDATION ont été publiés dans un journal scientifique international par le laboratoire expert [2].

4. UNE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Synthèse des publications apportant des informations sur la performance de la méthode alternative

Sept publications antérieures à 2006 (cf. précédent rapport de synthèse de 2006) avaient montré que :

Conclusion de l'étude bibliographique :

Le Premi®Test peut détecter la plupart des antibiotiques au niveau des LMRs (macrolides, tetracyclines, sulfamides) ou même en dessous (beta-lactamines). Pour quelques antibiotiques comme des aminosides, la spiramycine (macrolide), les limites de détection sont plus élevées que les LMRs. C'est le cas pour tous les tests de dépistage des résidus d'antibiotiques puisqu'il n'existe pas de test à l'heure actuelle capable de détecter tous les résidus d'antibiotiques au niveau des LMRs. Plusieurs études ont montré que l'origine du muscle (espèce animale d'origine) a peu ou pas d'influence sur la sensibilité du test.

Depuis cette date, d'autres articles scientifiques ont été publiés concernant les performances du Premi®Test dans la viande, les œufs, le poisson, le rein, ……. Un état des lieux est présenté ci-dessous.

MUSCLE

- Une étude a permis d'évaluer 3 tests d'inhibition microbienne: la méthode des 4 Boites, une méthode 5 Boites (STAR) et le Premi®Test [3]. Les tests ont été utilisés pour détecter les résidus de sulphamethazine (SMZ) dans les tissus de lapin après administration par voie orale jusqu'à 15 jours du délai d'attente. Une procédure d'extraction par solvant a été utilisée pour améliorer la sensibilité des méthodes Boites (pas pour le Premi®Test). Concernant les résultats obtenus en CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance), il a été conclu que le test le plus approprié pour la détection des résidus de SMZ dans les tissus de lapins au niveau d'intérêt (LMR) est le Premi®Test, suivi par la STAR couplée avec le procédure d'extraction par solvant. L'étape d'extraction par solvant a sensiblement amélioré les résultats des méthodes de diffusion, la STAR et la méthode des 4 Boites.

POISSON

- La méthode des 4 Boites a été utilisée pour la détermination des résidus de sulfadiazine / triméthoprime dans la truite [4]. Cette méthode d'inhibition microbiologique utilise trois milieux ensemencés avec Bacillus subtilis à différentes valeurs de pH (6, 7,2 ou 8,0) et un quatrième milieu ensemencé avec Micrococcus luteus. Le Premi®Test a également été utilisé en parallèle. Le tissu a été broyé puis centrifugé et le surnageant a été récupéré. Pour le Premi®Test 100 µl de surnageant sont déposés sur les ampoules. Pour la 4 Boites, 10 µl de surnageant sont déposés sur des disques de papier, eux-mêmes déposés sur les 4 boites. Les concentrations en résidus s'accumulent et

atteignent un plateau à 5 jours. Cette étude a montré que le Premi Test est plus sensible que la méthode des 4 boites pour la détection des rsidus de sulfadiazine / triméthoprime dans la truite. En effet, 3 jours après l'arrêt du traitement (jour 10), des résidus sont toujours détectés par le Premi®Test, mais plus par la méthode des 4 Boites.

- La méthode des 4 Boites, le Premi®Test et un test ELISA ont été utilisés pour détecter les résidus de sulfadiazine / triméthoprime chez la truite [5]. Les concentrations en résidus s'accumulent et atteignent un plateau à 5 jours. Au jour 15, des résidus sont toujours détectés par le Premi®Test et par le test ELISA, mais plus par la méthode des 4 Boites. Cette étude a montré que le Premi Test est plus sensible que la méthode des 4 boites pour la détection des résidus de sulfadiazine / triméthoprime dans la truite.

REIN

- Le Premi®Test a été évalué par rapport à une méthode microbiologique à 1 boite (test de diffusion en gélose) pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans le fluide rénal [6]. En résumé, le Premi®Test est capable de détecter une série d'antimicrobiens au niveau des Limites Maximales de Résidus (LMR) dans le liquide rénal, mais se révèle moins sensible que la méthode 1 Boite pour certains antimicrobiens comme les tétracyclines, les sulfamides, la fluméquine et la streptomycine. Toutefois, la méthode 1 Boite s'est révélée moins sensible que le Premi®Test pour la plupart des autres classes d'antimicrobiens.
- Trois méthodes microbiologiques de dépistage des antimicrobiens dans le jus de rein de boeuf et le sérum de boeuf ont été testés en parallèle en utilisant la pénicilline G, la sulfadiméthoxine, l'oxytétracycline, la tylosine, la danofloxacine, la streptomycine, la néomycine, et la spectinomycine : le FAST test, le Premi®Test et le KIS™ test [7]. Chaque test a donné un profil de détectabilité différent pour les différents antibiotiques, avec les plus grandes différences liées à la néomycine, qui a été mieux détectée par le FAST, et la pénicilline G, qui a été détectée à des niveaux inférieurs par le Premi®Test et le KIS™ test.
- Une méthode appelée NAT (Nouws antibiotic test) a été testée sur des échantillons de routine (plans de contrôle) et la performance de la méthode a été comparée à deux autres méthodes de dépistage: une méthode 5 Boites (STAR) et le Premi ® Test [8]. L'analyse de 591 échantillons a donné 4 résultats non conformes par rapport aux LMRs : 3 concernaient les tétracyclines, qui ont été détectés seulement avec le NAT et la méthode STAR, le quatrième contenait 172 µg kg^{-1} de sulfadiazine, qui a été détectée par les trois méthodes. Cette étude a conclu que le Premi®Test est moins sensible que les 2 autres méthodes pour la détection des tétracyclines dans le muscle. Les 3 méthodes ont détecté un échantillon contenant de la tulathromycine à 172 µg kg^{-1}, antibiotique qui n'a pas de LMR dans le muscle.
- Dans une autre étude, 3 tests rapides conçus pour analyser des échantillons pour la présence de résidus d'antibiotiques, le Fast Screen Test (FAST), le Premi®Test et le KIS™ test, ont été comparés en utilisant du jus de rein de bovin et des échantillons de sérum [9]. Des échantillons potentiellement contaminés de jus de rein bovin et du sérum ont été obtenus à partir de 235

carcasses qui avaient été retenues par les inspecteurs dans une usine de transformation pour des tests supplémentaires. En outre, des analyses en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) ont été effectuées sur ces échantillons afin d'identifier les antibiotiques présents et leurs niveaux. Les trois tests de dépistage ont détecté avec succès les 2 échantillons contenant des teneurs élevées en dihydrostreptomycine dans le jus de rein. Le Premi ® et KIST^{M} test ont détecté un échantillon contenant de la sulfaméthazine au dessus du niveau de tolérance des États-Unis pour les reins (à la fois rein et sérum), tandis que le FAST n'a pas. Le FAST a donné le moins de faux positifs (test positif, pas d'antibiotiques détectés par LC-MS/MS), mais semble être, en général, moins sensible que les deux autres tests de dépistage pour les antibiotiques détectés dans ces échantillons. Le KIS^{TM} test et le Premi ® avaient tous deux un nombre de faux positifs important dans cette étude, le Premi®Test dans le sérum, tandis que pour le KIS^{TM} ils sont distribués entre le rein et le sérum.

ŒUFS

- Lors d'une autre étude, les résidus de sulfadimidine ont été recherchés dans les œufs après administration d'un médicament aux poules pondeuses [10]. Le Premi®Test, une méthode des 4 Boites et la CLHP ont été utilisées pour détecter et confirmer les résidus de sulfadimidine. Les résultats positifs de la 4 Boites ont été confirmés par le Premi®Test. La présence de sulfadimidine a été détectée par la méthode des 4 Boites seulement 72 heures après la fin de l'administration, alors que la sulfadimidine a été détectée par le Premi®Test 8 jours après la fin du traitement. Les résultats du PremiTest étaient conformes avec ceux de la CLHP.
- Trois différents kits commerciaux pour le dépistage des sulfamides et d'autres antimicrobiens dans les œufs ont été validés conformément à la décision européenne CE/2002/657 [11]: un test ELISA multi-sulfamides et deux tests microbiologiques (le Premi®Test de r-Biopharm et le kit Explorer® de Zeu-Inmunotec) [12]. Les taux de faux positifs ont été inférieurs à 2% pour tous les kits. La sensibilité du test Premi® était meilleure que celle du test Explorer®, probablement en raison de la dilution des œufs avant l'essai Explorer®. Les valeurs de capacités de détection CCβ pour la plupart des sulfamides testé ont été satisfaisants avec le Premi®Test (≤ 100 µg kg^{-1} (LMR)). La participation avec le Premi®Test à un essai inter-laboratoires d'aptitude pour la détection des sulfamides dans les œufs a confirmé ces résultats. Les capacités de détection du Premi®Test pour la tétracycline et la doxycycline ont été au niveau de la LMR ou deux fois au maximum la LMR. Les capacités de détection pour la chlortétracycline et l'oxytétracycline sont plus élevées (de quatre à six fois la LMR). Les capacités de détection pour l'amoxicilline, la néomycine, la tylosine et l'érythromycine ont été inférieures à leurs LMRs respectives. Les capacités de détection pour les sulfamides ont été beaucoup plus faibles pour le kit ELISA que pour les tests microbiologiques. En conclusion, le test Explorer® et le Premi®Test pourraient être utilisés comme tests de dépistage large permettant la détection de la plupart des familles d'antimicrobiens dans les œufs.

Conclusion générale sur la synthèse bibliographique :

Une seule étude a pu être trouvée sur les muscles d'animaux de boucherie (ici lapin). Elle confirme que le Premi®Test est plus sensible pour les sulfamides que la 4 Boites ou une méthode 5 Boites, même si on fait précéder celles-ci d'une extraction du muscle par solvent.

Les autres études concernant le muscle de poisson, le rein et les œufs confirment la tendance des résultats données dans le cadre de l'étude initiale NF VALIDATION : bonne performance du Premi®Test pour les beta-lactames et les sulfamides, toujours plus sensible pour ces molécules que les méthodes Boites type méthode des 4 Boites ; moins bonne performance du Premi®Test pour la détection des tétracyclines.

Enfin, quelques soient les tests de dépistage des résidus d'antibiotiques, il n'existe pas de test à l'heure actuelle capable de détecter tous les résidus d'antibiotiques au niveau des LMRs.

2. Bilan des validations externes réalisées par d'autres organismes qu'AFNOR Certification (date, organisme, nature du protocole de validation, indication de la méthode de référence)

Le Premi®Test a obtenu la validation AOAC (AOAC Research Institute (RI)) le 16 Juin 2006 (Certificat n° 060601) (**Annexe 2**).

La société DSM a fourni le rapport de validation AOAC-RI au laboratoire expert.

Tableau 7. Résumé du certificat de validation AOAC.

Nom du kit	Premi®Test
Producteur du kit	DSM Nutritional Products
Numéro du catalogue	2860
Numéro de licence	60601
Date de certification originelle	16Juin 2006
Analytes	Pénicilline G
Matrices	Muscle bovin

Laboratoires indépendants :

- Dr. Sara Stead, Central Science Laboratory (CSL), Sand Hutton, York Y041 1LZ, England ;
- Dr. Steve Lehotay, USDA Agricultural Research Service (ARS), Eastern Regional Research Center, Microbial Biophysics and Residue Chemistry Research Unit, 600 East Mermaid Lane, Wyndmoor, PA 19038, USA.

Rapporteurs :

- Dr. Joe Boison, Canadian Food Inspection Agency, 116 Veterinary Road, S7N 2R3 Canada ;
- Dr. Michael Murphy, University of Minnesota.

Pour cette validation AOAC, il a été décidé d'évaluer le Premi®Test pour la détection des résidus de **pénicilline G** dans le **muscle de bovin**. La limite maximale de résidus (LMR) pour les résidus de pénicilline G dans le muscle bovin est de 50 µg kg^{-1}.
La validation AOAC n'utilise pas la comparaison avec une méthode de référence.
Une lecture optique avec le Premi®Scan a été réalisée. En effet, la lecture optique st nécessaire pour obtenir une validation AOAC. Un résumé des résultats de cette validation AOAC va être présenté ci-dessous.

Le contenu du rapport de validation est le suivant : objectifs de la méthode, définitions (sensibilité / spécificité / exactitude), principe du test, description des 4 parties de l'étude, résultats, conclusions et annexes.
Le protocole d'étude AOAC-RI nécessite l'utilisation de tissu musculaire supplémentés et naturellement chargés. Les différentes étapes de la validation ont été menées au CSL, chez DSM et à l'USDA.
Pour la pénicilline G, les paramètres de performance suivants ont été déterminés dans les laboratoires suivants:

Tableau 8. Résumé des paramètres de performance du Premi®Test pour la pénicilline G obtenus dans cette étude.

Table 1: Summary of performance parameters of Premi®Test for penicillin G obtained in the study

Laboratory	Study	Performance Pen G (ppb)	Remarks
CSL	Part 1: 6 out of 6	10	A range of 5 different concentrations from 0 – 50 ppb was tested. At 10 ppb, all 6 of 6 samples analysed tested positive.
USDA	Part 2: 30 out of 30	10	Results confirmed that the detection sensitivity of the PremiTest for pen G was 10 ppb with 95% confidence level
DSM	Part 3: Ruggedness, interference, cross-reactivity	10	The presence of other antimicrobial drugs did not interfere with the PremiTest kits ability to detect pen G residues at a concentration of 10 ppb added to bovine muscle tissue.
USDA	Part 4: Incurred tissue	10	The detection sensitivity determined using fortified tissue samples was further confirmed using incurred bovine muscle tissues. PremiTest was able to detect all pen G residues in incurred samples containing pen G at concentrations greater than or equal to 12 ppb .

Tableau 9. Résumé des échantillons et des concentrations utilisées pour évaluer la sensibilité de détection du Premi®Test pour la pénicilline G dans les différentes phases de la validation.

Part of the Study	Antibiotics	Concentration (ppb)	# of samples
1	Zero Control	0	4
	Penicillin G	0.5	6
		5	6
		10	6
		25	6
		50	6
2	Zero Control	0	20
	Penicillin G	10	30
3	Zero Control	0	20
	Penicillin G	10	30
4 *	Zero control	0	3
	Penicillin G	3.5	2
		6	2
		12	2
		20	2
		50	2

*) Study was repeated daily for 6 days. The total number of samples must therefore be multiplied by six.

- La première partie de cette étude a été menée au Central Science Laboratory (CSL), laboratoire indépendant. Sur la base de leurs résultats obtenus sur des muscles de bovin supplémentés (6 réplicats par concentration), la sensibilité de détection pour les résidus de pénicilline G dans les muscles de bovin a été définie à 10 µg kg^{-1}.
- La deuxième partie de l'étude a été menée à l'USDA et chez DSM, laboratoire indépendant. Leurs résultats obtenus sur des muscles de bovin supplémentés (30 réplicats à 10 µg kg^{-1}) ont confirmé la sensibilité de détection pour les résidus de pénicilline G dans les muscles de bovin a été définie à 10 µg kg^{-1}.Toutefois, un échantillon négatif a été testé positif (faux-positif) lors de l'étude réalisée chez DSM. Aucun faux-positif ni aucun faux-négatif n'a été obtenu lors de l'étude à l'USDA.

Tableau 10. Résultats de la lecture au canner pour confirmer la sensibilité de détection du Premi®Test à 10 µg kg^{-1} pour la pénicilline G.

Zero control			
Sample		Sample	
	Interpreted Scanner Results		Interpreted Scanner Results
1	NEG	9	NEG
2	NEG	10	NEG
3	NEG	11	NEG
4	NEG	12	NEG
5	NEG	13	NEG
6	NEG	14	NEG
7	POS	15	NEG
8	NEG		
Penicillin G 10 ppb			
Sample	Interpreted Scanner Results	Sample	Interpreted Scanner results
1	POS	16	POS
2	POS	17	POS
3	POS	18	POS
4	POS	19	POS
5	POS	20	POS
6	POS	21	POS
7	POS	22	POS
8	POS	23	POS
9	POS	24	POS
10	POS	25	POS
11	POS	26	POS
12	POS	27	POS
13	POS	28	POS
14	POS	29	POS
15	POS	30	POS

- La troisième partie de l'étude a été menée chez le producteur du test (DSM). Ils ont déterminé la robustesse, les interférences et les réactions croisées.
  - Robustesse : Ni les différents lots de Premi®Test, ni les différentes dates de validité, n'ont eu d'effet sur les résultats attendus du test (positif ou négatif). Il adonc été conclu que le Premi®Test est produit de façon reproductible et que le test donnera toujours les résultats escomptés à la limite de détection et sur des échantillons réellement négatifs. Quand on fait varier la température du muscle à laquelle le jus est extrait, le volume de jus déposé sur l'ampoule, la façon dont le jus est extrait du tissu (pressage) et la température d'incubation les résultats attendus ne sont pas affectés. Les facteurs qui influencent les résultats du test sont :
    - L'âge de l'échantillon: l'échantillon doit être testé dans les 48 h pour éviter la perte d'activité antimicrobienne.
    - Viandes hachées: risque accru de faux positifs et négatifs dus à l'activité enzymatique. D'ailleurs, il est impossible d'obtenir des jus de viande hachée.

Tableau 11. Facteurs qui influencent le résultat du Premi®Test.

Sample age						
Replicate	Blank			PenG 10 ng/g		
Fresh beef						
	Visual	Scanner	Result	Visual	Scanner	Result
1	Y	-7.24	NEG	P	7.67	POS
2	Y	-7.29	NEG	P	10.27	POS
3	Y	-6.52	NEG	P	10.93	POS
Beef stored 72 h at 7°C (45°F)						
	Visual	Scanner	Result	Visual	Scanner	Result
1	Y	-8.25	NEG	Y	-5.23	NEG
2	Y	-6.92	NEG	Y	-5.46	NEG
3	Y	-8.26	NEG	Y	-4.80	NEG
Sample Type						
Whole Tissue						
Replicate	Blank			PenG 10 ng/g		
	Visual	Scanner	Result	Visual	Scanner	Result
1	Y	-7.24	NEG	P	7.67	POS
2	Y	-7.29	NEG	P	10.27	POS
3	Y	-6.52	NEG	P	10.93	POS
Minced (Homogenized)						
	Visual	Scanner	Result	Visual	Scanner	Result
1	Y	-5.90	NEG		3.88	POS
2	Y	-2.75	NEG		2.96	POS
3	Y	-6.70	NEG		-4.13	NEG

- Interférences : Leurs résultats obtenus sur des muscles de bovin supplémentés ont montré que les antibiotiques testés n'interfèrent pas avec la détection de la pénicilline G à 10 µg kg^{-1} dans les muscles de bovin.
- Réactions croisées : Echantillons de muscle bovin supplémentés :

Tableau 12. Etudes de réactions croisées. Effet d'autres médicaments vétérinaires sur la détection avec le Premi®Test.

Antimicriobial Class	Specific drug	100 ppb	50 ppb	10 ppb
ß-lactams	Amoxicillin	+	+	+
	Ampicillin	+	+	+
	Ceftiofur			
	Cephapirin	+	+	
	Cloxacillin	+		
Tetracyclines	Chlortetracycline	+		
	Doxycycline			
	Tetracycline	+		
Aminoglycosides	Dihydrostreptomycin			
	Gentamycin			
	Neomycin			
	Streptomycin			
Macrolides	Erythromycin	+	+	
	Tilmicosin	+	+	
	Tylosin	+	+	
Glycopeptides	Bacitracin			
	Lincomycin			
	Virginiamycin	+		
Sulfonamides	Sulfanilamide			
	Sulfadiazin	+		
	Sulfamethoxin	+		
	Sulphamethazin			
	Sulfathiazole	+		
Ionophores	Monensin			
	Lasalocid			
	Salinomycin			
Miscellaneous	Lactic acid			
	Oxytocin			
	Phenylbutazone			
	Flunixin			
	Dipyrone			
	Chloramphenicol			
	Dapsone	+	+	+

+ = positive reponse of Premi®Test at this level

- La quatrième partie de l'étude a été menée à l'USDA sur des reins et des muscles de bovin issus d'animaux naturellement chargés en pénicilline G (après traitement antibiotiques). Leurs résultats ont montré que le Premi®Test est capable de détecter la pénicilline G à des concentrations égales ou supérieures à 12 µg kg^{-1}.

Tableau 13. Résultats de la pénicilline G détectée avec le Premi®Test dans des échantillons de muscle bovin naturellement chargés.

Concentrations (ppb)	Coded Sample Number	Beef muscle Readings	Result
0	A1	-10.23	NEG
0	B1	-10.10	NEG
0	C1	-10.06	NEG
3.5	A2	-9.4	NEG
3.5	B2	-10.18	NEG
6	A3	-5.28	NEG
6	B3	-2.05	NEG
12	A4	6.8	POS
12	B4	5.57	POS
20	A5	7.17	POS
20	B5	6.94	POS
50	A6	7.33	POS
50	A7	7.11	POS

Conclusions du rapport :

- Les résultats montrent que le Premi®Test remplit toutes les conditions requises pour cette étude de validation AOAC pour la détection des résidus de pénicilline G dans les tissus musculaires de l'espèce bovine. Les résultats montrent également qu'il existe une réactivité croisée avec de nombreux d'autres composés antimicrobiens. Le Premi ® Test est un test de dépistage à large spectre qui permet de détecter de nombreux antimicrobiens pertinents dans la viande.
- Le Premi®Test est capable de détecter les résidus de pénicilline G dans des muscles de bovin artificiellement **contaminés** à **10 µg kg^{-1}** avec un niveau de confiance de 95%.
- Il a été confirmé que le Premi®Test est également capable de détecter des résidus de pénicilline G dans des muscles de bovin **naturellement chargés** à des concentrations supérieures ou égales à **12 µg kg^{-1}** avec un niveau de confiance de 95%.
- Le Premi®Test présente des réactions croisées avec les médicaments suivants à un niveau de **100 µg kg^{-1}** :
  - β-lactamines: amoxicilline, ampicilline, céphapirine, cloxacilline ;
  - Tétracyclines: chlortétracycline, tétracycline ;
  - Macrolides: érythromycine, tylosine, tilmicosine ;
  - Glycopeptides: Virginiamycine ;
  - Sulfamides: sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfathiazol ;
  - Divers: dapsone.
- Le Premi®Test présente des réactions croisées avec les médicaments suivants à un niveau de **50 µg kg^{-1}** :
  - β-lactamines: amoxicilline, ampicilline, céphapirine ;
  - Macrolides: Tilmicosine, érythromycine, tylosine ;
  - Divers: Dapsone.

- Le Premi®Test présente des réactions croisées avec les médicaments suivants à un niveau de **10 µg kg^{-1}** :
  - β-lactamines : amoxicilline, ampicilline ;
  - Divers: Dapsone.

Tableau 14. Résumé des limites de détection (réactions croisées).

	100 µg kg^{-1}	**50 µg kg^{-1}**	**10 µg kg^{-}**
β-lactamines	cloxacilline	céphapirine	amoxicilline ampicilline
Tétracyclines	chlortétracycline tétracycline		
Macrolides		tilmicosine érythromycinetylosine	
Sulfamides	sulfadiazine sulfadimethoxine sulfathiazol		
Glycopeptides	virginiamycine		
Divers			dapsone

- La pénicilline G à 10 µg kg^{-1} n'est pas maquée en présence d'autres médicaments ou composés.
- Les performances du Premi®Test n'est pas affectée par les facteurs opératoires suivants :
  - Température de l'échantillon : 4 vs 20°C (39 vs 68 °F) ;
  - Quantité de l'échantillon : 75 vs 125 µl (recommandé : 100 µl) ;
  - Pressage partiel ou entier;
  - Température d'incubation 63 vs 65°C (145 º F vs.149) (recommandé: 64°C / 147°F).
- Les résultats confirment les critères de sélectivité définis dans le protocole d'étude AOAC Research Institute.

5. UN BILAN DES RECLAMATIONS UTILISATEURS

3 réclamations de clients ont été transmises au laboratoire expert par le fournisseur, concernant un lot identique de Premi®Test (lot 07H15/16) (cf. annexes 3a à 3c).

Ces réclamations, datant de 2007, ont été portées sur une baisse de sensibilité du Premi®Test vis-à-vis des sulfamides et en particulier de la sulfadiazine. La raison était un changement au niveau de la production sur la quantité de lot fabriquée. En effet, la quantité fabriquée avait été doublée sur ce lot,

donc le temps de remplissage des ampoules à l'usine était plus long. Les spores étaient donc maintenues plus longtemps à une température élevée et cela a eu un effet négatif sur la détection des sulfamides.

Après vérification sur des échantillons de ce lot, DSM a constaté un problème de stabilité de 25 % de la production de ce lot de Premi®Test, dû à ce changement dans la production. Ce problème de stabilité a entrainé une moins bonne sensibilité particulièrement pour la sulfadiazine.

DSM a pris une action corrective : Ne plus produire des lots en aussi grande quantité en revenant à l'ancien procédé de fabrication. De plus, un courrier a été envoyé aux 3 clients, ainsi qu'un nouveau lot de Premi®Test.

Cette réclamation n'a pas remis en cause les performances générales des kits.

Cette réclamation n'a pas donné lieu à des modifications du protocole, ou à des exclusions de matrices.

6. UN ETAT DES MODIFICATIONS INTERVENUES DEPUIS LA PRECEDENTE VALIDATION

- Le référentiel technique utilisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION a été validé en 2005 (révision 0, validée le 10/05/2005). Ce référentiel est spécifiquement adapté aux méthodes de détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires. Donc la validation initiale obtenue en Juin 2006 a été réalisée selon ce référentiel, qui n'a subi aucune modification depuis.
- Aucune modification n'est intervenue dans la méthode alternative depuis la première validation. Pas de demande d'extension.
- La méthode de référence a été partiellement modifiée.

Conséquences sur la sensibilité de la méthode ?

Si on reprend les résultats de la certification NF VALIDATION initiale de 2006, réalisée avec l'ancienne méthode de référence (MR), on observe que :

- Lors de la phase 1, le Premi®Test dans les jus de viande supplémentés détectaient 100 % des échantillons supplémentés à la ½ LMR en amoxicilline et ceftiofur, à la LMR en tylosine, à 2*LMR en sulfamethazine.
- Lors de la phase 2, l'amoxicilline à 270 µg kg^{-1} (LMR = 50) dans des muscles de porc naturellement chargés était détectée 5 fois sur 5 par la méthode des 4 Boites, 5 fois sur 5 avec le Premi®Test et la tylosine à 750 µg kg^{-1} (LMR = 100) était détectée 1 fois sur 5 par la méthode des 4 Boites, 5 fois sur 5 avec le Premi®Test. OTC (LMR = 100) et sulfadimethoxine (SDMX) (LMR = 100) à respectivement 760 et 150 µg kg^{-1}étaient détectés 5 fois sur 5 par les 2 méthodes.

- Lors de la phase 3, sur des échantillons terrain, le Premi®Test présentait une meilleure détection des Bétalactamines essentiellement et parfois des Sulfamides. Par contre on avait observé une meilleure détection de certaines tétracyclines pour la méthode des 4 boîtes.
- Lors de l'essai inter-laboratoires, 53 % labos détectaient le ceftiofur à 800 µg kg^{-1} (0.8*LMR), 100 % des labos la sulfamethazine à 4*LMR, 100 % des labos la tylosine à 2*LMR et 83 % des labos la tylosine à la LMR dans des jus de viande supplémentés.

Tableau 15. Résumé des résultats de la validation initiale en 2006 (ancienne MR).

Phase 1	**Premi®Test**	**Méthode de référence**
Echantillons testés	jus de viande supplémentés	/
Détection	100 % des échantillons supplémentés : - à la ½ LMR en amoxicilline et ceftiofur, - à la LMR en tylosine, - à 2*LMR en sulfamethazine	/
Phase 2	**Premi®Test**	**Méthode de référence**
Echantillons testés	muscles de porc naturellement chargés	muscles de porc naturellement chargés
Détection	- amoxicilline à 270 µg kg^{-1} (LMR = 50) détectée 5 fois sur 5 - tylosine à 750 µg kg^{-1} (LMR = 100) détectée 5 fois sur 5. - OTC (LMR = 100) et sulfadimethoxine (SDMX) (LMR = 100) à respectivement 760 et 150 µg kg^{-1} détectés 5 fois sur 5	- amoxicilline à 270 µg kg^{-1} (LMR = 50) détectée 5 fois sur 5, - tylosine à 750 µg kg^{-1} (LMR = 100) détectée 1 fois sur 5 - OTC (LMR = 100) et sulfadimethoxine (SDMX) (LMR = 100) à respectivement 760 et 150 µg kg^{-1} détectés 5 fois sur 5
Phase 3	**Premi®Test**	**Méthode de référence**
Echantillons testés	échantillons terrain	échantillons terrain
	- meilleure détection des Bétalactamines essentiellement et parfois des Sulfamides.	- meilleure détection de certaines tétracyclines
Essai inter-laboratoires	**Premi®Test**	**Méthode de référence**
Echantillons testés	jus de viande supplémentés	/
	- 53 % labos détectaient le ceftiofur à 800 µg kg^{-1} (0.8*LMR), - 100 % la sulfamethazine à 4*LMR, - 100 % la tylosine à 2*LMR - 83 % la tylosine à la LMR	/

Les conclusions globales de l'étude NF VALIDATION initiale de 2006 étaient que la sensibilité de la méthode des 4 Boites était parfois insuffisante pour certains antibiotiques (**amoxicilline et surtout tylosine**), par contre la sensibilité était meilleure pour les tétracyclines.

Nouvelle version de la méthode des 4 Boites :

Auparavant, la méthode des 4 Boites n'avait pas été validée selon des critères de performance. Cette nouvelle boite MI7.4, ainsi que les 3 autres ont à présent été validées pour les muscles de bovin, ovin, porcin et volaille.

Résumé de la validation de la nouvelle méthode des 4 Boites :

La méthode des 4 Boites a été validée suivant la décision européenne EC/2002/657 [11].

Les caractéristiques de performance suivantes ont été déterminées, à partir d'un nombre d'échantillons suffisant (statistiquement significatif) :

- Spécificité (47 échantillons blancs de muscle bovin),
- Capacités de détection (60 échantillons de muscle bovin par antibiotique validé, échantillons de muscle broyés, supplémentés, puis congelés),
- Applicabilité à différentes espèces animales (30 échantillons blancs de muscle ovin, porcin et dinde),
- Robustesse (influence de variations mineures et délibérées de paramètres expérimentaux).

Les résultats qui vont nous intéresser dans ce rapport sont les capacités de détection (ou CCβ).

Les résultats suivants ont été obtenus sur des tissus simulés, c'est-à-dire de la viande broyée, supplémentée, puis congelée. Ensuite, des rondelles de viande étaient déposées sur les boites, comme pour l'usage en routine de cette méthode.

Tableau 16. Antibiotiques validés, concentrations correspondantes et boites spécifiques pour la validation de la nouvelle MR.

Groupes	Boite spécifique	Analytes testés - [C] en µg/kg	LMR [C] en µg/kg
Céphalosporines	Bs6	Cefalonium - 100	-
	MI7.4	**Cefalexine - 200**	**200**
Pénicillines	Bs6	Penicilline G - 25	50
	MI7.4	**Amoxicilline - 50**	**50**
	Bs6	Cloxacilline - 600	300
	MI7.4	**Oxacilline - 150**	**300**
Sulfamides	**MI7.4**	**Sulfadiazine - 500**	**100**
	MI7.4	**Sulfadiméthoxine - 500**	**100**
Aminoglucosides	Bs8	DHS - 10 000	500
Quinolones Fluoroquinolones	Bs6	Flumequine - 500	200 or 400
	Bs8	Enrofloxacine - 200	100
Tétracyclines	Bs6	OTC - 200	100
	Bs6	CTC - 50	100
Macrolides	MI8	Erythromycine - 500	200
	MI7.4	**Tylosine - 1000**	**100**

- La boite Bs6 n'a pas été modifiée dans cette version 5 de la méthode des 4 Boites, donc ni la détection des tétracyclines sur Bs6, ni la détection des beta-lactamines sur cette même boite (c'est-à-dire pénicilline G, cloxacilline, dicloxacilline et 6 céphalosporines dont le cefalonium) n'ont été modifiées. De même, les sensibilités des boites Bs8 et MI8 n'ont pas variées puisque les boites n'ont pas été modifiées.
- Dans cette nouvelle version de la méthode des 4 Boites (version 5), seule la boite Bs7.4 a été remplacée par MI7.4. Donc, seule la sensibilité par rapport aux sulfamides, à certaines beta-lactamines (ampicilline, amoxicilline, oxacilline, ceftiofur, cefalexine et cefquinome) et à la tylosine aurait pu être modifiée et remettre en cause la comparaison avec la méthode des 4 Boites et le Premi®Test.
- Avec l'ancienne MR, la boite Bs7.4 n'était pas la boite spécifique pour la détection de l'amoxicilline, c'était la boite MI8. La capacité de détection de la boite MI8 pour l'amoxicilline a été validée en parallèle avec la détermination de la capacité de détection de la nouvelle boite MI7.4. Les résultats suivants (Tableau 17) ont été obtenus en supplémentant des muscles broyés de bovin avec de l'amoxicilline à 50 µg/kg (LMR).

Tableau 17. Comparaison de la sensibilité de MI8 et MI7.4 pour l'amoxicilline.

Boites	MI8	MI7.4
Nombre de résultats négatifs* / nombre total d'échantillons analysés	5 - / 30 = 17 %	5 - /65 = 8 %

**Résultats négatifs : Zone d'inhibition inférieure à 2 mm.*

Donc, la sensibilité de la méthode des 4 Boites via la boite MI7.4 est légèrement meilleure que celle de la boite MI8, mais le CCβ est resté fixé à la LMR (50 µg/kg), donc identique entre l'ancienne MR et la nouvelle MR.

Le tableau suivant présente les capacités de détection obtenues pour 15 antibiotiques validés sur les 4 Boites.

Tableau 18. Détermination des capacités de détection (ou CCβ).

Groupes	Boite spécifique	Analytes - [C] en µg/l	Nombre de résultats positifs (sur 60 analyses)	CCβ en µg/kg	CCβ / LMR
Céphalosporines	Bs6	Cefalonium - 100	60 +	75 à 100	< LMR
	MI7.4	**Cefalexine - 200**	**60 +**	**150 à 200**	**< LMR**
Pénicillines	Bs6	Penicilline G - 25	60 +	25	< 1/2 LMR
	MI7.4	**Amoxicilline - 50**	**60 +**	**30 à 50**	**< LMR**
	Bs6	Cloxacilline - 600	57 + / 3-	750	2,5 LMR
	MI7.4	**Oxacilline - 300**	**60 +**	**150 à 300**	**< LMR**
Sulfamides	**MI7.4**	**Sulfadimethoxine - 750**	**54 + / 6-**	**> 750**	**> 7,5 LMR**
	MI7.4	**Sulfadiazine - 600**	**52 + / 8-**	**> 600**	**> 6 LMR**
Aminoglucosides	Bs8	DHS - 10 000	0 + / 15-	> 10 000	> 20 LMR
Quinolones Fluoroquinolones	Bs6	Flumequine - 500	59 + / 1-	500	1,5 to 2 LMR
	Bs8	Enrofloxacine - 250	60 +	200 à 250	≈ LMR
Tétracyclines	Bs6	OTC - 200	58 + / 2-	200	2 LMR
	Bs6	CTC - 100	60 +	50 à 100	< LMR
Macrolides	MI8	Erythromycine - 600	60 +	500 à 600	3 LMR
	MI7.4	**Tylosine – 1000**	**60 +**	**1000**	**10 LMR**

Les capacités de détection CCβ pour 2 sulfamides (sulfadimethoxine (SDMX), sulfadiazine), 3 beta-lactamines (amoxicilline, oxacilline et cefalexine) et la tylosine ont été estimées comme suit sur la boite MI7.4 : SDMX > 750 µg kg^{-1} (LMR = 100 µg kg^{-1}), sulfadiazine > 600 µg kg^{-1} (LMR = 100 µg kg^{-1}), cefalexine 200 µg kg^{-1} (LMR = 200 µg kg^{-1}), amoxicilline < 50 µg kg^{-1} (LMR = 50 µg kg^{-1}), oxacilline 300 µg kg^{-1} (LMR = 300 µg kg^{-1}) et tylosine 1000 µg kg^{-1} (LMR = 100 µg kg^{-1}).

De plus, 3 antibiotiques détectés sur MI7.4 ne sont pas intervenus dans la comparaison lors de la validation initiale en 2006 : cefalexine, oxacilline et sulfadiazine. Nous n'allons donc pas les étudier ici. Il reste 3 antibiotiques de 3 familles différentes à comparer (Tableau 19).

Tableau 19. Comparaison des résultats de la validation de la nouvelle MR et des résultats de la validation initiale (2006) pour l'ancienne boite Bs7.4 et la nouvelle boite MI7.4.

	Validation CCβ 2009 Nouvelle MR			Validation initiale 2006	
Groupes	**Analytes - [C] en µg/kg**	**Nombre de +**	**CCβ en µg/kg**	**Ancienne MR**	**Premi®Test**
Pénicillines	**Amoxicilline - 50**	60+	30 à 50	amoxicilline à 270 µg kg^{-1} (LMR = 50) : 4 sur 5	Détection : 25 µg kg^{-1} (5 sur 5) amoxicilline à 270 µg kg^{-1} (LMR = 50) : 5 fois sur 5
Sulfamides	**Sulfadimethoxine - 750**	54 + / 6-	> 750	OTC (LMR = 100) et SDMX (LMR = 100) à respectivement 760 et 150 µg kg^{-1} : 5 fois sur 5	OTC (LMR = 100) et SDMX (LMR = 100) à respectivement 760 et 150 µg kg^{-1} : 5 fois sur 5
Macrolides	**Tylosine – 1000**	60+	1000	tylosine à 750 µg kg^{-1} (LMR = 100) : 1 fois sur 5	Détection : 100 µg kg^{-1} (5 sur 5) tylosine à 750 µg kg^{-1} (LMR = 100) : 5 fois sur 5.

Si on compare les résultats de validation de 2009 avec ceux obtenus en 2006, on remarque que :

- la méthode des 4 Boites présente toujours un défaut de détection de certains sulfamides (> 7.5*LMR). Pour la sulfadimethoxine, on a trouvé en 2009 sur MI7.4 un CCβ légèrement supérieur à 750 µg/kg. Or en 2006, lors de la validation initiale, la boite Bs7.4 était capable de détecter la SDMX à 760 µg/kg (5 fois sur 5). **Donc, la sensibilité de la boite MI7.4 n'a pas été améliorée par rapport à celle de Bs7.4 pour la sulfadimethoxine et le changement de boite ne remet pas en cause l'étude de comparaison 4 Boites/Premi®Test réalisée en 2006 dans le cadre de la marque NF VALIDATION**. De plus, le Premi®Test est aussi capable de détecter la SDMX à 760 µg/kg (5 fois sur 5).
- la méthode des 4 Boites présente toujours un défaut de détection de la tylosine (10*LMR nouvelle version / > 7.5 LMR en 2006). Or le Premi®Test est capable de détecter la tylosine au minimum à 2*LMR (200 µg/kg) (100 % des laboratoires dans l'étude interlaboratoire) et même à la LMR (100 µg/kg) (phase 1). **Donc, la sensibilité de la boite MI7.4 n'a pas été améliorée par rapport à Bs7.4 pour la tylosine et ce changement ne remet pas en cause l'étude de comparaison 4 Boites/Premi®Test réalisée en 2006 dans le cadre de la marque NF VALIDATION**. La MA reste plus sensible que la MR pour la tylosine.
- **NB :** Dans la précédente version du rapport, il y avait une erreur. Il était écrit : « L'amoxicilline a été validée pour cette nouvelle version de la méthode des 4 Boites, mais elle est détectée sur la boite Bs6, qui n'a pas été modifiée et non sur MI7.4, donc sa capacité de détection n'a pas changée ». En fait, l'amoxicilline est détectée préférentiellement sur MI7.4 pour cette nouvelle version de la méthode. La sensibilité de cette boite pour l'amoxicilline a été légèrement améliorée par rapport à MI8 (Bs7.4 ne détectait pas l'amoxicilline) (pourcentage

de faux-négatifs légèrement diminué). Toutefois, le CCβ déterminé lors de la validation en 2009 est de 50 µg/kg et même CCβ de 50 µg/kg sur MI8. Toutefois, le seuil de détection du Premi®Test pour l'amoxicilline est au minimum de 25 µg/kg. Donc si on comparait à présent la nouvelle MR et la MA, on conclurait que les 2 méthodes ont des seuils de détection équivalents et donc l'exactitude relative serait très bonne, et même la MA reste plus sensible que la MR pour l'amoxicilline, comme c'était le cas avec la boite Bs7.4. **Donc, ce changement ne remet pas en cause l'étude de comparaison 4 Boites/Premi®Test réalisée en 2006 dans le cadre de la marque NF VALIDATION**.

En conclusion, le laboratoire expert après étude des résultats de validation de 2006 et de validation de la méthode des 4 Boites nouvelle version de 2009 a conclu que le changement de boite a eu une influence mineure sur la sensibilité de la méthode de référence (équivalence des anciennes et nouvelles versions) et n'a **pas eu d'impact sur la comparaison** des performances de la méthode alternative par rapport à celles de la méthode de référence.

7. UNE PRESENTATION DES MODIFICATIONS EVENTUELLES ENVISAGEES DANS LA METHODE ALTERNATIVE

Aucune modification dans la méthode alternative n'est envisagée.
Les réactifs et le protocole de la méthode alternative ne changent pas.

8. UN PROJET DE COMPLEMENT D'ETUDE DE VALIDATION SI NECESSAIRE

Etant donné les éléments présentés ci-dessus :

- Aucune modification dans le référentiel de certification de la marque NF VALIDATION, dans la méthode alternative,
- Aucune réclamation, aucun article publié ni aucune validation externe ne remettent en cause les performances de la méthode alternative,
- Modification de la méthode de référence sans conséquences sur la comparaison des performances de la méthode de référence et de la méthode alternative,

Aucun complément d'étude n'est envisagé par le laboratoire expert pour reconduire la certification NF VALIDATION **du Premi®Test.**

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] R Bogaerts, F Wolf. 1980. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat, Die Fleischwirtschaft, 60, 672-674.

[2] V Gaudin, M Juhel-Gaugain, JP Moretain and P Sanders. 2008. AFNOR validation of Premi_Test, a microbiological-based screening tube-test for the detection of antimicrobial residues in animal muscle tissue. Food Additives and Contaminants. 25 (12) 1451-1464.

[3] I Kozarova, J Janosova, D Mate and S Tkacikova. 2009. Evaluation of three different microbial inhibition tests for the detection of sulphamethazine residues in the edible tissues of rabbit. Food Additives and Contaminants 26 (7) 978–987.

[4] B Kilinc, C Meyer & V Hilge. 2007. Evaluation of the EEC four-plate test and Premi test for screening antibiotic residues in trout (Salmo trutta) International Journal of Food Science and Technology 42, 625–628.

[5] B Kilinc, S Cakli. 2008. Screening for antibiotic residues in the trout by the Four Plate test, Premi test and ELISA test. Eur Food Res Technol. 226:795–799.

[6] H. CANTWELL & M. O'KEEFFE. 2006. Evaluation of the Premi®Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney. Food Additives and Contaminants 23(2): 120–125.

[7] Marilyn J. Schneider & Steven J. Lehotay. 2008. A comparison of the FAST, Premi® and KIS™ tests for screening antibiotic residues in beef kidney juice and serum. Anal Bioanal Chem. 390 1775-1779.

[8] MG Pikkemaat, MLBA Rapallini, Soostra-van Dijk, JWA Elferink. 2009. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. Analytica Chimica Acta 637 298–304.

[9] MJ Schneider, K Mastovska, SJ Lehotay, AR Lightfield, B Kinsella, CE Shultz. 2009. Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. Analytica Chimica Acta 637 290–297.

[10] S Marcincak, K Hussein, D Mate, I Kozarova, J Sokol, N Zdolec. 2006. Premi Test - a screening test for detecting sulphadimidine residues in eggs of laying hens. Medycyna Weterynaryjna 62 (2) 159-161.

[11] Décision de la Commission Européenne CE/2002/657 du 12 Aout 2002 implementing la Directive Européenne 96/23/EC concernant la performance des méthodes analytiques et l'interprétation des résultats. Journal Officiel de la Communauté Européenne. L 221: 8-36.

[12] V Gaudin, C Hedou, A Rault, P Sanders and E Verdon. 2009. Comparative study of three screening tests, two microbiological tube tests, and a multi-sulphonamide ELISA kit for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs. Food Additives and Contaminants 26 (4) 427–440.

10. ANNEXES

Annexe 1a. Notice à la date de Juin 2006.

Premi®Test AFNOR Validation

DSM - 28/1 - 06/06
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFAQ AFNOR Certification - www.afnor.org
Fin de validité : 30 août 2010

Test standardisé pour la détection de substances antimicrobiennes dans la viande (validé AFNOR), le poisson, les œufs, les reins, l'urine, le sang et l'alimentation animale . La marque AFNOR VALIDATION porte sur les viandes de bovin, de porc et de volaille. Notice 0609

Contenu du coffret
25 ampoules contenant du *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* enrobé dans un excipient solide de gélose, embouts de seringue jetables, film de protection perforé + seringue doseuse.

Description du produit
Premi®Test est un test de détection microbiologique à large spectre, spécialement mis au point pour la détection, dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs, de la présence de substances antimicrobiennes telles que les résidus d'antibiotiques ou de sulfamides. à un niveau égal ou inférieur à la plupart des LMR (limite maximale de résidus).

Principe du test
Premi®Test est basé sur l'inhibition du développement de *Bacillus stearothermophilus*, un micro-organisme très sensible à de nombreux résidus d'antibiotiques et de sulfamides.
Un nombre standardisé de spores est enrobé dans un excipient de gélose contenant des nutriments sélectionnés. Lorsque le jus de viande aura été ajouté dans l'ampoule de Premi®Test et mis en incubation à 64°C, les spores vont germer. Ces spores germés vont se multiplier et acidifier le milieu **en l'absence** de substances inhibitrices. Ce qui se traduira par un changement de couleur de l'indicateur qui virera du violet au jaune.
Si les résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection), le germe test ne se développera pas et la couleur restera violette.
DSM Premitest vous propose des procédures de prélèvements d'échantillons d'œufs, de reins, d'urine, de sang et d'alimentation animale.

Précautions à prendre
Ce test est *extrêmement* sensible aux antibiotiques et autres substances inhibitrices : il faut donc éviter tout risque de contamination par de telles substances. Il est conseillé de bien se laver les mains avant le test et de se les sécher avec du papier absorbant ou une serviette propre.

Utilisation
- ⇒ Bien se laver les mains avant de commencer le test.
- ⇒ Découper le nombre d'ampoules nécessaires avec une paire de ciseaux sans abîmer le film d'aluminium qui protège les ampoules voisines.
- ⇒ Enlever prudemment le film de protection recouvrant le nombre d'ampoules souhaitées (ne pas ouvrir plus d'ampoules que nécessaire).
- ⇒ Prendre environ 2 cm³ de viande maigre et utiliser une presse-viande pour en extraire environ 250 µl de jus de viande. Il est également possible d'obtenir du jus de viande à l'aide du Multipress ou en faisant congeler/décongeler la viande. (Un bulletin technique concernant le Multipress est disponible au www.premitest.com).
- ⇒ Utiliser un nouvel embout jetable de seringue pour chaque prélèvement.
- ⇒ Pipeter dans l'embout 100 µl de jus et le verser sur la gélose, sans la toucher.
- ⇒ Laisser à température ambiante pendant 20 minutes pour une pré-incubation.
- ⇒ Éliminer le jus de viande en remplissant puis en vidant deux fois de suite l'ampoule de test avec de l'eau déminéralisée. **Laver absolument à l'EAU DEMINERALISEE (pas d'eau du robinet!)**
- ⇒ Il est important d'éliminer soigneusement le restant d'eau de l'ampoule.
- ⇒ Fermer l'ampoule de test avec le film fourni pour éviter l'évaporation.
- ⇒ Faire incuber l'ampoule de test dans un incubateur Premi®Test ou au bain-marie (64°C ± 0.5°C).
- ⇒ Il est **FORTEMENT RECOMMANDE** de faire parallèlement un témoin négatif **par espèce**. Lire les résultats du test lorsque le témoin négatif aura changé de couleur (environ 3 heures).
- ⇒ Tout le matériel nécessaire (presse-viande, ciseaux, thermomètre, incubateur, pipette et minuteur) est disponible dans le Starterkit Premi®Test.
- ⇒ Pour faciliter une bonne utilisation du Premi®Test un document PowerPoint est à la disposition des utilisateurs.

Lecture des résultats du test
- ⇒ Lire la couleur uniquement sur les deux tiers inférieurs de l'ampoule.
- ⇒ Un changement de couleur évident (du violet au jaune) indique une absence d'antibiotiques / sulfamides à une concentration supérieure au seuil de détection.
- ⇒ S'il n'y a aucun changement de couleur évident, cela indique une présence d'antibiotiques et/ou de sulfamides à une concentration supérieure ou égale au seuil de détection du test. Les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification.

Témoin négatif :
Utilisation d'un témoin négatif **par espèce FORTEMENT RECOMMANDE (voire OBLIGATOIRE pour le protocole validé AFNOR).** Lire quand le témoin négatif vire au jaune. Une lecture trop tardive entraine une diminution de la sensibilité du test! (le témoin négatif, par ex., en congelant et en stockant du jus de viande ayant déjà donné un résultat négatif). **Ne surtout pas utiliser de l'eau comme témoin négatif !!!**

Témoin positif :
Il est recommandé de tester régulièrement un TEMOIN POSITIF (protocoles fournis sur demande) pour vérifier la bonne application du test. La régularité est à fixer par les utilisateurs du test. A conseiller lors de la 1ere utilisation et ensuite de temps en temps.

Conservation
Les ampoules doivent être conservées au frais (3 - 8°C). Attention : **NE PAS CONGELER !**

Responsabilité limitée
Premi®Test est un test de détection et en tant que tel, l'exactitude du test ne peut être garantie à 100%. De plus, l'évaluation de la couleur, et plus particulièrement celle du résultat violet/jaune, peut différer d'une personne à l'autre. En cas de conséquences graves pour l'utilisateur, les résultats du test devront être confirmés par une analyse exhaustive et homologuée. La responsabilité de DSM PremiTest B.V. et de ses filiales ne pourra être engagée, et le client exempera DSM PremiTest B.V. de toute poursuite, de tout dédommagement, de tous frais et dépenses en rapport avec l'utilisation du test, DSM étant tout au plus tenu de remplacer les tests prouvés défectueux.

DSM Nutritional Products
DSM PremiTest B.V.
PO BOX 1163, 6160 BD Geleen
LES PAYS-BAS
Website: www.premitest.com
E-mail: info.premitest@dsm.com

Annexe 1b. Notice d'utilisation 0911 Recto.

Premi® Test

Standard diffusion test for the detection of antimicrobial compounds in meat (AFNOR validated). fish, eggs, kidneys, urine, blood and animal feed — insert 0911

Contents
25 ampoules with *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in a solid agar medium, disposable pipette tips, perforated cover foil + syringe

Product description
Premi®Test is a broad spectrum microbial screening test especially developed for the detection of antimicrobial substances, such as antibiotic and sulphonamide residues, in fresh meat, fish and eggs at or below most Maximum Residue Level (MRL).

Test principle
Premi®Test is based on the inhibition of the growth of *Bacillus stearothermophilus*, a micro-organism very sensitive to many antibiotics and sulphonamide residues.
A standardized number of spores are embedded in an agar medium with selected nutrients. When meat fluid is added to the Premi®Test and heated at 64°C, the spores will germinate. The germinated spores will multiply and form an acid when no inhibitory substances are present. This will be visible by a colour change from purple to yellow of the indicator in the ampoule.
When antimicrobial residues are present in sufficient amount (above the detection level) no growth will occur and the colour will remain purple.
Special "sample-procedures" for eggs, kidneys, urine, blood and feed are available at DSM Premitest

Caution
This test is extremely sensitive to antibiotics and other inhibitory substances, any contamination with such materials should be avoided at all time. It is advised to wash hands thoroughly before starting the test procedure. Use tissue paper or a clean towel to dry hands.

Instruction for use
- Wash hands thoroughly before starting the test procedure.
- Cut out the required number of ampoules without damaging the aluminum foil of the adjacent ampoules.
- Remove foil carefully from the required amount of ampoules (do not open more ampoules than needed).
- Take approximately 2 cm² of lean meat and use a meat press to extract approximately 250µl of meat fluid. Alternatively the meat juice can be obtained with the help of the Multipress or by freeze/thawing the meat. (A technical (user)-kit for the Multipress is available at www.premitest.com)
- Use a new disposable tip on the syringe for each sample.
- Pipette 100 µl of the fluid onto the agar in the ampoule. Do not distort the agar.
- Allow to stand at room temperature for 20 minutes for a pre-incubation.
- Flush the meat juice away by gently filling and emptying the test ampoule twice with demineralized (demi) water. Wash the ampoules with demineralized water only and **do not use** tap-water !!!
- Remove the last water carefully from the test ampoule.
- Close the test ampoule with the foil supplied to avoid evaporation.
- Incubate the test ampoule in a Premi®Test incubator or water bath (64°C ± 0.5°C).
- It is strongly recommended to use, in parallel, a negative control of the same matrix that is being tested. Read the test results after the negative control has changed colour (approximately 3.00 hours).
- All necessary equipment (meat press, scissors, thermometer, incubator, pipette and timer) are available in the Starterkit Premi®Test.
- To facilitate the use of the PremiTest there is a Powerpoint document available for all users.

Reading test results
- Read the colour only from the bottom 2/3 part of the ampoule.
- A clear colour change (from purple towards yellow) indicates the absence of antibiotics / sulphonamides above the detection limit.
- No clear colour change indicates the presence of antibiotics and/or sulphonamides at/or above the limit of detection of the test.

Negative control:
The use of a negative control is **strongly recommended** (even obligatory for AFNOR). Read the test results after the negative control has changed colour. The negative control can be prepared by freezing and storing meat juice from a sample previously tested negative. **Never use water as a negative control**.

Positive control:
It is recommended to test regularly a positive control (protocol is available from DSM) to verify the correct application of the test.

Storage
The ampoules should be stored cool (3 - 10°C). Attention: **DO NOT FREEZE!**

Limited Liability
Premi®Test is a screening test and as such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of colour, in particular that of a yellow/purple result, may differ from person to person. In cases where severe consequences are involved for the user, test results should be confirmed by a validated comprehensive analytical method. DSM PremiTest B.V. and its affiliates shall not be held liable for, and customer shall indemnify DSM PremiTest B.V. against, any adverse consequences, damages, cost and expenses in connection with the use of the test beyond the replacement of proven faulty tests.

DSM
DSM PremiTest B.V. PO BOX 1163, 6160 BD Geleen THE NETHERLANDS
Website: www.premitest.com E-mail: info.premitest@dsm.com

Premi® Test

Test di diffusione standard per la rilevazione di inibenti in campioni di carni (AFNOR), pesce, uova, reni, urina, sangue e mangime — inserto 0911

Contenuto
25 ampolle con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in un terreno agarizzato solido, puntali per pipetta, foglio perforato di protezione + siringa.

Descrizione del prodotto
Il Premi®Test è un test di screening microbiologico ad ampio spettro appositamente sviluppato per la rilevazione a livello o sotto la quantità massima di residuo (MRL) della maggior parte delle sostanze antimicrobiche, quali i residui di antibiotici e sulfamidici, nelle carni fresche, nel pesce e nelle uova.

Principio del test
Il Premi®Test è basato sulla inibizione della crescita del *Bacillus stearothermophilus*, un microorganismo molto sensibile a residui di diversi antibiotici e sulfamidici.
Le ampolle fornite nel kit contengono un numero standard di spore in un terreno agarizzato con sostanze nutritive selezionate. Dopo aver aggiunto al Premi®Test il campione opportunamente preparato, le ampolle vengono incubate a 64°C. In assenza di sostanze inibenti, le spore germinate si moltiplicheranno e formeranno un acido, la colorazione dell'indicatore contenuto nell'agar viranno dal viola al giallo.
Qualora dovessero essere presenti dei residui antimicrobici in misura sufficiente (sopra il livello di rilevazione), non si assisterà ad alcuna crescita ed il colore dell'agar rimarrà viola.
Sono disponibili presso DSM le procedure per la preparazione di campioni di uova, reni, urina, sangue e mangime.

Avvertenza
Questo test è estremamente sensibile ad antibiotici e ad altre sostanze inibenti e pertanto è necessario evitare qualsiasi contaminazione durante la sua esecuzione. È consigliabile lavarsi molto bene le mani prima di iniziare la procedura del test. Utilizzare salvietta di carta o asciugamani puliti per asciugare le mani.

Istruzioni per l'uso
- Lavarsi molto bene le mani prima di iniziare la procedura del test.
- Tagliare del blocco il numero necessario di ampolle senza danneggiare il foglio di copertura delle ampolle adiacenti (non strappare le ampolle dal blocco).
- Rimuovere con cura il foglio di alluminio solo dalle ampolle che si intendono utilizzare (non aprire mai un numero di ampolle superiore al necessario).
- Prendere circa 2 cm² di carne magra e utilizzare una spremitrice per estrarre circa 250 µl di succo di carne. Eventualmente si può ottenere il succo della carne con l'ausilio del Multipress oppure congelandola e poi scongelandola. (Informazioni tecniche sul Multipress sono disponibili sul sito www.premitest.com).
- Inserire sulla siringa dissetrice un puntale monouso nuovo per ciascun campione da testare.
- Pipettare 100 µl di succo nell'ampolla sull'agar. Non toccare l'agar.
- Incubare a temperatura ambiente per 20 minuti.
- Sciacquare il succo della carne riempiendo e svuotando con prudenza l'ampolla del test due volte con acqua demineralizzata e rimuovere con cura l'acqua residua dall'ampolla del test.
- Chiudere l'ampolla del test utilizzando il foglio adesivo fornito per evitare l'evaporazione.
- Incubare l'ampolla del test in l'incubatrice Premi®Test o in un bagnomaria (64 °C ± 0,5 °C (circa 3 ore). Non effettuare l'incubazione in un termostato!
- Si raccomanda di utilizzare un campione di controllo negativo della stessa matrice del campione da analizzare. Leggere i risultati del test immediatamente dopo che il campione negativo ha cambiato colore (circa 3 ore).
- Tutta l'attrezzatura necessaria (spremiarne, forbici, termometro, termostatico, pipetta e timer) è fornita con lo Starterkit Premi®Test.
- Per facilitare l'utilizzo del Premitest, DSM ha preparato una presentazione in Powerpoint disponibile per gli utilizzatori

Interpretazione dei risultati del test
- Leggere solo il colore del 2/3 inferiori dell'ampolla.
- Una chiara variazione di colore (dal viola al giallo) indica l'assenza di antibiotici / sulfamidici sopra il limite di rilevazione.
- Una variazione di colore poco chiara indica la presenza di antibiotici e/o sulfamidici al limite o sopra il limite di rilevazione del test.

Controlli negativi
L'uso del controllo negativo è assolutamente necessario. Leggere i risultati del test immediatamente dopo che il controllo negativo ha cambiato colore. Come controllo negativo l'ideale sarebbe utilizzare un campione risultato negativo con il kit e conservato congelato in aliquote. **Mai utilizzare acqua come controllo negativo.**

Controllo Positivo:
Si raccomanda di analizzare regolarmente un controllo positivo (il protocollo per la preparazione del controllo positivo è disponibile presso DSM) per verificare il corretto funzionamento del kit.

Conservazione
Le ampolle devono essere mantenute al fresco (3 - 10°C). Attenzione: **NON CONGELARE!**

Responsabilità Limitata
Il Premi®Test è un metodo di screening e come tale non è possibile garantire al 100% i risultati del test. La valutazione del colore, in particolare quella del risultato giallo / viola, può inoltre differire da persona a persona. Nei casi che implicano gravi conseguenze per l'utente, i risultati del test devono essere confermati da un adeguato metodo analitico validato. DSM PremiTest B.V. e le sue società affiliate non saranno ritenute responsabili, così come il cliente solleverà DSM PremiTest B.V. da ogni responsabilità, per tutte le conseguenze avverse, i danni, i costi e le spese che siano associati all'utilizzo del test al di là della sostituzione dei test che sono risultati difettosi.

DSM
DSM PremiTest B.V. PO BOX 1163, 6160 BD Geleen OLANDA
Website: www.premitest.com E-mail: info.premitest@dsm.com

Premi® Test

Ensayo de difusión estándar para detectar residuos antimicrobianos en carne(AFNOR), pescado, huevos, riñones, orina, sangre y pienso — inserción 0911

Contenido
25 tubos de ensayo con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* en un agente de Ágar sólido, puntas de pipeta desechables, película perforada de protección + jeringa.

Especificación del producto
Premi®Test es una prueba microbiana de amplio espectro, especialmente diseñada para la detección de sustancias antimicrobianas, tales como residuos antibióticos y sulfonamidas en carne fresca, pescado y huevos a niveles iguales o inferiores al Nivel Máximo de Residuos permitido.

Principio del ensayo
Premi®Test se basa en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus*, un microorganismo con alta sensibilidad a la mayor parte de los antibióticos y sulfonamidas. Se introduce una cantidad estándar de esporas en un medio de Ágar con nutrientes seleccionados. Al agregar jugo de carne al Premi®Test y calentarlo a 64°C, las esporas germinan. Si no se encuentra presente sustancia inhibidora alguna, las esporas germinadas se multiplican produciendo un ácido, identificable por un cambio del color del indicador del tubo, virando de violeta a amarillo. Si se encuentra presente una cantidad suficiente de residuos antimicrobianos (sobre el nivel de detección), las esporas no se reproducirán y el color seguirá siendo violeta.
DSM Premitest puede aplicarse también en muestras de huevos, riñones, orina, sangre y pienso.

Advertencia
El ensayo es extremadamente sensible a los antibióticos y otras sustancias inhibidoras, se debe evitar en todo momento cualquier contaminación con tales materiales. Se recomienda lavarse bien las manos antes de iniciar la prueba. Utilice papel o una toalla limpia para secarse las manos.

Instrucciones de uso
- Lávarse bien las manos antes de comenzar la prueba.
- Recortar el número de tubos necesarios sin dañar el aluminio de las ampollas contiguas.
- Quitar con cuidado el aluminio de los tubos que se vayan a utilizar (no abra más tubos de los necesarios).
- Tomar aproximadamente 2 cm² de carne magra y utilizar una prensa para extraer aproximadamente 250 µl de jugo de carne. Otra manera de obtener jugo de carne sería con una Multipress o congelando/descongelando la muestra (Información disponible sobre la Multipress en www.premitest.com)
- Colocar una nueva punta de pipeta en la jeringa para cada toma de muestra.
- Pipetear 100 µl de líquido sobre el agar del tubo de ensayo. No dañar el agar
- Preincubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Elimine el jugo de carne del tubo de ensayo de la prueba realizando dos lavados con agua destilada y elimine el agua del tubo de ensayo cuidadosamente.
- Cerrar el tubo de ensayo con la película protectora incluida en el ensayo, para evitar así la evaporación.
- Incubar el tubo de ensayo en un calentador DSM o en baño de agua (64°C ± 0,5°C) durante aproximadamente 3 horas.
- Simultáneamente se recomienda hacer una muestra ya comprobada como negativa. Leer los resultados una vez la muestra negativa haya cambiado de color.
- El Starterkit Premi®Test incluye todo el instrumental necesario (prensa de carne, tijeras, termómetro, incubadora, pipeta y cronómetro). Demo disponible en www.premitest.com
- Para facilitar el uso de PremiTest, existe un documento PowerPoint disponible para el usuario

Lectura de los resultados del ensayo
- Leer únicamente el color de los 2/3 inferiores del tubo de ensayo.
- Un claro cambio de color (de violeta a amarillo) indica la ausencia de antibióticos / sulfonamidas por encima del límite de detección del ensayo.
- Un cambio de color poco manifiesto indica la presencia de antibióticos y/o sulfonamidas al mismo nivel o sobre el límite de detección del ensayo.

Control negativo
Se recomienda la realización de un control negativo, p.ej. congelando y almacenando el jugo de carne procedente de una muestra ya probada como negativa. Leer los resultados de la prueba después de que el control negativo haya cambiado de color. **No utilizar nunca agua como control negativo.**

Control positivo
Se recomienda realizar con regularidad una prueba de control positivo (protocolo disponible en DSM) para verificar el correcto funcionamiento del test.

Almacenamiento
Los tubos de ensayo deben ser conservados en lugar fresco (3 - 10°C). Advertencia: **¡NO CONGELAR!**
Responsabilidad limitada
Premi®Test es una prueba de screening por lo que los resultados no se pueden garantizar al 100%. Además, la apreciación visual del cambio de color, en especial en caso de un resultado amarillo/violeta, puede variar en función del observador. Si los resultados del ensayo tuvieran consecuencias graves para el usuario, éstos deberán ser corroborados mediante un método analítico completo aprobado. DSM PremiTest B.V. y sus filiales no se responsabilizan por cualquier efecto colateral, mal por daños, gastos y desembolsos incurridos en relación con el uso del ensayo; los clientes liberan a DSM PremiTest B.V. de los mismos. La responsabilidad de DSM PremiTest B.V. se limita a la sustitución de los ensayos si es que se puede probar su mal funcionamiento.

DSM
DSM PremiTest B.V. PO BOX 1163, 6160 BD Geleen HOLANDA
Website: www.premitest.com E-mail: info.premitest@dsm.com

Premi® Test

Standaard diffusietest voor het aantonen van antimicrobiële residuen in vlees (AFNOR gevalideerd), vis, eieren, nieren, urine, bloed en veevoer — Insert 0911

Inhoud
25 ampullen met *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in een vast agar medium, pipetpunten voor eenmalig gebruik, geperforeerde aluiddfolie + injectiespuit.

Productbeschrijving
Premi®Test is een breedspectrum screeningstest die speciaal is ontwikkeld voor het detecteren van antimicrobiële stoffen zoals antibiotica- en sulfonamidereisiden in vers vlees, vis en eieren op of onder de maximale residulimiet (MRL).

Testprincipe
Het principe van de Premi®Test is gebaseerd op de groeiremming van *Bacillus stearothermophilus*, een microorganisme dat gevoelig is voor vele antibiotica- en sulfonamidereisiden. Uitgegaan wordt van een agar medium dat gestandaardiseerde hoeveelheden sporen en nutriënten bevat. Na toevoeging van vleessap aan de Premi®Test en verhitting op 64°C zullen de sporen ontkiemen. De ontkiemde sporen zullen zich vermenigvuldigen en zuur vormen als er geen remmende stoffen aanwezig zijn. Dit zal zichtbaar zijn door kleurverandering van de indicator van paars naar geel. Als er voldoende antimicrobiële stoffen aanwezig zijn (boven de detectiegrens) zal geen groei plaatsvinden en zal de kleur van de indicator paars blijven.
Voor eieren, nieren, urine, bloed en veevoer zijn aparte "sample-procedures" bij DSM Premitest aanwezig.

Belangrijk
Daar deze test uiterst gevoelig is voor antibiotica en andere remmende stoffen, moet elke verontreiniging met dergelijke stoffen worden voorkomen. Geadviseerd wordt de handen goed te wassen en af te drogen met een schone handdoek of tissue alvorens de test uit te voeren.

Gebruiksaanwijzing
- Voor gebruik de handen grondig wassen.
- Snijd of knip de benodigde ampullen uit het blok zonder de aluminiumfolie van aangrenzende ampullen te beschadigen.
- Verwijder voorzichtig de folie van het gewenste aantal ampullen (maak nooit meer ampullen open dan nodig).
- Neem ca. 2 cm² mager vlees en ontbrek hieraan ca. 250µl vleessap met behulp van een vleespers. Vleessap kan ook worden verkregen met behulp van een Multipress of door het vlees eerst te bevriezen en vervolgens te ontdooien. (Technische documentatie over de Multipress is te vinden op www.premitest.com).
- Plaats bij ieder monster een nieuw wegwerp-pipetpunt op de doseerspuit.
- Pipetteer 100 µl van het vleessap op de agar in de ampul. Zorg ervoor dat daarbij geen beschadiging van de agar optreedt.
- Laat 20 minuten staan bij kamertemperatuur voor predifusie.
- Spoel het vleessap weg door de ampul twee keer voorzichtig te spoelen met gedemineraliseerd water en het laatste water voorzichtig uit de ampul te verwijderen. **Gebruik nooit leidwater!**
- Sluit de ampul goed af met folie om uitdrogen te voorkomen.
- Incubeer de testampul ongeveer 3.00 uur in de Premi®Test incubator of waterbad bij 64°C (± 0,5°C).
- Sterk aanbevolen wordt om tegelijkertijd een bekend negatief monster van dezelfde matrix te testen. Lees het testresultaat af nadat het negatieve monster van kleur is veranderd (ongeveer 3 uur).
- Alle benodigdheden (vleespers, schaar, thermometer, incubator en klok) zijn te vinden in de "Starter kit Premi®Test". Zie ook de demo op onze website: www.premitest.com
- Om het gebruik van de PremiMTest te vergemakkelijken is er een PowerPoint presentatie beschikbaar met alle "tips & tricks".

Aflezen
- Kijk bij het aflezen van het resultaat uitsluitend naar de kleur van het onderste 2/3 deel van de ampul.
- Een duidelijke kleurverandering (van paars naar geel) wijst op de afwezigheid van antibiotica/sulfonamiden boven de detectiegrenst.
- Indien geen duidelijke kleurverandering optreedt, is dit een aanwijzing voor de aanwezigheid van antimicrobiële stoffen op of boven de detectiegrenst.

Negatieve controle
Een negatief controlemonster wordt ten zeerste aanbevolen (en is verplicht conform AFNOR). Dit kan door de gebruiker zelf worden gemaakt, door bijvoorbeeld een eerder negatief bevonden vleessap-monster in te vrieren en te bewaren. **Gebruik nooit water als een negatieve controle.**

Positieve controle
Het wordt aanbevolen regelmatig positieve controles mee te nemen met de te testen monsters om de correcte uitvoering van de PremiMTest te controleren (protocol is bij DSM aanwezig).

Bewaarcondities
De ampullen moeten koel (3 -10°C) bewaard worden. Let op: **MET INVRIEZEN !**

Beperkte aansprakelijkheid
Aangezien de PremiMTest een screeningstest is, kan geen 100% nauwkeurigheid worden gegarandeerd. Bovendien kan de kleurbeoordeling, met name de omslag van paars naar geel, van persoon tot persoon verschillen. In gevallen waarin de uitslag van de test belangrijke consequenties kan hebben voor de gebruiker, moeten de resultaten worden bevestigd door een algemeende gevalideerde analyse. DSM PremiTest B.V. en zijn groepsmaatschappijen zijn niet aansprakelijk voor eventuele negatieve gevolgen, schade of kosten voortvloeiend uit het gebruik van de test en de klant dient DSM PremiTest te vrijwaren van dergelijke aansprakelen, afgezien van het vervangen van bewezen niet-deugdelijke testen.

DSM
DSM Nutritional Products **DSM PremiTest B.V.** PO BOX 1163, 6160 BD Geleen NEDERLAND
Website: www.premitest.com E-mail: info.premitest@dsm.com

Productnaam/Nom du produit	Premitest ampoules (recto)
Productcode/Code de produit	0911
Id record product	33147
Formaat bijsluiter/Format notice	560x247
Formaat geplooid/Format plié	70x92 X
Nr.Dossier/N° Dossier	907397
Nr. Bestelling/N°Commande	4500171028/010
Nr. proef/N° épreuve	1
Datum/Date	13-11-2008 11:39

Nr Kleuren / N° Couleurs Recto : 1 — Black, Cad

Nr Kleuren / N° Couleurs Verso : /

GOLDPRINT NV
VAUCAMPSLAAN 32
3668 HOUTHALEN
TEL. 011/60 69 79
FAX: 011/60 69 68

GoldPRINT
member of Copyprint Europe
www.goldprint.be
webmaster@goldprint.berthiewebmaster

GOED VOOR DRUK / BON A TIRER

.....20... TEK. / SIGN. .....

Annexe 1c. Notice d'utilisation 0911 Verso.

Premi® Test

Test standardisé pour la détection de substances antimicrobiennes dans la viande (validé AFNOR), le poisson, les œufs, les miels, l'urine, le sang et l'alimentation animale . La marque AFNOR VALIDATION porte sur les viandes de bovin, de porc et de volaille. Notice 0911

Contenu du coffret
25 ampoules contenant du *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* enrobé dans un excipient solide de gélose, embouts de seringue jetables, film de protection perforé + seringue doseuse.

Description du produit
PremiTest est un test de détection microbiologique à large spectre, spécialement mis au point pour la détection dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs, de la présence de substances antimicrobiennes telles que les résidus d'antibiotiques ou de sulfamides. à un niveau égal ou inférieur à la plupart des LMR (limite maximale de résidus).

Principe du test
PremiTest est basé sur l'inhibition du développement de *Bacillus stearothermophilus*, un micro-organisme très sensible à de nombreux résidus d'antibiotiques et de sulfamides.
Un nombre standardisé de spores est enrobé dans un excipient de gélose contenant des nutriments sélectionnés. Lorsque le jus de viande aura été ajouté dans l'ampoule de PremiTest et mis en incubation à 64°C, les spores vont germer. Ces spores germés vont se multiplier et acidifier le milieu **en l'absence** de substances inhibitrices. Ce qui se traduira par un changement de couleur de l'indicateur qui virera du violet au jaune.
Si les résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection), le germe test ne se développera pas et la couleur restera violette.
DSM PremiTest vous propose des procédures de prélèvements d'échantillons d'œufs, de miels, d'urine, de sang et d'alimentation animale.

Précautions à prendre
Ce test est extrêmement sensible aux antibiotiques et autres substances inhibitrices : il faut donc éviter tout risque de contamination par de telles substances. Il est conseillé de bien se laver les mains avant le test et de se sécher avec du papier absorbant ou une serviette propre.

Utilisation
- Bien se laver les mains avant de commencer le test.
- Découper le nombre d'ampoules nécessaires avec une paire de ciseaux sans abîmer le film d'aluminium qui protège les ampoules voisines.
- Enlever prudemment le film de protection recouvrant le nombre d'ampoules souhaitées (ne pas ouvrir plus d'ampoules que nécessaire).
- Prendre environ 2 cm³ de viande maigre et utiliser une presse-viande pour en extraire environ 250 µl de jus de viande. Il est également possible d'obtenir du jus de viande à l'aide du Multipress ou en faisant congeler/décongeler la viande. (Un bulletin technique concernant le Multipress est disponible au www.premitest.com).
- Utiliser un nouvel embout jetable de seringue pour chaque prélèvement.
- Pipeter dans l'embout 100 µl de jus et le verser sur la gélose, sans la toucher.
- Laisser à température ambiante pendant 20 minutes pour une pré-incubation.
- Essuyer le jus de viande en remplissant puis en vidant deux fois de suite l'ampoule de test avec de l'eau déminéralisée. **Laver absolument à l'EAU DÉMINÉRALISÉE (pas d'eau du robinet!)**
- Il est important d'éliminer soigneusement le restant d'eau de l'ampoule.
- Fermer l'ampoule de test avec le film fourni pour éviter l'évaporation.
- Faire incuber l'ampoule de test dans un incubateur PremiTest ou au bain-marie (64°C ± 0.5°C).
- Il est **FORTEMENT RECOMMANDÉ** de faire parallèlement un témoin négatif **par espèce**. Lire les résultats du test lorsque le témoin négatif aura changé de couleur (environ 3 heures).
- Tout le matériel nécessaire (presse-viande, ciseaux, thermomètre, incubateur, pipette et minuteur) est disponible dans le Starterkit PremiTest.
- Pour faciliter une bonne utilisation du PremiTest un document PowerPoint est à la disposition des utilisateurs.

Lecture des résultats du test
- Lire la couleur uniquement sur les deux tiers inférieurs de l'ampoule.
- Un changement de couleur évident (du violet au jaune) indique une absence d'antibiotiques / sulfamides à une concentration supérieure au seuil de détection.
- Il n'y a aucun changement de couleur évident, cela indique une présence d'antibiotiques et/ou de sulfamides à une concentration supérieure ou égale au seuil de détection du test. Les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification.

Témoin négatif :
Utilisation d'un témoin négatif **par espèce FORTEMENT RECOMMANDÉ (voire OBLIGATOIRE pour le protocole validé AFNOR).** Lire quand le témoin négatif vire au jaune. Une lecture trop tardive entraîne une diminution de la sensibilité du test! (le témoin négatif, par ex., en congelant et en stockant du jus de viande ayant déjà donné un résultat négatif). **Ne surtout pas utiliser de l'eau comme témoin négatif !!!**

Témoin positif :
Il est recommandé de tester régulièrement un TÉMOIN POSITIF (protocole fourni sur demande) pour vérifier la bonne application du test. La régularité est à fixer par les utilisateurs du test. A conseiller lors de la 1ère utilisation et ensuite de temps en temps.

Conservation
Les ampoules doivent être conservées au frais (3 - 10°C). Attention : **NE PAS CONGELER !**

Responsabilité limitée
PremiTest est un test de détection et en tant que tel, l'exactitude du test ne peut être garantie à 100%. De plus, l'évaluation de la couleur, et plus particulièrement celle du résultat violet/jaune, peut différer d'une personne à l'autre. En cas de conséquences graves pour l'utilisateur, les résultats du test devront être confirmés par une analyse exhaustive et homologuée. La responsabilité de DSM PremiTest B.V. et de ses filiales ne pourra être engagée, et le client exonéré DSM PremiTest B.V. de toute poursuite, de tout dédommagement, de tous frais et dépenses en rapport avec l'utilisation du test, DSM étant tout au plus tenu de remplacer les tests prouvés défectueux.

DSM
DSM PremiTest B.V. PO BOX 1163, 6160 BD Geleen LES PAYS-BAS
Website: www.premitest.com E-mail: info.premitest@dsm.com

Premi® Test

Standard-Diffusionstest zum Nachweis von antimikrobiellen Substanzen in Fleisch (validiert AFNOR), Fisch, Eiern, Nieren, Harn, Blut und Futtermitteln Insert 0911

Inhalt
25 Ampullen mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in einem festen Agar; Einweg-Pipettenspitzen, perforierte Abdeckfolie und Spritze.

Produktbeschreibung
PremiTest ist ein mikrobieller Screening-Test mit breitem Spektrum, der eigens zum Nachweis von antimikrobiellen Substanzen, wie etwa Antibiotika- und Sulfonamid-Rückständen, in Fleischfleisch, Fisch oder Eiern bei oder unter dem MRL (Maximum Residue Level) entwickelt worden ist.

Testprinzip
PremiTest basiert auf der Wachstumshemmung von *Bacillus stearothermophilus*, einem für viele Antibiotika- und Sulfonamid-Rückstände sehr empfindlichen Mikroorganismus.
Eine standardisierte Anzahl Sporen ist in einem Agar mit ausgewählten Nährstoffen eingebettet. Wenn dem PremiTest Fleischflüssigkeit zugefügt und auf 64°C erhitzt wird, keimen die Sporen. Die gekeimten Sporen vermehren sich und bilden eine Säure, wenn **keine** Hemmstoffe vorhanden sind. Dies wird durch eine farbliche Veränderung des Indikators von violett nach gelb sichtbar. Wenn antimikrobielle Rückstände in ausreichender Menge (über der Nachweisgrenze) vorhanden sind, tritt kein Wachstum ein und die Farbe bleibt violett.
Für Eier, Nieren, Harn, Blut und Futtermittel sind bei DSM PremiTest separate Probenahme-Verfahren verfügbar.

Vorsicht
Dieser Test ist äußerst empfindlich gegen Antibiotika und andere Hemmstoffe. Jegliche Kontaminierung mit solchen Stoffen sollte jedoch vermieden werden. Es wird empfohlen, sich vor Beginn des Testverfahrens sorgfältig die Hände zu waschen. Verwenden Sie Papiertücher oder ein sauberes Tuch zum Trocknen der Hände.

Bedienungsanleitung
- Die Hände vor Beginn des Testverfahrens sorgfältig waschen.
- Schneiden Sie die gewünschte Anzahl Ampullen ab, ohne die Aluminiumfolie der angrenzenden Ampullen zu zerstören.
- Die Folie vorsichtig von der erforderlichen Anzahl Ampullen entfernen (nicht mehr Ampullen öffnen als benötigt).
- Aus etwa 2 cm³ magerem Fleisch mit einer Fleischpresse etwa 250 µl Fleischflüssigkeit entnehmen. Als Alternative dazu kann der Fleischsaft mit Hilfe des Multipress-Geräts oder durch Einfrieren/Auftauen des Fleisches gewonnen werden. (Ein technisches Datenblatt zum Multipress-Gerät ist unter www.premitest.com erhältlich).
- Platzieren Sie für jede neue Probe eine neue Einwegspitze auf die Spritze.
- 100 µl der Flüssigkeit in den Agar der Ampulle pipettieren. Den Agar nicht auf den Kopf stellen.
- 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Vorinkubation stehen lassen.
- Den Fleischsaft durch zweimaliges behutsames Füllen und Leeren der Testampulle mit vollentsalztem Wasser (dest. Wasser) ausspülen. Waschen Sie die Testampulle nur mit vollentsalztem Wasser und benutzen Sie niemals Leitungswasser.
- Entfernen Sie das Restwasser vorsichtig aus der Testampulle.
- Die Testampulle mit der gelieferten Folie schließen, um Verdunstung zu vermeiden.
- Die Testampulle in einem Inkubator PremiTest oder Wasserbad (64°C ± 0.5°C) ca. 3 Stunden lang bebrüten.
- Es wird dringend empfohlen, gleichzeitig eine enzymne Negativprobe des gleichen Probenmaterials als Parallelprobe durchzuführen. Lesen Sie die Testergebnisse ab, nachdem die Negativprobe ihre Farbe verändert hat. (nach ca. 3 Stunden)
- Die gesamte erforderliche Ausrüstung (Fleischpresse, Schere, Thermometer, Inkubator, Pipette und Zeituhr) sind im „Starter-Kit PremiTest" erhältlich. Siehe dazu auch die Demo auf unserer Website: www.premitest.com
- Um dem Anwender die Handhabung des PremiTest zu erleichtern, steht eine Powerpoint-Dokumentation zur Verfügung.

Ablesen der Testergebnisse
- Die Farbe nur von den unteren zwei Dritteln der Ampulle ablesen.
- Eine deutliche Farbveränderung (von violett nach gelb) zeigt an, dass keine Antibiotika / Sulfonamide über der Nachweisgrenze vorhanden sind.
- Keine deutliche Farbveränderung zeigt an, dass Antibiotika und/oder Sulfonamide an/über der Nachweisgrenze des Tests vorhanden sind.

Negative Gegenprobe
Die Untersuchung negativen Gegenprobe wird dringend empfohlen (und verpflicht für AFNOR). Lesen Sie die Testergebnisse ab, nachdem die Negativprobe ihre Farbe verändert hat. Falls erforderlich, kann der Benutzer eine negative Gegenprobe z. B. durch Einfrieren und Lagern von Fleischsaft aus einer zuvor negativ gebrüteten Probe erstellen. Benutzen Sie niemals Wasser als Negativprobe.

Positive Gegenprobe
Es wird empfohlen eine positive Probe regelmäßig mitzutesten, um die korrekte Durchführung des Tests zu kontrollieren. (Gebrauchsanweisung ist von DSM erhältlich)

Lagerung
Die Ampullen sollten kühl gelagert werden (3 - 10°C). Vorsicht: **NICHT EINFRIEREN!**

Begrenzte Haftung
PremiTest ist ein Screening-Test und kann somit keine 100%-ige Genauigkeit der Testergebnisse gewährleisten. Darüber hinaus kann sich die Beurteilung der Farbe, insbesondere des Gelb-/Violett-Ergebnisses von einer Person zur anderen unterscheiden. In Fällen, in denen sich kritische Folgen für den Benutzer ergeben, sollten die Testergebnisse durch eine bewährte umfassende Analysemethode bestätigt werden. Die DSM PremiTest B.V. oder deren Filialen können über den Ersatz von nachweislich fehlerhaften Tests hinaus nicht für weitere Konsequenzen verantwortlich gemacht werden, und der Kunde hat die DSM PremiTest von allen damit zusammenhängenden Ansprüchen freizustellen.

DSM
DSM PremiTest B.V. PO BOX 1163, 6160 BD Geleen DIE NIEDERLANDE
Website: www.premitest.com E-mail: info.premitest@dsm.com

Premi® Test

Microbial inhibition test validated for the detection of residues of PENICILLIN in fresh bovine meat Insert 0911

1. The Intended Use: PremiTest is a Microbial inhibition test validated for the detection of residues of PENICILLIN in fresh bovine meat.

2. The Intended User: The test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with the antibiotic screening testing. All users of the PremiTest should be trained by a DSM representative or by somebody who already successfully completed the training. To facilitate the use of the PremiTest there is a PowerPoint document available for all users.

3. Contents
- 25 ampoules containing an agar medium, pH indicator and spores of *Bacillus Stearothermophilus*
- 0.1 ml syringe + 25 disposable tips
- PremiTest covering foil

4. Materials required but not included
- Starterkit PremiTest, containing the required equipment to do PremiTest:
- DSM heating block (PremiTest incubator), meat press, pair of scissors, thermometer and timer.
- Instead of the PremiTest incubator a water bath at 64°C ± 1.0°C can be used.
- In case a water bath is used: a rack or floater is required to accommodate the ampoules during incubation.
- Calibrated thermometer appropriate for designated use.
- Refrigerator at 3 - 8°C (37-46 °F) for storage of the PremiTest-ampoules.
- Negative control: muscle tissue juice from a known antibiotic-free sample, previously tested as negative.
- PremiScan, software to interpret the results of the PremiTest, an HP Scanjet 7400 or 8200 scanner, templates, black cloth and Kodak Q-60 Color chart.

5. Test Performance

5.1 Detection Sensitivity (dose response information PremiTest):
10 ppb for Penicillin G
The PremiTest has been validated to detect penicillin G residues in fresh bovine muscle tissue consistently with 95% confidence.

5.2 Selectivity
30 negative control meat samples were evaluated in an independent laboratory and 0 of these negative samples tested positive with the PremiTest.

5.3 Cross reactivity
PremiTest does cross-react with the following drugs spiked at a concentration of 100 ppb:

ß-lactams:	Amoxicillin, Ampicillin, Cephapirin, Cloxacillin
Tetracyclines:	Chlortetracycline, Tetracycline
Macrolides:	Erythromycin, Tylosin, Tilmicosin
Glycopeptides:	Vaginiamycin
Sulfonamides:	Sulfadiazine, Sulfadimethoxine, Sulfathiazole
Miscellaneous:	Dapsone

PremiTest does cross-react with the following drugs spiked at a concentration of 50 ppb:

ß-lactams:	Amoxicillin, Ampicillin, Cephapirin
Macrolides:	Erythromycin, Tylosin, Tilmicosin
Miscellaneous:	Dapsone

PremiTest does cross-react with the following drugs spiked at a concentration of 10 ppb:

ß-lactams:	Amoxicillin, Ampicillin
Miscellaneous:	Dapsone

6. Test principle
- PremiTest is based on the inhibition of the growth of *Bacillus Stearothermophilus* var. *calidolactis*, a thermophile microorganism which is very sensitive to many antibiotics and sulphonamide residues. A standardized number of spores is embedded in an agar medium with selected nutrients and a pH indicator (bromocresol purple).
- When muscle tissue fluid containing no antimicrobials or non-inhibitory substances is added to the PremiTest and heated at 64°C, the spores will grow, multiply and produce acid. This process is characterized by a visible change in the color of the pH indicator from purple to yellow in the ampoule.
- When muscle tissue fluid containing antimicrobial residues or inhibitory substances are present at or above the detection sensitivity, no growth will occur and there will be no acid production. As a result, there will be no change in the color of the pH indicator and the color of the ampoule will remain purple.

7. Caution
This test is extremely sensitive to antibiotics, disinfectants and other inhibitors substances. Any contamination with such materials should be avoided at all times. It is advised to wash hands thoroughly before starting the test procedure, and to dry the hands with tissue paper or a clean towel. Disposable hygienic hand gloves can also be used.

8. Operating instructions PremiTest

8.1 Before starting the test procedure
1. PremiTest: take the number of ampoules needed from storage and let them warm up to room temperature. (18-25 °C / 64 - 77 °F)
2. **PremiTest Incubator:** Allow the PremiTest incubator or water bath to reach the required temperature of 64°C ± 1.0°C (147 °F).
3. **Samples:** Take approximately 4 grams of fresh, lean bovine muscle tissue and use a meat press to extract approximately 250µl of meat fluid. The juice can be obtained somewhat easier, when heating the meat press first (e.g. by placing it in an incubator of 50°C (122 °F) some hours prior testing)
4. **Number of samples:** The number of meat-samples that can be tested in one series is 9. The PremiTest incubator contains 10 holes. One hole should be reserved for the negative control.
5. Wash hands thoroughly before starting the test procedure.

8.2 Testing procedure
1. Cut out the required number of ampoules using a pair of scissors. Do not tear off ampoules, as this may damage the foil the adjacent ampoules. Any test with torn foil must be used immediately or discarded.
2. Mark the ampoules with a meat-sample identification code.
3. Remove foil carefully from the required amount of ampoules (do not open more ampoules than needed: after opening, the test can not be stored any longer).
4. Pick up a disposable pipette tip without touching the ends and place it on the syringe.
5. Use a new disposable tip on the syringe for each sample.
6. Pipette 100 µl of each muscle tissue juice sample to be tested into the labeled ampoules. Depress the plunger of the syringe till the first stop, dip the pipette tip into muscle tissue juice and let the plunger return slowly to its original position. Transfer the meat juice onto the agar of the labeled ampoule by depressing the plunger slowly and completely. Do not disturb the agar.
7. Pre-incubate the test 20 minutes at room temperature (18-25°C / 64 - 77°F)
8. Remove the muscle tissue juice by gently emptying the test, by putting the ampoule(s) upside down.
9. Wash the test two times, by gently filling and emptying the test ampoule with demineralized (demi) water.
10. Remove the last traces of water carefully from the test ampoule, by putting the ampoule up side down on a tissue.
11. Close the test ampoule with the foil supplied with the kit to avoid evaporation during incubation.
12. Incubate the test ampoule in the PremiTest incubator or water bath (64°C / 147°F) until the negative control changes color from purple to yellow. (See Section 6.3)
13. When the negative control has changed color (after approximately 3 hours), the ampoules can be read with the PremiScan.

8.3 Guideline to Determine the Removal of Samples from the Incubator
1. Interpreting result for screening by eye (color change) (NOTE: The EVALUATION WAS NOT INTENDED TO COVER THE USE OF THE EYE, but is included as a guideline for triggering the point at which the test samples should be removed from the incubator to be read by the PremiScan. GUIDELINE FOR TRIGGERING THE POINT AT WHICH THE TEST SAMPLES SHOULD BE REMOVED FROM THE INCUBATOR TO BE READ BY THE PREMISCAN)
2. Read the color only from the bottom 2/3 part of the ampoule.
3. A partly or completely yellow color of the agar medium indicates the absence of antibiotic residues in the corresponding meat sample at or above the levels indicated above. Such a result should be regarded as a negative result (reported as not found).
4. When the color change is "doubtful", incubate 5 minutes longer and read again. When the result is still not clear, test the sample again.

9. Operating instructions PremiScan
1. Place the PremiScan in the CD drive; the program will start up automatically.
2. Accept the license agreement by clicking on OK and the program will be ready to use.
3. Place the Kodak Q-60 Color chart, delivered with the PremiScan, on the scanner (HP Scanjet 7400 or 8200).
4. Calibrate the PremiScan with the Kodak Q-60 Color chart, by following the instructions of the software.
5. Put the ampoules to be tested in the templates, delivered with the PremiScan.
6. Place the black cloth over the templates.
7. The PremiScan recognizes the position of the ampoules automatically and determines the result of the ampoules.
8. Results can be printed.

10. Storage and Precautions
1. The PremiTest ampoules should be stored in a dry and cool place (preferable below 8°C / 46°F). Attention: **DO NOT FREEZE!** Ampoules should not be stored after the expiration date, indicated on the label.
2. Anything that may come in contact with the meat (hands, petri-dish etc.) must be cleaned thoroughly, rinsed with tap water and dried with a clean (paper) towel to avoid contamination with inhibiting substances like antibiotics, other drugs, cleaning agents or disinfectants.
3. Store the meat below 8°C (46°F) if it is not possible to carry out the test immediately. If it is not possible to test the meat within 48 hours, the sample should be stored at or below – 18 °C.

11. Technical Assistance: For assistance in use, interpretation, or troubleshooting unanticipated results of this test contact info.premitest@dsm.com. To facilitate the use of PremiTest there is a PowerPoint document available for all users.

12. Limited Liability
PremiTest is a screening test and as such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of color, in particular that of a yellow/purple result, may differ from person to person. In cases where severe consequences are involved for the user, test results should be confirmed by a validated comprehensive analytical method (like HPLC or LC-MS-MS).
DSM PremiTest B.V. and its affiliates shall not be held liable for, and customer shall indemnify DSM PremiTest B.V. against, any adverse consequences, damages, cost and expenses in connection with the use of the test beyond the replacement of proven faulty tests.

The above test has received AOAC approval for this test kit use in North America.

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE
LICENSE NUMBER 060601

Productnaam/Nom du produit	**PremiTest ampoules (verso)**
Productcode/Code du produit	0911
Id record product	33147
Formaat bijsluiter/Format notice	580x347
Formaat gepleid/Format plié	70x92 X
Nr.Dossier/N° Dossier	907397
Nr. Bestelling/N°Commande	4500171008/010
Nr. proef/N° épreuve	1
Datum/Date	13-11-2009 11:40

Nr Kleuren / N° Couleurs Recto : 1
Nr Kleuren / N° Couleurs Verso : 1
Black
Cad

GOLDPRINT nv
VALCAMPSLAAN 10
1934 HUIZINGEN
BEL. 02/363 89 79
FAX: 02/363 89 08

GoldPRINT
member of Copyprint Europe
www.goldprint.be
webproof.goldprint.be/Webproof/

GOED VOOR DRUK / BON A TIRER
.....20... TEK. / SIGN. .....

Annexe 1d. Agrandissement de la notice d'utilisation 0911 en français.

Premi® Test

AFNOR Validation

DSM - 28/1 - 06/06
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFAQ AFNOR Certification - www.afnor.org
Fin de validité : 30 août 2010

Test standardisé pour la détection de substances antimicrobiennes dans la viande (validé AFNOR), le poisson, les œufs, les reins, l'urine, le sang et l'alimentation animale . La marque AFNOR VALIDATION porte sur les viandes de bovin, de porc et de volaille. Notice 0911

Contenu du coffret
25 ampoules contenant du *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* enrobé dans un excipient solide de gélose, embouts de seringue jetables, film de protection perforé + seringue doseuse.

Description du produit
Premi®Test est un test de détection microbiologique à large spectre, spécialement mis au point pour la détection, dans la viande fraîche, le poisson ou les œufs, de la présence de substances antimicrobiennes telles que les résidus d'antibiotiques ou de sulfamides. à un niveau égal ou inférieur à la plupart des LMR (limite maximale de résidus).

Principe du test
Premi®Test est basé sur l'inhibition du développement de *Bacillus stearothermophilus*, un micro-organisme très sensible à de nombreux résidus d'antibiotiques et de sulfamides.
Un nombre standardisé de spores est enrobé dans un excipient de gélose contenant des nutriments sélectionnés. Lorsque le jus de viande aura été ajouté dans l'ampoule de Premi®Test et mis en incubation à 64°C, les spores vont germer. Ces spores germés vont se multiplier et acidifier le milieu **en l'absence** de substances inhibitrices. Ce qui se traduira par un changement de couleur de l'indicateur qui virera du violet au jaune.
Si les résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection), le germe test ne se développera pas et la couleur restera violette.
DSM Premitest vous propose des procédures de prélèvements d'échantillons d'œufs, de reins, d'urine, de sang et d'alimentation animale.

Précautions à prendre
Ce test est *extrêmement* sensible aux antibiotiques et autres substances inhibitrices : Il faut donc éviter tout risque de contamination par de telles substances. Il est conseillé de bien se laver les mains avant le test et de se les sécher avec du papier absorbant ou une serviette propre.

Utilisation
- Bien se laver les mains avant de commencer le test.
- Découper le nombre d'ampoules nécessaires avec une paire de ciseaux sans abîmer le film d'aluminium qui protège les ampoules voisines.
- Enlever prudemment le film de protection recouvrant le nombre d'ampoules souhaitées (ne pas ouvrir plus d'ampoules que nécessaire).
- Prendre environ 2 cm³ de viande maigre et utiliser une presse-viande pour en extraire environ 250 µl de jus de viande. Il est également possible d'obtenir du jus de viande à l'aide du Multipress ou en faisant congeler/décongeler la viande. (Un bulletin technique concernant le Multipress est disponible au www.premitest.com).
- Utiliser un nouvel embout jetable de seringue pour chaque prélèvement.
- Pipeter dans l'embout 100 µl de jus et le verser sur la gélose, sans la toucher.
- Laisser à température ambiante pendant 20 minutes pour une pré-incubation.
- Éliminer le jus de viande en remplissant puis en vidant deux fois de suite l'ampoule de test avec de l'eau déminéralisée. **Laver absolument à l'EAU DEMINERALISEE (pas d'eau du robinet!)**
- Il est important d'éliminer soigneusement le restant d'eau de l'ampoule.
- Fermer l'ampoule de test avec le film fourni pour éviter l'évaporation.
- Faire incuber l'ampoule de test dans un incubateur Premi®Test ou au bain-marie (64°C ± 0.5°C).
- Il est **FORTEMENT RECOMMANDE** de faire parallèlement un témoin négatif **par espèce**. Lire les résultats du test lorsque le témoin négatif aura changé de couleur (environ 3 heures).
- Tout le matériel nécessaire (presse-viande, ciseaux, thermomètre, incubateur, pipette et minuteur) est disponible dans le Starterkit Premi®Test.
- Pour faciliter une bonne utilisation du Premi®Test un document PowerPoint est à la disposition des utilisateurs.

Lecture des résultats du test
- Lire la couleur uniquement sur les deux tiers inférieurs de l'ampoule.
- Un changement de couleur évident (du violet au jaune) indique une absence d'antibiotiques / sulfamides à une concentration supérieure au seuil de détection.
- S'il n'y a aucun changement de couleur évident, cela indique une présence d'antibiotiques et/ou de sulfamides à une concentration supérieure ou égale au seuil de détection du test. Les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification.

Témoin négatif :
Utilisation d'un témoin négatif **par espèce FORTEMENT RECOMMANDE (voire OBLIGATOIRE pour le protocole validé AFNOR).** Lire quand le témoin négatif vire au jaune. Une lecture trop tardive entraîne une diminution de la sensibilité du test! (le témoin négatif, par ex., en congelant et en stockant du jus de viande ayant déjà donné un résultat négatif). **Ne surtout pas utiliser de l'eau comme témoin négatif !!!**

Témoin positif :
Il est recommandé de tester régulièrement un TEMOIN POSITIF (protocoles fournis sur demande) pour vérifier la bonne application du test. La régularité est à fixer par les utilisateurs du test. A conseiller lors de la 1ere utilisation et ensuite de temps en temps.

Conservation
Les ampoules doivent être conservées au frais (3 - 10°C). Attention : **NE PAS CONGELER** !

Responsabilité limitée
Premi®Test est un test de détection et en tant que tel, l'exactitude du test ne peut être garantie à 100%. De plus, l'évaluation de la couleur, et plus particulièrement celle du résultat violet/jaune, peut différer d'une personne à l'autre. En cas de conséquences graves pour l'utilisateur, les résultats du test devront être confirmés par une analyse exhaustive et homologuée. La responsabilité de DSM PremiTest B.V. et de ses filiales ne pourra être engagée, et le client exemptera DSM PremiTest B.V. de toute poursuite, de tout dédommagement, de tous frais et dépenses en rapport avec l'utilisation du test, DSM étant tout au plus tenu de remplacer les tests prouvés défectueux.

DSM

DSM PremiTest B.V. PO BOX 1163, 6160 BD Geleen LES PAYS-BAS
Website: www.premitest.com E-mail: info.premitest@dsm.com

Annexe 2. Certificat No. 060601.

AOAC RESEARCH INSTITUTE

LEADING THE WORLD IN PERFORMANCE-BASED VALIDATION

Certificate of *Performance Tested*[SM] Status

Certificate No. 060601

The AOAC Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit designated as:

Premi®Test

manufactured by

DSM Premi®Test B.V.
P.O. Box 6500
6401 JH HEERLEN
The Netherlands

has been reviewed under the AOAC Research Institute's *Performance Tested Methods*[SM] Program, and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the Certification Report. This certificate authorizes the manufacturer to display the AOAC *Performance Tested*[SM] certification mark along with the statement - "THIS TEST KIT'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned test kit for a period of one year from the date of this certificate (January 1, 2007 – December 31, 2007). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

Signed for AOAC Research Institute: Scott Coates

Scott G. Coates
Managing Director

CONTACT US

481 N. Frederick Ave, Suite 500, Gaithersburg, MD 20877-2417 ☎ +1 (301) 924-7077 +1 (301) 924-7089
HTTP://WWW.AOAC.ORG/TESTKITS/TESTKITS.HTML

Annexe 3a. Réclamation n°1.

DSM Nutritional Products DSM

DSM Premitest BV, Postbus 1163, 6160 BD Geleen, The Netherlands
Telephone (31) 464763573, Telefax (31) 464763740

E-mail

To:	
Company:	FAVV
For the attention of:	Ingrid vermeulen
Date:	21st of November 2007
Subject:	**Complaint Premi®Test 07H15**
From:	DSM Premitest
Name:	Françoise de Goeijen
Direct telephone line:	+31 46 4763573
E-mail:	info.premitest@dsm.com

Dear Ingrid Vermeulen,

We have received your complaint about the Premitest; batch number 07H15/16. We have reviewed our so-called "museum" samples of this batch as well as of batches produced before and hereafter. The following conclusion has been made:

Last September production has made a small process change that turned out to have an impact on the stability of the Premitest. As this 'new' process is a well established process for other products that were considered comparable, we didn't investigate the stability issue. This turned out to be a mistake. Some 25% of the production since then shows inadequate stability, in particular regarding the Sulphadiazine sensitivity.

As corrective action DSM will immediately roll back to the former process. The new batch is already planned for production this week and will arrive in our warehouse as from week 49. This will be the next batch you will be delivered.

We regret the inconvenience and we hope you will be continuing being satisfied with the consistency of the Premitest results as from the new batch.

Best regards,

DSM Premitest

Françoise de Goeijen
DSM Nutritional Products
DSM Premitest
New Business Development, ANH

Annexe 3b. Réclamation n°2.

DSM Nutritional Products DSM

DSM Premitest BV, Postbus 1163, 6160 BD Geleen, The Netherlands
Telephone (31) 464763573, Telefax (31) 464763740

E-mail

To:	
Company:	Central Science Laboratory
For the attention of:	David Tyler
Date:	10th of December 2007
Subject:	**Complaint Premi®Test 07H15**
From:	DSM Premitest
Name:	Françoise de Goeijen
Direct telephone line:	+31 46 4763573
E-mail:	info.premitest@dsm.com

Dear Mr Tyler,

We have received your complaint about the Premitest; batch number 07H15/16. We have reviewed our so-called "museum" samples of this batch as well as of batches produced before and hereafter. The following conclusion has been made:

Last September production has made a small process change that turned out to have an impact on the stability of the Premitest. As this 'new' process is a well established process for other products that were considered comparable, we didn't investigate the stability issue. This turned out to be a mistake. Some 25% of the production since then shows inadequate stability, in particular regarding the Sulphadiazine sensitivity.

As corrective action DSM will immediately roll back to the former process. The new batch is already planned for production this week and will arrive in our warehouse as from week 49. This will be the next batch you will be delivered.

We regret the inconvenience and we hope you will be continuing being satisfied with the consistency of the Premitest results as from the new batch.

Best regards,

DSM Premitest

Françoise de Goeijen
DSM Nutritional Products
DSM Premitest
New Business Development, ANH

Annexe 3c. Réclamation n°3.

DSM Nutritional Products DSM

DSM Premitest BV, Postbus 1163, 6160 BD Geleen, The Netherlands
Telephone (31) 464763573, Telefax (31) 464763740

E-mail

To:	
Company:	NORSON ALIMENTOS/NORSON FOODS
For the attention of:	ING. FERNANDO BEDOLLA CONTRERAS
Date:	21st of November 2007
Subject:	**Complaint Premi®Test 07H15**
From:	DSM Premitest
Name:	Françoise de Goeijen
Direct telephone line:	+31 46 4763573
E-mail:	info.premitest@dsm.com

Dear Fernando,

We have received your complaint about the Premitest; batch number 07H15/16. We have reviewed our so-called "museum" samples of this batch as well as of batches produced before and hereafter. The following conclusion has been made:

Last September production has made a small process change that turned out to have an impact on the stability of the Premitest. As this 'new' process is a well established process for other products that were considered comparable, we didn't investigate the stability issue. This turned out to be a mistake. Some 25% of the production since then shows inadequate stability, in particular regarding the Sulphadiazine sensitivity.

As corrective action DSM will immediately roll back to the former process. The new batch is already planned for production this week and will arrive in our warehouse as from week 49. This will be the next batch you will be delivered.

We regret the inconvenience and we hope you will be continuing being satisfied with the consistency of the Premitest results as from the new batch.

Best regards,

DSM Premitest

Françoise de Goeijen
DSM Nutritional Products
DSM Premitest
New Business Development, ANH