



**DOSSIER DE RECONDUCTION DE LA
CERTIFICATION NF VALIDATION DU PREMI® TEST
(R-BIOPHARM) :**

**TEST DE DETECTION DES RESIDUS
D'ANTIBIOTIQUES
DANS LE MUSCLE**

VERSION 1 du 03/05/2022

Rédigé par Valérie GAUDIN

Contenu

1. UN RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE	4
1.1. Principe de la méthode alternative	4
1.2. Domaine d'application	4
1.3. Protocole d'utilisation de la méthode alternative	4
1.4. Notice d'utilisation	6
2. PRINCIPAUX RESULTATS DE LA VALIDATION INITIALE (2006)	7
2.1. Praticabilité.....	7
2.2. Sensibilité (limites de détection)/Spécificité.....	8
2.3. Comparaison de la méthode alternative et de la méthode de référence :.....	9
2.4. Conclusions de l'étude préliminaire.....	13
2.5. Etude collaborative.....	13
3. PRINCIPAUX RESULTATS DES RECONDUCTIONS EN 2010, 2014 et 2018/2019.....	15
3.1. Reconduction en 2010.....	15
3.2. Reconduction en 2014.....	17
3.3. Reconduction en 2018/2019	17
3.3.1. Résumé du protocole de l'étude complémentaire	17
3.3.2. Résumé des résultats de l'étude complémentaire.....	22
4. UNE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
4.1. Synthèse des publications apportant des informations sur la performance de la méthode alternative :	27
4.2. Bilan des validations externes réalisées par d'autres organismes qu'AFAQ AFNOR Certification (date, organisme, nature du protocole de validation, indication de la méthode de référence).....	31
5. UN BILAN DES RECLAMATIONS UTILISATEURS	34
6. UN ETAT DES MODIFICATIONS INTERVENUES DEPUIS LA PRECEDENTE VALIDATION.....	34
7. UNE PRESENTATION DES MODIFICATIONS EVENTUELLES ENVISAGEES DANS LA METHODE ALTERNATIVE.....	35
8. UN PROJET DE COMPLEMENT D'ETUDE DE VALIDATION SI NECESSAIRE	35
10. CONCLUSIONS	35
11. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	37
12. ANNEXES	40
Annexe 1. Certificat No. RBP 31/02 – 04/11.	41
Annexe 2a. Notice d'utilisation 1011 (29/11/2010).....	47

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du
Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Annexe 2b. Notice d'utilisation 1011 (15/10/2014).....	48
Annexe 2c. Notice d'utilisation 1011 Recto (21/03/2019).....	49
Annexe 2d. Notice d'utilisation 1011 Verso (21/03/2019).	50
Annexe 2e. Agrandissement de la notice d'utilisation 1011 en français (21/03/2019).....	51
Annexe 2f. Notice d'utilisation 1011 en anglais : changements entre les notices 15/10/2014 et 21/03/2019).	53
Annexe 3. Certificat No. 060601 d'Octobre 2021.	55
Annexe 4. Tableau de synthèse des réclamations depuis 2018/2019.	58
Annexe 5. Limites de détection du Premi®Test annoncées par le fabricant.....	59

1. UN RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE

- Date de 1^{ère} certification NF VALIDATION: 15 Juin 2006.
- Date de la dernière reconduction dans le cadre de la marque NF VALIDATION: 21 Mars 2019.
- Date de fin de validité : 30 Août 2022.

L'attestation de la certification NF VALIDATION RBP 31/02-04/11 est présentée en [Annexe 1 \(2019\)](#).

La société r-Biopharm AG (Darmsdat, Allemagne) est responsable de la commercialisation du kit Premi®Test.

1.1. Principe de la méthode alternative

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

1.2. Domaine d'application

Le kit Premi®Test est applicable pour la détection des résidus d'antibiotiques dans la viande, le poisson, les œufs, les reins, l'urine, le sang et l'alimentation animale.

Il est bien indiqué sur la notice que « la marque AFNOR VALIDATION porte sur les viandes de bovin, de porc et de volaille ».

1.3. Protocole d'utilisation de la méthode alternative

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. La fin de l'incubation se fait au virage du contrôle négatif qui est de la même nature que l'échantillon et qui doit se produire au bout de 4h max.

Figure 1. Instructions illustrées pour le Premi®Test.

Instructions illustrées pour l'ampoule Premi®Test

	1. Coupez le nombre d'ampoules nécessaire avec une paire de ciseaux ; attention à ne pas endommager l'emballage métallique des ampoules restantes.		5. Evacuez le jus de viande en lavant le test deux fois avec de l'eau déminéralisée et séchez attentivement le test ensuite.
	2. Prélevez environ 2cm ³ de viande maigre et utilisez une presse à viande pour extraire environ 250µl de jus de viande.		6. Fermez l'ampoule de test avec son emballage.
	3. Transvasez lentement au moyen d'une pipette 100µl de jus de viande sur la gélase dans l'ampoule. N'altérez pas la gélase.		7. Préchauffez le bloc chauffant de l'incubateur DSM à la température requise de 64.0°C (ou 147°F). Mettez l'ampoule dans l'incubateur pendant environ 3 heures.
	4. Laissez reposer à température ambiante pendant 20 minutes pour la prédiffusion.		8. Retirez l'ampoule du bloc chauffant après le changement de couleur du témoin de contrôle négatif.

Echantillon de viande →



Négatif → Apparition de bactéries →

Changement de couleur



Echantillon de viande →



Positif → Pas de bactérie →

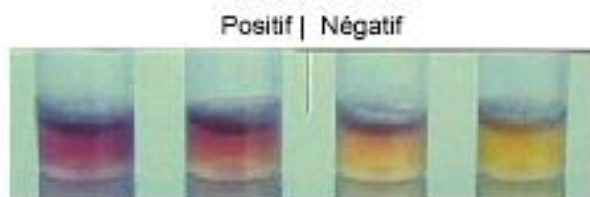
Pas de changement de couleur



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.



Le coffret permet indifféremment d'analyser un seul échantillon ou une grande quantité d'échantillons de viande.

1.4. Notice d'utilisation

La validation initiale en 2006 a porté sur le protocole suivant : Notice **0609**.

En 2010, la reconduction a porté sur la notice suivante : Notice **0911**. Seul le nom avait changé DSM Premi®Test.

Figure 3. Logo du Premi®Test.



En 2014, la reconduction a porté sur la notice suivante : **Notice 1011 du 29/11/2010**(cf. [Annexe 2a](#)).

En 2018/2019, la reconduction a porté sur la notice suivante : **Notice 1011 (15/10/2014)** ([Annexes 2b](#)).

Aujourd'hui, la reconduction porte sur la notice suivante : **Notice 1011 (21/03/2019)** ([Annexes 2c à 2e](#)).

Aucun changement n'a été apporté dans le protocole depuis la première validation.

Les changements apportés à la notice de 2014 suite aux recommandations du Bureau Technique en 2019 sont soulignés en jaune et présentés en [Annexe 2f](#). Il s'agit essentiellement de retirer les matrices autres que la viande fraîche du titre et de la description du produit, pour éviter des confusions pour les utilisateurs quant au champ de la certification AFNOR. De plus, l'utilisation d'un contrôle négatif pour le temps de lecture et d'un contrôle positif sont passés de « recommandé » à « demandé et obligatoire pour le protocole certifié AFNOR » pour le contrôle négatif et de « recommandé » à « fortement recommandé » pour le contrôle positif. De plus, une attention particulière est demandée dans la notice sur le temps de lecture par rapport au contrôle négatif (paragraphe « Contrôle Négatif ») pour éviter d'augmenter les capacités de détection et donc perdre en sensibilité.

Ces changements ne remettent pas en cause le principe du test, son protocole ou ses performances.

2. PRINCIPAUX RESULTATS DE LA VALIDATION INITIALE (2006)

La validation initiale a été réalisée par le laboratoire expert (Anses, ex. AFSSA).

2.1. Praticabilité

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

Tableau 1. Praticabilité du Premi®Test.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
1	Emballage	Emballage ou notice	1 boîte 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
4	Mode d'utilisation après la 1 ^{ère} utilisation	Emballage ou notice	Notice : A stocker au frais (<8°C). NE PAS CONGELER
5	Equipement ou locaux spécifiques	Notice	Incubateur r-Biopharm ou bain-marie (64°C)
6	Réactifs prêts à l'emploi ou réactifs à préparer	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 attestation et	<i>Environ 5 heures entre le début de préparation des échantillons et la lecture des résultats pour 15 à 20 échantillons.</i>

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

10	Type de qualification d'un technicien	Rapport	Qualification requise inférieure à la méthode de référence (car réactifs prêts 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°)

2.2. 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. 6 antibiotiques dont 2 beta-lactamines (1 pénicilline et 1 céphalosporine) ont été testés. Chaque antibiotique choisi a été testé à 3 concentrations différentes. 5 aliquots par antibiotique et par concentration (chaque concentration en 5 exemplaires) ont été analysés 1 fois seulement par la méthode alternative.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2. Limites de détection pour 6 antibiotiques.

Famille	SULFAMIDE	TETRACYCLINE	MACROLIDE	BETA-LACTAMINE	AMINOSIDE	BETA-LACTAMINE
Antibiotique	Sulfadimérazine	Oxytétracycline	Tylosine	Amoxicilline	Gentamicine	Ceftiofur
LMR (muscle) (µg/kg)	100	100	100	50	50	1000
Concentrations (µg/kg)	50/100/200	50/100/200	50/100/200	25/50/100	50/100/200	100/200/400
Nombre d'échantillons positifs concentration 1 (la plus basse)	0 / 5	3 / 5	4 / 5	5 / 5	0 / 5 (LMR)	2 / 5
Nombre d'échantillons positifs concentration 2 (médiane)	1 / 5 (LMR)	4 / 5 (LMR)	5 / 5 (LMR)	5 / 5 (LMR)	2 / 5 (2 x LMR)	1 / 5
Nombre d'échantillons positifs concentration 3 (la plus haute)	5 / 5 (2 x LMR)	5 / 5 (2 x LMR)	5 / 5 (2 x LMR)	5 / 5 (2 x LMR)	3 / 5	5 / 5
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 proche de la Limite Maximale de Résidu (LMR) correspondante, soit inférieure ou égale (béta-lactamines, macrolides), soit égale à 2 fois la LMR (sulfamides, tétracyclines). 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.

2.3. 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 3. 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 ») (test statistique de Mc Nemar). 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'AFSSA 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 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.

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*. Tous les échantillons positifs avec le Premi®Test et/ou la boîte *Bacillus cereus* ont été transmis par les LVD à l'Anses. Tous les échantillons réceptionnés à l'Anses ont été codifiés afin de réaliser les analyses en aveugle avec la méthode des 4 boîtes, le Premi®Test, la boîte *Bacillus cereus* et la méthode STAR (méthode 5 boîtes développée et validée par l'Anses en tant que Laboratoire de Référence de l'Union Européenne). Une des boîtes de la méthode STAR est la boîte *Bacillus cereus* utilisée par les LVD. La plupart des échantillons positifs avec au moins une des méthodes microbiologiques (Premi®Test, 4 Boîtes ou méthode européenne STAR) ont été analysés en CL/SM-SM (78 % des échantillons). Pour des raisons de coût, certains échantillons positifs ou douteux n'ont pu être confirmés en LC-MS/MS.

Note : La méthode LC-MS/MS a été choisie pour confirmer les échantillons, même si le principe est totalement différent de celui de la méthode alternative, car au niveau réglementaire, seules les méthodes de type LC-MS/MS sont reconnues pour confirmer des échantillons positifs à l'étape du dépistage.

Protocole de préparation de la boîte *Bacillus cereus* :

Ensemencer le milieu gélosé Test agar à pH 6 (milieu déshydraté MERCK, référence 10663) préalablement fondu refroidi entre 45°C et 55°C avec la suspension de spores (*Bacillus cereus* ATCC 11778 (Institut Pasteur) préalablement diluée dans de l'eau physiologique peptonée, de façon à obtenir une concentration finale de 3×10^4 spores/ml de milieu. Répartir 5 ml de milieuensemencé dans une boîte de Pétri placée sur une surface froide et horizontale. Le tableau suivant résume les résultats

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du
Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

obtenus au niveau des LVD, puis à l'AFSSA avec le Premi®Test, la méthode des 4 Boîtes, la méthode STAR et la méthode de confirmation par CL/SM-SM.

Tableau 4. 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
	Nombre positifs LVD Bacillus cereus	7	7	3	0	0
AFSSA	Nombre échantillons analysés à l'AFSSA	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
AFSSA 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 Boîtes vis à vis d'un certain nombre d'antibiotiques, puisque le nombre de positifs 4 Boîtes 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 Boîtes.

Toutefois, pour une partie des échantillons positifs en Premi®Test analysés ensuite en CL/SM-SM, aucun résidu d'antibiotique n'a été retrouvé. Certains de ces échantillons sont probablement des résultats faux-positifs du Premi®Test, c'est-à-dire des échantillons exempts de résidus d'antibiotiques. Toutefois on ne peut connaître précisément le taux de « faux-positifs » du Premi®Test car la déclaration de conformité de la méthode LC-MS/MS peut avoir 2 origines 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. Ceci ne remet pas en question les performances de la méthode LC-MS/MS qui a été validée pour une liste d'antibiotiques.

Le Premi®Test a été utilisé, au niveau des LVD comme au niveau de l'AFSSA, 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.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

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'AFSSA :

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 dû 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'AFSSA pour les échantillons retrouvés positifs avec la méthode CL/SM-SM à l'AFSSA :

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%. Toutefois, 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 et donc on ne peut donner qu'un taux de faux-positif maximum, qui peut être sur-évalué.
- 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.
- 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.

2.4. Conclusions de l'étude préliminaire

- Les 3 phases de cette étude de validation AFNOR du Premi®Test ont permis de réunir une grande somme de données et de résultats sur les performances du Premi®Test dans un 1^{er} 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 termes 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.

2.5. Etude collaborative

L'étude collaborative 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. De même, le laboratoire expert a effectué les analyses avec le Premi®Test uniquement.

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 5. Résultats par niveau de contamination

Paires	Niveaux	Concentrations (µg/kg)	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs	% de résultats positifs	
Porc oxytétracycline	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 sulfadimérazine	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.

Certains laboratoires ont obtenu des résultats faux-positifs au niveau L0 pour le matériau porc ceftiofur (2 laboratoires) et le matériau bœuf sulfadimérazine (3 laboratoires). Lors de la phase 1 de l'étude préliminaire, un taux de faux-positifs de 18 % avait déjà été observé qui n'a pas été retrouvé lors de la phase 2 (0 %). Le Premi®Test peut potentiellement donner des résultats faux-positifs, c'est pourquoi une confirmation par méthode physico-chimique est fortement recommandée (voir notice annexe 2c).

D'une façon générale les résultats de l'étude collaborative sont très satisfaisants. On retrouve les mêmes types de résultats que lors de l'étude préliminaire en termes 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 termes 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 de la validation AFNOR ont été publiés dans un journal scientifique international par le laboratoire expert (Gaudin et al. 2008).

Tableau 6. Tableau récapitulatif des performances du Premi®Test.

	Etude préliminaire	Etude collaborative
Phase 1 Jus de viande de porc supplémentés	Limites de détection : sulfadimérazine 2*LMR, oxytétracycline 2*LMR, tylosine 1*LMR, amoxicilline 0.5*LMR, gentamicine > 2*LMR et ceftiofur 0.5*LMR. Taux de faux-négatifs à 2 fois la LMR =8% et taux de faux-positifs = 18%.	9 laboratoires participants. Spécificité = 95.3 % Sensibilité au niveau L3 = 72,5%. Répétabilité avec pourcentages moyens de 94,8% et 92,7 % et reproductibilité de 89,1 %.
Phase 2 Muscles de porc naturellement chargés	100 % positifs pour 3 échantillons contenant : Oxytétracycline / Sulfadiméthoxine 7.6*LMR / 1.5*LMR, amoxicilline 5*LMR et tylosine 7.5*LMR. taux de faux-positifs = 0 %.	
Phase 3 Echantillons de muscle provenant du terrain (analyses officielles)	Taux de faux-positifs de 30 % au maximum. Taux de faux-négatifs 4%. Meilleure détection des Bétalactames et des Sulfamides.	

3. PRINCIPAUX RESULTATS DES RECONDUCTIONS EN 2010, 2014 et 2018/2019

3.1. Reconduction en 2010

Depuis la validation initiale en 2006, aucune modification n'était intervenue dans la méthode alternative, par **contre la méthode de référence avait été partiellement modifiée en 2008**. Dans cette nouvelle version de la méthode des 4 Boites (version 5), seule la boîte Bs7.4 a été remplacée par MI7.4. Des essais avaient été réalisés par le laboratoire expert afin d'évaluer les conséquences de ces modifications sur la sensibilité de la méthode de référence. **Le laboratoire expert a conclu que ces changements avaient eu une influence mineure sur la sensibilité de la méthode de référence et n'avaient pas d'impact sur la comparaison de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence**. Toutefois, afin de statuer sur la reconduction de la méthode, le bureau technique avait **demandé de présenter les données de validation** qui avaient permis au laboratoire expert de mettre en évidence l'équivalence de l'ancienne et de la nouvelle méthode de référence.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Les conclusions globales de la validation AFNOR 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 de la méthode des 4 Boites était meilleure pour les tétracyclines.

Auparavant, la méthode des 4 Boites n'avait pas été validée selon des critères de performance. Cette nouvelle boîte MI7.4, ainsi que les 3 autres ont à présent été validées pour les muscles de bovin, ovin, porcin et volaille suivant la décision européenne EC/2002/657 (Commission 2002).

Les capacités de détection (ou $CC\beta$) ont été déterminées à partir de 60 échantillons de muscle bovin par antibiotique validé (échantillons de muscle broyés, supplémentés, puis congelés). La boîte 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 bêta-lactamines sur cette même boîte (c'est-à-dire pénicilline G, cloxacilline, dicloxacilline et 6 céphalosporines dont le cefalonium) n'ont été modifiées. De même, les sensibilités des boîtes Bs8 et MI8 n'ont pas variées puisque les boîtes n'ont pas été modifiées. Seule la boîte Bs7.4 a été remplacée par MI7.4. Donc, seule la sensibilité par rapport aux sulfamides, à certaines bêta-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. Si on compare les résultats de la validation de 2009 avec ceux de la validation AFNOR de 2006, on remarque que :

- La méthode des 4 Boites présente toujours un défaut de détection de certains sulfamides ($> 7.5 * LMR$). **Donc, la sensibilité de la boîte MI7.4 n'a pas été améliorée par rapport à celle de Bs7.4 pour la sulfadimethoxine et le changement de boîte ne remet pas en cause la comparaison 4 Boites/Premi®Test de la validation AFNOR de 2006.** De plus, le Premi®Test est aussi capable de détecter la SDMX à 760 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (100 % des laboratoires dans l'étude collaborative) et même à la LMR (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (phase 1). **Donc, la sensibilité de la boîte MI7.4 n'a pas été améliorée par rapport à Bs7.4 pour la tylosine et ce changement ne remet pas en cause la comparaison 4 Boites/Premi®Test de la validation AFNOR de 2006.** La MA reste plus sensible que la MR pour la tylosine.

NB : La sensibilité de la méthode des 4 Boites pour l'amoxicilline via la boîte MI7.4 est légèrement meilleure que celle de la boîte MI8, mais le $CC\beta$ est resté fixé à la LMR (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), donc identique entre l'ancienne MR et la nouvelle MR. Toutefois, le seuil de détection du Premi®Test pour l'amoxicilline est au minimum de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 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 boîte Bs7.4.

En conclusion, le laboratoire expert après étude des résultats de la validation AFNOR de 2006 et de la validation de la méthode des 4 Boites nouvelle version de 2009 a conclu que le changement de boîte 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** de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence.

3.2. Reconduction en 2014

En 2014, aucune étude supplémentaire n'a été réalisée au niveau technique, puisque ni la méthode de référence, ni la méthode alternative, ni le référentiel n'avaient été modifiés. La reconduction a été accordée sur la base du dossier de reconduction, incluant les principaux résultats des essais réalisés pour la reconduction en 2010, la nouvelle étude bibliographique (2010-2014) et les réclamations fournisseurs (2010-2014).

3.3. Reconduction en 2018/2019

Etant donné **la modification importante dans le référentiel de validation selon la marque NF VALIDATION, un complément d'étude a été proposé par le laboratoire expert pour reconduire la validation du Premi®Test selon la marque NF VALIDATION.** Le référentiel de validation AFNOR spécifiquement adapté aux méthodes de détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires validé en 2005 (révision 0, validée le 10/05/2005), a été révisé en 2017. Le nouveau référentiel « Protocole de validation des méthodes de détection et de quantification des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits agroalimentaires » (révision n°01, Juin 2017) propose un principe de validation des kits complètement différent. Le référentiel de 2005 était basé sur la comparaison d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. **Le référentiel de 2017 est basé sur la détermination de caractéristiques de performance, qui sont ensuite comparées à des critères de performance pré-établis, suivant la réglementation européenne (European Commission. 2002, Crl 2010).**

NB : La certification AFNOR a été accordée initialement pour les muscles de bœuf, porc et volaille. L'étude complémentaire de reconduction a été réalisée dans les muscles de bœuf, porc et volaille, après une évaluation préliminaire des concentrations à tester dans le muscle de bœuf. La durée d'incubation peut varier légèrement entre les muscles des différentes espèces animales, ce qui implique de mettre un témoin négatif par espèce sur chaque incubateur. Dans le cas contraire, l'évaluation des capacités de détection (CC β) pourrait être perturbée (CC β surestimés) ([Annexe 5](#)).

3.3.1. Résumé du protocole de l'étude complémentaire

L'étude de validation a été faite sur des jus de viande préalablement congelés pour des raisons de praticabilité des études de validation. **Le fabricant s'est engagé à indiquer que la détermination des capacités de détection a été réalisée dans des jus de viande et non dans la viande comme prévu dans le protocole et à écrire que les performances peuvent être moins bonnes dans la viande ([Annexe 2e](#)) :** « Les valeurs de CC β ont été déterminées en réalisant des ajouts dosés dans du jus de viande. Les capacités de détection dans d'autres échantillons peuvent différer. »

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Les lectures ont été réalisées lors du virage de la couleur violette à jaune du témoin négatif ce qui a correspondu à un temps $T=0$.

a) Evaluation des concentrations cible de dépistage (CCD) dans le muscle de bœuf

Avant de pouvoir déterminer les capacités de détection $CC\beta$, il faut déterminer les concentrations cible de dépistage (CCD). Lors de la validation, les échantillons seront supplémentés à la CCD pour déterminer la capacité de détection $CC\beta$. L'évaluation des CCD a été réalisée uniquement dans du muscle de bovin. Cette matrice a été choisie car c'est celle qui donne toujours le $CC\beta$ le plus élevé (données du fabricant).

La supplémentation des jus de viande a été réalisée avec des solutions d'antibiotiques avec au final 5% de la solution de travail dans le jus. Chaque jus a été supplémenté le jour de l'essai.

Chaque antibiotique choisi a été testé à au moins une concentration cible pour chaque matrice, en vue de déterminer le $CC\beta$. Le choix de la concentration cible doit permettre de s'approcher au plus près des performances réelles de la méthode de dépistage. Le choix de la concentration cible est basé sur les limites autorisées des antibiotiques (Limite Maximale de Résidu (LMR)) concernées dans le muscle, sur les capacités de détection annoncées par le fournisseur de kits et/ou sur des études précédentes réalisées dans d'autres laboratoires si elles existent.

L'évaluation a démarré au $CC\beta$ déterminé par le fabricant (**Tableau 7**). Quand le taux de faux-négatif obtenu était équivalent à 0, nous avons choisi cette concentration pour la validation. Quand le taux de faux-négatif était supérieur à 5%, nous avons augmenté les concentrations par palier de 20 à 25%. Quand le taux de faux-négatif était inférieur à 5%, la concentration a été abaissée afin de s'approcher au plus près du $CC\beta$ réel.

b) Capacités de détection ($CC\beta$)

La capacité de détection $CC\beta$ est la concentration qui donne au maximum 5% de résultats faux-négatifs. Les capacités de détection de 12 antibiotiques ont été déterminées dans les muscles de bovin, porcine et de volaille (**Tableau 8**).

Le Premi®Test cible plusieurs familles d'antibiotiques (test à large spectre) : La capacité de détection doit être déterminée en se référant, chaque fois que pertinent, au tableau en annexe 1 du référentiel AFNOR (Certification 2017) qui donne la liste des 15 antibiotiques à utiliser a minima pour un test à large spectre, dans le muscle.

NB : Six antibiotiques du tableau en annexe 1 du référentiel AFNOR (Certification 2017) ont été exclus de la détermination des $CC\beta$. En effet, le fabricant estime que la sensibilité n'est pas suffisante pour ces molécules. Le fabricant s'est engagé à indiquer dans la notice que ces 6 antibiotiques (tiamuline, lincomycine) ou familles d'antibiotiques (quinolones, aminosides, céphalosporines) sont exclus du spectre de validation NF : « Les céphalosporines, les aminosides, les amphénicolés, les quinolones, la tiamuline et la lincomycine sont détectées au-dessus de la limite maximale de résidu (LMR). »

Selon la décision CE/2002/657 (European Commission. 2002), au moins 20 tests doivent être effectués pour au moins un niveau de concentration en vue d'obtenir une base fiable pour cette détermination.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Dans ce cas, la capacité de détection de la méthode est égale au niveau de concentration où il ne reste que 5 % ou moins de résultats négatifs, soit au maximum 1 négatif sur 20 échantillons chargés.

La détermination du nombre d'échantillons à analyser a été faite suivant le guide de validation des méthodes de dépistage.

- Si le $CC\beta \leq$ à la $\frac{1}{2}$ LMR : Analyse de 20 échantillons
- Si le $CC\beta$ est compris entre la $\frac{1}{2}$ LMR et 90% de la LMR : Analyse de 40 échantillons
- Si le $CC\beta$ est supérieur à 90% de la LMR : Analyse de 60 échantillons.

Dans le cas des **12 antibiotiques à valider** pour ce complément d'étude, le nombre d'échantillons à tester a été déterminé comme suit dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Test à large spectre : 12 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces (bovin, porc, volaille).

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CC β fabricant ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nb ech
BETA-LACTAMINES	Pénicilline G	50	2.5	20
	Amoxicilline	50	5	20
	Cloxacilline	300	150	20
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Epimère CTC	100	100 Inconnu	60 Inconnu
	Oxytétracycline Epimère OTC	100	100 Inconnu	60 Inconnu
	Doxycycline	100	100	60
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100	75	40
	Sulfadiazine	100	75	40
MACROLIDES	Erythromycine A	200	100	20
	Tylosine	100	50	20

Chaque $CC\beta$ a été déterminé à partir d'au moins 3 lots différents de kit (un lot fraîchement produit, un lot proche de la date de validité et un lot intermédiaire). Les N échantillons à analyser ont été répartis de façon équitable entre les différents lots.

- Lot 18E28/16 expire le 28/02/2019,
- Lot 18G16/16 expire le 16/04/2019,
- Lot 18I19A16 expire le 19/06/2019.

Le nombre total d'échantillons à analyser pour chaque antibiotique a été réparti équitablement entre les 3 espèces à tester (ie. Bœuf, porc et volaille) (**Tableau 8**).

Tableau 8. Répartition des espèces et du nombre d'échantillons à analyser.

	Antibiotique	Nombre d'échantillons / espèces				CCD µg.kg ⁻¹	LMR µg.kg ⁻¹	Nb d'échantillons
		Bœuf	Porc	Poulet	Dinde			
AB1	Pénicilline G	7	7	3	3	6	50	20
AB2	Amoxicilline	7	7	3	3	11	50	20
AB3	Cloxacilline	7	7	3	3	150	300	20
AB4	CTC	20	20	10	10	160	100	60
AB5	Epimère CTC	20	20	10	10	500	100	60
AB6	OTC	20	20	10	10	160	100	60
AB7	Epimère OTC	20	20	10	10	500	100	60
AB8	Doxycycline	20	20	10	10	100	100	60
AB9	Sulfadiméthoxine	13	13	7	7	75	100	40
AB10	Sulfadiazine	13	13	7	7	90	100	40
AB11	Erythromycine A	20	20	10	10	200	200	60
AB12	Tylosine A	13	13	7	7	90	100	40
BI	Blanc	20	20	10	10			60
								600

AB= Antibiotique CTC=Chlortétracycline OTC=Oxytétracycline LMR= Limite maximale de résidus

c) Taux de faux positifs

Le taux de faux positifs reflète la capacité de la méthode à garantir que des échantillons négatifs sont vraiment négatifs. L'analyse sert à mettre en évidence des interférences de la matrice (substances endogènes, constituants de la matrice, etc.).

60 échantillons de matrice blanche (muscle de bœuf, de porc et de volaille) de différentes origines (dépourvue de résidus d'antibiotiques ou autres substances à activité antibactérienne) seront analysés selon le protocole du fabricant avec la méthode de dépistage à valider.

Pour les échantillons de matrices blanches, le taux de faux-positifs est déterminé comme suit :

Taux de faux-positifs = nombre de résultats positifs / nombre d'échantillons blancs analysés x 100.

d) Applicabilité

La demande de reconduction porte sur les muscles de bœuf, de porc et de volaille. Comme expliqué au début du projet d'étude, l'applicabilité a déjà été démontrée en 2006 lors des études préliminaire et collaborative et n'est pas remise en question. **Toutefois elle sera retestée dans ce complément**

d'étude, grâce à la détermination d'un CCβ commun aux 3 espèces pour chaque antibiotique et la spécificité commune.

e) Robustesse

Les objectifs de l'étude de robustesse sont d'observer les conséquences de l'introduction délibérée de variations raisonnables mineures par le laboratoire. Les variations mineures sont de l'ordre de grandeur de variations qu'on peut couramment rencontrer en routine dans un laboratoire (10 à 20 % de variation). La première étape est de choisir des facteurs du pré-traitement de l'échantillon et de l'analyse, qui pourraient influencer les résultats de mesure. De tels facteurs peuvent inclure l'analyste, la source et l'âge des réactifs, les solvants, les standards et les extraits d'échantillon, la température, le pH, etc.

Les lectures (CCβ, spécificité) seront réalisées quand le témoin négatif de l'espèce correspondante aura viré au jaune, puis 5 et 10 minutes après. L'interprétation de ces lectures à des temps différents sera intégrée dans l'étude de robustesse.

Sur la base des informations fournies par le fabricant et en fonction du type de test, le Laboratoire expert a déterminé les 3 facteurs suivants comme pertinents à vérifier :

- Température d'incubation ($64\text{ ° C} \pm 0,5\text{ ° C}$)
- Volume d'échantillon ($100\mu\text{l} \pm 10\mu\text{l}$)
- Pré-incubation de jus de viande sur l'agar ($20\text{ min} \pm 1\text{ min}$)
- Qualité bactériologique des échantillons (laisser les échantillons sur la paillasse 6 heures environ à température ambiante, avant de les analyser).

Quand les intervalles sont spécifiés par le fabricant, on a testé les tolérances annoncées (eg. Température d'incubation). Quand les intervalles ne sont pas spécifiés par le fabricant, les facteurs testés ont été modifiés dans un ordre de grandeur qui correspond à des déviations usuelles.

Nous avons analysé :

- 3 échantillons différents de matrice blanche (muscle de bœuf),
- 3 échantillons différents de matrice blanche (muscle de bœuf) supplémentés avec une substance (A) (une pénicilline) au niveau ou juste au-dessus de la capacité de détection (CCβ) (maximum + 20 %).
- 3 échantillons différents de matrice blanche (muscle de bœuf) supplémentés avec une substance (B) (une tétracycline) au niveau ou juste au-dessus de la capacité de détection (CCβ) (maximum + 20 %).

Les substances pour supplémentation ont été choisies pour être représentatives de la série d'analytes considérés. L'étude de robustesse a été menée sur différents jours.

f) Echantillons naturellement chargés (terrain)

Le laboratoire expert a collecté **au moins 20 échantillons naturellement chargés**, qui avaient donné des résultats positifs dans des laboratoires du terrain dans le cadre des plans de contrôle (PSPC). Ces échantillons envoyés au laboratoire expert ont été analysés pour confirmation en CL-SM/SM. Les concentrations de ces échantillons devaient être les plus pertinentes possibles, c'est-à-dire au-dessus

du CC β mais au plus près (maximum 20% de plus), et en lien avec les LMR respectives. Ces échantillons ont aussi été analysés avec le Premi®Test en triple et en aveugle par le laboratoire expert.

3.3.2. Résumé des résultats de l'étude complémentaire

Tous les essais ont été réalisés en aveugle. La lecture a été réalisée lors du virage de la couleur violette à jaune du témoin ce qui a correspondu à un temps T=0.

Les résultats ont été exprimés de 2 façons : positif (+), négatif (-). Les résultats douteux (+/-) (ie. Couleur intermédiaire entre le pourpre et le jaune) ont systématiquement été classés en positif (ce qui se pratique en analyses de routine). Un résultat douteux est un résultat dont la lecture visuelle après le virage du témoin au jaune n'est pas suffisamment jaune pour être considéré négatif et n'est plus suffisamment violet pour être déclaré positif.

a) Evaluation des concentrations cible de dépistage dans le muscle de bœuf

- Concernant les pénicillines, nous avons testé la pénicilline G à 5 puis 7,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, puis nous sommes redescendus pour tester une concentration inférieure (6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), le palier de 20 à 25% n'ayant pas été respecté. Le CC β de la pénicilline G et de l'amoxicilline fourni par le fabricant est inférieur à celui trouvé par le laboratoire expert. Pour la cloxacilline, nous avons confirmé le CC β annoncé par le fabricant. Ces résultats sont très satisfaisants puisqu'ils sont tous inférieurs ou égaux à la $\frac{1}{2}$ LMR pour les molécules de la famille des β -lactames étudiées.

- Concernant les tétracyclines, la chlortétracycline et la doxycycline ont une CCD évaluée identique au CC β du fournisseur. L'oxytétracycline a une CCD légèrement supérieure au CC β du fournisseur et légèrement supérieure à la LMR. Les épimères de chlortétracycline et d'oxytétracycline n'ont pas été évalués par le fabricant. D'après le guide de validation de l'AFNOR NF102 (Certification 2017), si le CC β s'avère supérieur à la limite autorisée, il faudra évaluer le CC β jusqu'à 5 fois la limite autorisée (LMR) seulement. En augmentant la concentration de 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ on franchit un palier de 25%, les essais se feront durant la validation. Il n'y a donc pas de résultats d'évaluation de l'épi-CTC à 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

- Concernant les sulfamides, la sulfadiméthoxine a une CCD équivalente au CC β déterminé par le fabricant et au $\frac{3}{4}$ de la LMR. La sulfadiazine a été testée au CC β du fabricant mais nous avons obtenu 2 résultats faux-négatifs. En augmentant de 20% la concentration, nous avons pu valider la molécule à 90 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Bien que ce résultat soit supérieur à celui annoncé, il reste inférieur à la LMR de 10%.

- Concernant les macrolides, l'érythromycine A aurait dû être testée à 100 puis 120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, mais nous nous sommes aperçus en cours d'évaluation qu'il y avait une erreur sur le calcul de la valeur d'érythromycine A dans la poudre d'érythromycine A dihydrate. Une fiche de non-conformité a été ouverte. Ceci explique pourquoi les concentrations testées étaient réellement de 114 et 137,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. A 175 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ nous avons obtenu un résultat douteux (classé positif). Nous avons préféré augmenter à 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ce qui correspond à 2 fois la LMR pour la validation. Cette valeur est 2 fois supérieure à la valeur de CC β annoncée. Pour la tylosine A, nous avons obtenu un résultat douteux à 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, nous avons donc augmenté à 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Ayant obtenu 2 résultats négatifs à cette concentration, nous avons

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du
Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

fait le choix d'augmenter d'un palier de 25% pour conserver des valeurs cohérentes. Nous restons à une CCD au ¼ de la LMR ce qui est satisfaisant.

Le **Tableau 9** récapitule la LMR, le CCβ fabricant et la concentration cible de dépistage évaluée pour chaque molécule.

Tableau 9. Bilan de l'évaluation de la concentration cible de dépistage dans le muscle de bœuf.

Famille	Antibiotique	LMR µg.kg ⁻¹	CCβ fabricant µg.kg ⁻¹	Concentration cible de dépistage µg.kg ⁻¹
B- Lactamines	Pénicilline G	50	2,5	6
	Amoxicilline	50	5	9
	Cloxacilline	300	150	150
Tétracyclines	Chlortétracycline	100	100	100
	Epi-CTC	100	ND	500
	Oxytétracycline	100	100	120
	Epi-OTC	100	ND	400
	Doxycycline	100	100	100
Sulfamides	Sulfadiméthoxine	100	75	75
	Sulfadiazine	100	75	90
Macrolides	Erythromycine A	200	100	200
	Tylosine A	100	50	75

CCD = concentration cible de dépistage LMR = Limite maximale de résidus

En gras et rouge, les CCD supérieures à la LMR.

En conclusion, hormis pour les épimères de chlortétracycline, d'oxytétracycline et pour l'oxytétracycline qui ont une concentration cible de dépistage évaluée supérieure à la limite maximale de résidus autorisée, toutes les autres molécules évaluées ont une CCD inférieure ou égale à la LMR.

La détermination des capacités de détection CCβ des 12 antibiotiques va se faire suivant la CCD déterminée lors de cette phase d'évaluation.

b) Capacité de détection CCβ dans les muscles de bovin, porcin et de volaille (Poulet, Dinde)

La capacité de détection CCβ de la méthode est égale à la concentration où on observe 5% ou moins de résultats faux-négatifs. Au-delà de 5%, il faudrait tester une concentration plus élevée de la molécule pour obtenir un CCβ exact.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du
Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Le **Tableau 10** reprend l'ensemble des 12 antibiotiques validés, le taux de faux-négatifs obtenu et la capacité de détection CC β pour chacune d'entre elles déterminée dans les muscles de bovin, porcin et de volaille (Poulet, Dinde).

Tableau 10. Détermination du CC β par antibiotique.

Famille	Antibiotique	Nombre d'échantillons	Nb faux-négatifs	Taux de FN	CC β déterminé $\mu\text{g.kg}^{-1}$	CC β fabricant $\mu\text{g.kg}^{-1}$	LMR $\mu\text{g.kg}^{-1}$
β-Lactamines	Pénicilline G	21	0	0	6	2,5	50
	Amoxicilline	20	0	0	11	5	50
	Cloxacilline	20	0	0	150	150	300
Tétracyclines	CTC	65	3	4,6	160	100	100
	Epi-CTC	64	15	23,4	> 500	ND	100
	OTC	63	0	0	160	100	100
	Epi-OTC	61	5	8,2	>500	ND	100
	Doxycycline	60	3	5,0	100	100	100
Sulfamides	Sulfadiméthoxine	40	2	5,0	75	75	100
	Sulfadiazine	44	2	4,5	90	75	100
Macrolides	Erythromycine A	60	1	1,7	200	100	200
	Tylosine A	44	2	4,5	90	50	100

Excepté pour la chlortétracycline et l'oxytétracycline et leurs épimères, l'ensemble des antibiotiques ont un CC β inférieur ou égal à la LMR. Pour les épimères de CTC et OTC, le taux de FN étant supérieur à 5% et suivant le référentiel AFNOR (Certification 2017), nous avons arrêté les essais à 5x la LMR. Nous aurons un CC β exprimé > à 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Globalement les CC β que nous avons déterminés sont supérieurs à ceux annoncés par le fabricant. Seules la cloxacilline, la doxycycline, la sulfadiméthoxine ont un CC β déterminé égal au CC β annoncé.

a) Taux de faux-positifs

L'évaluation des matrices blanches s'est déroulée sur 6 jours pendant lesquels nous avons analysé 24 muscles de viande bovine, en aveugle. Le lot LC-F-18-005928 a été répété 2 fois, cette évaluation porte donc sur 23 lots d'origine différente.

Lors de l'évaluation, le taux de faux-positif dans le muscle de bovin est important 37.5% (9 échantillons sur 24) (23 lots différents de muscle). Afin de s'assurer que les échantillons étaient réellement blancs, ces échantillons ont été confirmés par une combinaison de deux méthodes CL/SM-SM. Les protocoles utilisés ont été :

- ANSES/LMV/16/01 v1 pour le dosage des aminosides (COFRAC),
- ANSES/LMV/16/02 v3 pour le dépistage des autres antibiotiques (COFRAC).

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Les analyses de confirmation ont montré que les échantillons étaient bien conformes, aucun résidu d'antibiotiques n'ayant été détecté par les méthodes physico-chimiques. Il s'agit bien de résultats faux-positifs dans le muscle de bœuf.

Ce taux a diminué lors de la phase de validation passant à 26,2% dans les muscles de bovins, porcins et volailles pendant la validation globale multi-espèces (Tableau 11). Cela a engendré un nombre important de confirmations à réaliser. Le poulet est l'espèce pour laquelle nous avons obtenu le moins de faux-positif mais le pourcentage reste élevé avec 20%.

Tableau 11. Répartition du taux de faux-positif multi-matrices.

Matrice blanche	Nombre d'échantillons analysés	Résultats T=0	
		Faux positif	Taux de faux positif
Bœuf	19	5	26,3
Porc	20	5	25
Poulet	10	2	20
Dinde	12	4	33,3
Total	61	16	26,2

Lors de la première étude de certification du Premi®Test en 2006, au cours de l'étape 1, le taux de faux positif était égal à 18% dans le muscle porcin sur 20 échantillons. Au cours de cette étude, nous avons constaté un taux de faux-positif de 25% dans le muscle de porc, ce qui est assez proche.

Au cours de l'étape 3 de l'étude de 2006, le taux de faux-positifs global, y compris les échantillons de bovins, porcins et de volailles était égal à 30%.

Lorsque nous examinons le taux de FP final de la validation actuelle = 26.2%, en mélangeant les 4 espèces, il est similaire voire légèrement inférieur au taux de FP constaté en 2006.

c) Conclusions de l'étude de robustesse

Lors de l'étude de robustesse nous avons fait varier différents paramètres définis au chapitre 8.5 (Robustesse). Le volume d'échantillon distribué à $\pm 10\%$, la température d'incubation à $64^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, la durée de pré-incubation à $\pm 5\%$ et la qualité bactériologique de l'échantillon sont sans effet sur les résultats obtenus. La température d'incubation semble avoir un effet sur le temps d'incubation notamment pour la matrice bœuf, mais cela resterait à confirmer avec plus d'essais comparatifs.

Le facteur critique de ce kit est **le moment de la lecture** qui doit **nécessairement s'effectuer dès le virage à la couleur jaune du témoin de l'espèce à analyser.**

d) Analyse d'échantillons terrain

Nous avons récupéré des échantillons terrains analysés au laboratoire entre Juin 2018 et Janvier 2019, autant que possible dans les matrices validées à savoir bœuf, porc, volaille, et pour les familles étudiées. Nous n'avons pas pu avoir de matrice poulet, ni eu le choix dans les concentrations des échantillons à analyser. Pour obtenir 20 échantillons terrain, nous avons testé la matrice ovin qui n'a pas été validée lors de cette étude. Ces échantillons ont été dépistés et confirmés en CL/SM-SM au laboratoire par des méthodes accréditées par le COFRAC.

Ces échantillons terrain ont été analysés avec le kit Premi®Test lot 18117/16 (expirant le 17/06/2019).

- Concernant les tétracyclines, les échantillons contenant de la doxycycline à une concentration inférieure au CC β ont donné un résultat négatif, ce qui est conforme aux attentes. Certains échantillons contenaient un mélange d'OTC avec d'autres antibiotiques (tildipirosine, florfenicol amine), c'est pourquoi avec des concentrations inférieures au CC β nous avons obtenu des résultats positifs. Pour les autres molécules validées (OTC, CTC à 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ et leurs épimères > à 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), on constate une grande variabilité dans les résultats pour des concentrations inférieures au CC β . Deux échantillons contenant de l'OTC réciproquement à 122 et 121 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (soit 20% > à la LMR) n'ont pas été détectés par le Premi®Test. Cela conforte le CC β de 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ obtenu lors de la validation.

- Pour les sulfamides, le résultat obtenu pour la sulfadiméthoxine est en accord avec la validation de cette molécule. Pour la sulfadimérazine cela nous donne une information supplémentaire de capacité de détection probablement inférieure à la LMR.

- Les CC β des macrolides trouvés en confirmation n'ont pas été évalués, ni validés lors de cette étude, de même que la matrice ovin. Cependant, on constate que la tulathromycine a été détectée dans le muscle de porc et de bœuf à des concentrations inférieures à la 1/2 LMR. Pour la spiramycine-néospiramycine et la tildipirosine, les concentrations trouvées sont supérieures aux LMR respectives et le Premi®Test les a détectées.

- Les CC β des phénicolés trouvés en confirmation n'ont pas été évalués, ni validés lors de cette étude. Les concentrations trouvées en confirmation étant très supérieures à la LMR, on ne peut pas tirer de conclusion sur les performances du kit à la LMR. De plus ces 2 échantillons contenaient en fait un mélange de phénicolés et de tildipirosine.

- Le CC β des aminosides trouvés en confirmation n'a pas été évalué, ni validé lors de cette étude, de même nous sommes dans la matrice ovin qui n'a pas été étudiée. Cependant, la dihydrostreptomycine à 0.5 LMR a été détectée par le Premi®Test, ce qui est encourageant sur la capacité de détection de cette molécule.

4. UNE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

4.1. 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 (2006):

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.

Lors de la reconduction en 2010, 9 nouvelles publications scientifiques avaient été identifiées et résumées. Un seul article concernait le muscle (Kozarova et al. 2009), 2 articles le poisson (Kilinc and Cakli 2008, Kilinc et al. 2007), 4 articles le rein (Cantwell and O'keeffe 2006, Pikkemaat et al. 2009, Schneider and Lehotay 2008, Schneider et al. 2009), et 2 articles les œufs (Gaudin et al. 2009, Marcincak et al. 2006).

Conclusion générale sur la synthèse bibliographique (2010) :

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 (sulphamethazine (SMZ)) que la méthode 4 Boites ou une méthode 5 Boites, même si on fait précéder celles-ci d'une extraction du muscle par un solvant. 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 la procédure d'extraction par solvant.

Les autres études concernant le muscle de poisson, le rein et les œufs confirment la tendance des résultats données par la validation AFNOR initiale : 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.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Lors de la reconduction en 2014, 11 nouvelles publications scientifiques avaient été identifiées et résumées (Berendsen et al. 2011, Dang et al. 2010, Dang et al. 2011, Ezenduka et al. 2014, Hoff et al. 2012, Kim et al. 2013, Magalhães et al. 2012, Omeiza et al. 2012, Pikkemaat et al. 2011, Rakotoharinome et al. 2014, Staruch and Mati 2012).

Conclusion générale sur la synthèse bibliographique (2014) :

Onze articles scientifiques ont été publiés dans des journaux internationaux concernant les performances du Premi®Test pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le muscle de différentes espèces et dans les reins.

Une étude portant sur le muscle et le rein des animaux de boucherie (porc, bovin, ovin, caprin, chevaux) a montré que le Premi®Test est capable de détecter un sulfamide dans le muscle, mais pas une tétracycline et un macrolide. De plus, le Premi®Test appliqué au rein détecte les tétracyclines et surtout les aminosides (Premi®Test plus sensible que le test NAT (2 boites)).

Une étude réalisée au Vietnam, portant sur des muscles de porc et de volaille, a montré que le Premi®Test était capable de détecter des tétracyclines et des (fluoro) quinolones, en dessous et au-dessus des LMRs respectives.

Enfin, dans une autre étude, le Premi®Test a été validé pour son utilisation dans le muscle de volaille. Il a été montré que le Premi®Test est acceptable pour le dépistage des bêta-lactamines, des sulfamides et des macrolides dans un programme national de contrôle des résidus et contaminants (PNCRC). Toutefois, il faut noter que dans cette validation, le Premi®Test est appliqué après une étape d'extraction des échantillons préconisée par le fournisseur, mais qui n'a pas été utilisée dans le cadre de la validation selon la marque NF Validation

Ces études concernant le muscle de diverses espèces confirment la tendance des résultats donnés 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 ou des 2 boites; moins bonne performance du Premi®Test pour la détection des tétracyclines.

Aucun article ne remet en cause les performances du Premi®Test vérifiées lors de la validation initiale en 2006.

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.

Lors de la reconduction en 2018/2019, 10 nouvelles publications scientifiques avaient été identifiées et résumées (Gondová et al. 2014, Kirrella et al. 2017, Kožárová et al. 2016, Mouokeu 2018, Nhung et al. 2018, Rahimi et al. 2018, Rahman et al. 2015, Villa Parra 2016, Yang et al. 2016, Ziani et al. 2018).

Conclusion générale sur la synthèse bibliographique (2018/2019) :

Dix articles scientifiques ont été publiés dans des journaux internationaux concernant les performances du Premi®Test pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le muscle de différentes espèces, le

foie, les reins, la chair de poissons et dans les oeufs. Le kit PremiTest® a été utilisé dans plusieurs études pour déterminer la prévalence de résidus d'antibiotiques dans différentes matrices alimentaires d'origine animale (muscles de porc, bœuf, poulet, poissons). Cependant, ces échantillons suspects n'ont jamais été confirmés par CL-SM/SM.

Depuis cette date, 8 articles scientifiques ont été publiés concernant les performances du Premi®Test dans le muscle, le foie, le rein, les produits d'aquaculture, les œufs, le lait et le miel. Un état des lieux est présenté ci-dessous.

- **Prévalence des résidus de médicaments antimicrobiens dans les tissus de bovins et de porcs au Nigéria (Njoga et al. 2018)**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'administration de médicaments antimicrobiens aux animaux destinés à l'alimentation dans les fermes d'élevage au Nigéria (questionnaire) et d'évaluer la prévalence des résidus de médicaments antimicrobiens dans les tissus de bovins et de porcs. Le kit Premi®Test a été utilisé pour détecter les résidus d'antimicrobiens dans les tissus de 300 carcasses (165 bovins et 135 porcs). Les tétracyclines (90,8 %), les pénicillines et les bêta-lactamines (89,9 %), et les aminoglycosides (57,8 %) étaient les classes d'antimicrobiens les plus fréquemment administrées aux animaux destinés à l'alimentation dans les exploitations étudiées. Le délai d'attente n'a pas été observée dans 65% des fermes. Environ 30 % des carcasses de bovins et 23 % des carcasses de porcs contenaient des quantités détectables de résidus d'antimicrobiens.

- **Prévalence des résidus d'antimicrobiens dans le muscle de bœuf en Ethiopie (Mitiku and Adugna 2018)**

L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence et le risque pour la santé publique de la présence d'antimicrobiens dans les aliments (viande bovine) en Ethiopie. Le kit Premi®Test a été utilisé pour analyser 250 échantillons de viande bovine, prélevés dans des exploitations. Cette étude a montré que presque toutes les exploitations bovines (97,67%) utilisaient l'oxytétracycline (résultat d'un questionnaire). Aucune exploitation bovine n'a respecté le délai d'attente des médicaments. Sur 250 bovins abattus, 191 (76,4 %) étaient positifs aux résidus d'antimicrobiens. La prévalence des résidus d'antimicrobiens dans la viande de bœuf dans les villes ciblées était élevée.

- **Détection de résidus d'antibiotiques dans le muscle de bœuf et le foie (Ekli et al. 2019)**

L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence des Salmonella spp. résistantes isolées dans la viande (muscle et foie de bovins) au Ghana. La sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par une méthode de diffusion des disques et les résultats ont été interprétés selon les directives du CLSI. La détermination des résidus d'antibiotiques a été effectuée à l'aide du kit Premi®Test. Un total de 35 échantillons (20 échantillons de muscle de bœuf et 15 échantillons de foie) a été analysé avec le kit Premi®Test pour détecter les résidus d'antibiotiques. 7 échantillons (20%) étaient positifs pour les résidus d'antibiotiques (6 (17%) échantillons de foie et 1 (3%) de viande de bœuf).

- Etude comparative de deux méthodes microbiologiques pour la détection de l'oxytétracycline (OTC) dans le muscle et le foie de volaille (Ezenduka et al. 2019)

L'objectif de cette étude était de comparer deux méthodes microbiologiques pour la détection de l'oxytétracycline (OTC) dans la volaille : le test en tube (Premi®Test) et le test sur boîtes (Four Plate Test (FPT) ou Méthode des 4 Boîtes). Une méthode l'immuno-essai enzymatique (ELISA) a été utilisée comme méthode de référence. L'OTC a été administré à deux groupes de volailles par voie intramusculaire et par voie orale. Des échantillons de foie et de muscle de volaille ont été prélevés et analysés. Les deux méthodes avaient une spécificité de 100 % pour l'OTC dans les tissus des deux groupes de traitement. Après injection intramusculaire et administration par voie orale, le test ELISA a détecté la présence d'OTC dans les tissus musculaires pendant 10 jours après le traitement, le kit Premi®Test pendant un à quatre jours, tandis que la méthode FPT a détecté l'OTC pendant 4 à 5 jours. La méthode FPT a donc une plus grande sensibilité pour l'OTC que le kit Premi®Test (conforme à la validation 2018-2019 CCβ OTC > LMR).

- Contrôle de la présence de résidus de tétracyclines dans des aliments d'origine animale (viande, produit d'aquaculture, lait cru) (Bahmani et al. 2020)

L'objectif de cette étude était d'évaluer et de contrôler la présence de résidus de tétracyclines dans des aliments d'origine animale (viande rouge, viande de volaille, produit d'aquaculture, lait cru). Un total de 450 échantillons a été analysé à l'aide du kit Premi®Test et se sont révélés contaminés par des résidus d'antibiotiques. Selon les résultats du test immuno-enzymatique (ELISA), la concentration moyenne en tétracyclines des échantillons de viande était la plus élevée dans le muscle de poulet, puis dans la dinde, la caille, la vache, le veau, la chèvre, le mouton, la truite arc-en-ciel et enfin la crevette. Une méthode HPLC-UV (chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection ultraviolette) a confirmé que 5,7 % (26/450) des échantillons contenaient des tétracyclines.

- Détection des résidus d'antibiotiques et d'anticoccidiens dans différents aliments d'origine animale (tissus, lait, œufs) (Kožárová et al. 2020).

L'objectif de cette étude est de comparer les performances de quatre tests d'inhibition microbienne pour la détection et l'identification des résidus d'antibiotiques et d'anticoccidiens dans différents aliments d'origine animale (tissus, lait, œufs) : les kits Premi®Test, EXP Ampulle test, Milchtest et la méthode STAR (Screening Test for Antibiotic Residues). Quatre cent trente (430) échantillons de denrées alimentaires (165 tissus animaux, 152 laits de vache cru et 113 œufs) ont été analysés. En utilisant le Premi®Test, 18 échantillons étaient positifs et 6 échantillons douteux. Trois cent soixante-six (366) échantillons d'aliments pour animaux se sont révélés négatifs pour les résidus d'antibiotiques et d'anticoccidiens. Les 4 méthodes ont été capables de détecter un anticoccidien, la salinomycine. Les tests d'inhibition microbienne s'avèrent utiles pour détecter les antibiotiques, mais aussi les anticoccidiens.

- **Comparaison du kit Premi®Test avec une nouvelle méthode basée sur l'inhibition microbiologique pour la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait, les œufs de poule et le miel (Wu et al. 2021)**

L'objectif de cette étude était de développer une nouvelle méthode basée sur l'inhibition microbiologique pour le dépistage et l'identification rapide des résidus d'antibiotiques dans le lait, les œufs de poule et le miel. Cette méthode utilise la souche *Geobacillus stearothermophilus* C953 comme bactérie test. De plus, la β -lactamase, l'acide p-aminobenzoïque, le MgSO₄ et la cystéine ont été ajoutées pour identifier les antibiotiques présents. Les limites de détection de cette méthode pour différents types d'antibiotiques ont été comparées aux limites du kit Premi®Test.

- **Muscles, foies et reins de moutons au Koweït (Sallam et al. 2022)**

L'objectif de l'étude était d'évaluer l'exposition alimentaire aux antimicrobiens des consommateurs de viande et d'organes de mouton. Un total de 450 échantillons comprenant 150 muscles, foies et reins prélevés sur 150 carcasses de moutons au Koweït ont été analysés avec le kit Premi®Test et une méthode par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les pourcentages de résultats positifs étaient respectivement de 82 %, 64 % et 100 % pour des échantillons de muscle, de foie et de rein testés avec le Premi®Test. L'analyse HPLC a révélé la présence de résidus d'amoxicilline, d'oxytétracycline, de tétracycline, et de tylosine dans le muscle, le foie et les reins, à des concentrations supérieures aux LMR dans de nombreux échantillons.

En conclusion, aucun des articles scientifiques ne remet en cause les performances du kit Premi®Test.

4.2. Bilan des validations externes réalisées par d'autres organismes qu'AFAQ 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). Depuis la validation AOAC en 2006, aucune étude supplémentaire n'a été réalisée. **Le kit Premi®Test est toujours certifié par l'AOAC. Le certificat le plus récent date du 23 Octobre 2021 (Annexe 3).**

La société r-Biopharm a fourni le rapport de validation AOAC-RI au laboratoire expert ([Annexe 3](#)).

Tableau 12. Résumé du certificat de validation AOAC.

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

Laboratoires indépendants :

- Dr. Sara Stead, Central Science Laboratory (CSL), Sand Hutton, York YO41 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 est 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.

Les résultats de la validation AOAC ont été présentés en détail lors de la reconduction en 2010.

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 des réactions croisées 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%.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

- 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, sulfadiméthoxine, 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 13. Résumé des limites de détection (réactions croisées).

	100 µg kg⁻¹	50 µg kg⁻¹	10 µg kg⁻¹
β-lactamines	cloxacilline	céphapirine	amoxicilline ampicilline
Tétracyclines	chlortétracycline tétracycline		
Macrolides		tilmicosine érythromycine tylosine	
Sulfamides	sulfadiazine sulfadiméthoxine sulfathiazol		
Glycopeptides	virginiamycine		
Divers			dapsone

- La pénicilline G à 10 µg kg⁻¹ n'est pas masquée en présence d'autres médicaments ou composés.

- Les performances du Premi®Test ne sont 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 ° 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

Un tableau de synthèse des 29 réclamations clients a été transmis au laboratoire expert par le fournisseur (même nombre qu'au renouvellement en 2018-2019) (cf. [Annexe 4](#)).

Ces réclamations ont eu lieu entre Mars 2018 et Janvier 2022, en provenance de 13 clients différents. Les réclamations étaient en lien avec 22 lots différents de Premi®Test.

- 16 réclamations ont porté sur le milieu contenu dans les ampoules : 12 au sujet d'ampoules pas assez remplies en milieu agar ou inégalement remplies, et 4 réclamations sur des ampoules contenant un milieu liquéfié,
- 3 réclamations ont porté sur des réactifs ou matériel manquant dans le kit,
- 2 réclamations ont porté sur des erreurs de livraison,
- 3 réclamations ont porté sur des résultats erronés,
- 5 réclamations ont porté sur un changement de couleur trop tardif ou inexistant. Les kits ont été remplacés et il n'y a pas eu de réclamation ultérieure.

En conclusion, ces 29 réclamations ont été soldées et n'ont pas remis en cause les performances générales des kits. De plus, ces réclamations n'ont pas donné lieu à des modifications du protocole, ou à des exclusions de matrices.

6. UN ETAT DES MODIFICATIONS INTERVENUES DEPUIS LA PRECEDENTE VALIDATION

- Aucune modification du référentiel de validation AFNOR spécifiquement adapté aux méthodes de détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires (révision n°01, Juin 2017),
- Aucune modification n'est intervenue dans la méthode alternative depuis la reconduction en 2010. Pas de demande d'extension.

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

Aucune modification dans la méthode alternative n'est envisagée.

Les réactifs et les notices d'utilisation ne changent pas.

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

Il n'est pas nécessaire de réaliser un complément d'étude.

10. CONCLUSIONS

Etant donné les éléments présentés ci-dessus :

- Aucune modification dans la méthode alternative,
- Aucune réclamation, aucun article publié ni aucune validation externe ne remettent en cause les performances de la méthode alternative,
- Les résultats de l'étude complémentaire menée par le laboratoire expert en 2018-2019 confirment et complètent les résultats de l'étude initiale de 2006 (spécificité, CC β , applicabilité aux 3 espèces (bovin, porcin, volaille), robustesse) afin de répondre aux nouvelles exigences du nouveau référentiel AFNOR (Certification 2017). La méthode est robuste et applicable aux 3 espèces testées (bovin, porcin, volaille). Il faut noter que **la lecture doit se faire sans attendre dès que le contrôle négatif qui est de la même nature que l'échantillon (i.e. même espèce) passe du violet au jaune (avec un maximum de 4h d'incubation) (cf. Notice d'utilisation « Contrôle négatif »)**. Les capacités de détection, déterminées pour des molécules représentatives de la famille des bêta-lactamines, macrolides, sulfamides ainsi que la doxycycline, sont inférieures ou égales à leurs LMR respectives. Seules les tétracyclines testées (OTC, CTC) et leurs épimères ont des CC β supérieurs à la LMR des tétracyclines (100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Enfin, **le taux de résultats faux-positifs moyen est de 26,2%**, ce qui confirme les résultats de l'étude de 2006. Ce taux de faux-positifs entraîne un taux de confirmation élevé qui sera signalé sur l'attestation de certification.

**Le laboratoire expert recommande la reconduction de la certification AFNOR du
Premi®Test selon la marque NF VALIDATION.**

11. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

European Commission. 2002. Commission Decision (EC) N° 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. Official Journal of European Communities. L221: 8-36.

Bahmani K, Shahbazi Y, Nikousefat Z. 2020. Monitoring and risk assessment of tetracycline residues in foods of animal origin. Food Science and Biotechnology. 29:441-448.

Berendsen BJA, Pikkemaat MG, Stolker LAM. 2011. Are antibiotic screening approaches sufficiently adequate? A proficiency test. Anal. Chim. Acta. 685:170-175.

Cantwell H, O'Keefe M. 2006. Evaluation of the Premi Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney. Food Additives and Contaminants. 23:120-125.

Certification A, Protocole de validation des méthodes de détection et de quantification des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits agroalimentaires

Exigences relatives aux études préliminaire et interlaboratoires menées par un Laboratoire expert. In 2017; Vol. NF102, pp 1-65.

Commission E. 2002. Commission Decision (EC) N° 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. Off J Eur Comm. L221: 8-36.

CRL. 2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Available from: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm>: Guideline_Validation_Screening_en.pdf. 1-18.

Dang PK, Degand G, Danyi S, Pierret G, Delahaut P, Ton VD, Maghuin-Rogister G, Scippo M-L. 2010. Validation of a two-plate microbiological method for screening antibiotic residues in shrimp tissue. Anal. Chim. Acta. 672:30-39.

Dang PK, Degand G, Douny C, Ton VD, Maghuin-Rogister G, Scippo ML. 2011. Optimisation of a new two-plate screening method for the detection of antibiotic residues in meat. Int. J. Food Sci. Technol. 46:2070-2076.

Ekli R, Adzitey F, Huda N. 2019. Prevalence of resistant Salmonella spp. isolated from raw meat and liver of cattle in the Wa Municipality of Ghana. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 287:012006.

Ezenduka EV, Ike OS, Anaelom NJ. 2014. Rapid detection of antimicrobial residues in poultry: A consequence of non-prudent use of antimicrobials. Health. 6:149-152.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Ezenduka EV, Okorie-Kanu OJ, Nwanta JA. 2019. Comparative analysis of two microbiological tests in the detection of oxytetracycline residue in chicken using ELISA as gold standard. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 40:617-629.

Gaudin V, Gaugain-Juhel M, Moretain JP, Sanders P. 2008. AFNOR validation of Premi®Test, a microbiological-based screening tube-test for the detection of antimicrobial residues in animal muscle tissue. *Food Addit. & Contam.: Part A*. 25:1451 - 1464.

Gaudin V, Hedou C, Rault A, Sanders P, Verdon E. 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 Addit. & Contam.: Part A*. 26:427–440.

Gondová Z, Kožárová I, Poláková Z, Mad'arová M. 2014. Comparison of Four Microbiological Inhibition Tests for the Screening of Antimicrobial Residues in the Tissues of Food-Producing Animals. *Italian Journal of Animal Science*. 13:3521.

Hoff R, Ribarcki F, Zancanaro I, Castellano L, Spier C, Barreto F, Fonseca SH. 2012. Bioactivity-based screening methods for antibiotics residues: A comparative study of commercial and inhouse developed kits. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 29:577-586.

Kilinc B, Cakli S. 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.

Kilinc B, Meyer C, Hilge V. 2007. Evaluation of the EEC four-plate test and Premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*). *Int. J. Food Sci. Technol*. 42:625-628.

Kim DP, Degand G, Douny C, Pierret G, Delahaut P, Ton VD, Granier B, Scippo M-L. 2013. Preliminary Evaluation of Antimicrobial Residue Levels in Marketed Pork and Chicken Meat in the Red River Delta Region of Vietnam. *Food and Public Health*. 3 267-276.

Kirrella GAK, Deeb AMM, Abdallah RMI. 2017. Safety of frozen liver for human consumption. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25:520-524.

Kozarova I, Janosova J, Mate D, Tkacikova S. 2009. Evaluation of three different microbial inhibition tests for the detection of sulphamethazine residues in the edible tissues of rabbit. *Food Additives and Contaminants*. Vol. 26,:978-987.

Kožárová I, Juščáková D, Šimková J, Milkovičová M, Kožár M. 2020. Effective screening of antibiotic and coccidiostat residues in food of animal origin by reliable broad-spectrum residue screening tests. *Italian Journal of Animal Science*. 19:487-501.

Kožárová I, Marcinčák S, Reitznerová A, Bartkovský M, Mačanga J, Marcinčáková D, Klempová T, Čertík M, *Verification for the presence of inhibitory substances in poultry meat after the consumption of the feed mixture supplemented with fermented feed*. 2016.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Magalhães CG, De Paiva CR, Botelho BG, De Oliveira AMG, De Souza LF, Nonaka CV, Santos KV, Farias LM, Carvalho MAR. 2012. In-house validation of Premi®Test, a microbiological screening test with solvent extraction, for the detection of antimicrobial residues in poultry muscles. *Food Addit. & Contam.: Part A.* 29:535-540.

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

Mitiku B, Adujna M. 2018. Antimicrobial residue occurrence and its public health risk of beef meat in Debre Tabor and Bahir Dar, Northwest Ethiopia. *Veterinary World.* 11:902-908.

Mouokeu RSN, J-M.;choumboungang, F.T. ;Ngono Mballa, R. ;Tigmo Matiotso, C. ;Sacar Libam IV, P. ;Ndi Messi, S.B. ; Kuate; J.R. 2018. Évaluation du niveau de contaminations bactériologique et chimique des poissons pêchés dans les lacs Municipal, Obili et le cours d'eau Mfoundi, Yaoundé-Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 125:12607-12616.

Nhung NT, Van NTB, Cuong NV, Duong TTQ, Nhat TT, Hang TTT, Nhi NTH, Kiet BT, Hien VB, Ngoc PT, Campbell J, Thwaites G, Carrique-Mas J. 2018. Antimicrobial residues and resistance against critically important antimicrobials in non-typhoidal *Salmonella* from meat sold at wet markets and supermarkets in Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.* 266:301-309.

Njoga EO, Onunkwo JI, Okoli CE, Ugwuoke WI, Nwanta JA, Chah KF. 2018. Assessment of antimicrobial drug administration and antimicrobial residues in food animals in Enugu State, Nigeria. *Tropical Animal Health and Production.* 50:897-902.

Omeiza GK, Ajayi IE, Ode OJ, *Assessment of antimicrobial drug residues in beef in Abuja, the Federal Capital Territory, Nigeria.* 2012; Vol. 48, p 283-9.

Pikkemaat MG, Rapallini MLBA, Oostra-van Dijk S, Elferink JWA. 2009. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Anal. Chim. Acta.* 637:298-304.

Pikkemaat MG, Rapallini MLBA, Zuidema T, Elferink JWA, Oostra-van Dijk S, Driessen-van Lankveld WDM. 2011. Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouws Antibiotic Test and the PremiTest (applied to muscle and kidney). *Food Additives and Contaminants.* 28:26-34.

Rahimi Z, Shahbazi Y, Ahmadi F. 2018. Comparative Screening of Chloramphenicol Residue in Chicken Tissues Using Four Plate Test and Premi®Test Methods. *Pharm Sci.* 24:157-162.

Rahman MR, Lou Z, Antora R, Saqib M. 2015. Lateral Flow Test Strip Approaches For Rapid Detection Of Food Contaminants And Pathogens: Review. *American Research Thoughts.* 1:1222-1248.

Rakotoharinome M, Pognon D, Randriamparany T, Ming JC, Idoumbin J-P, Cardinale E, Porphyre V. 2014. Prevalence of antimicrobial residues in pork meat in Madagascar. *Tropical Animal Health and Production.* 46:49-55.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Sallam KI, Saad FSS, Abdelkhalek A. 2022. Health risk assessment of antimicrobial residues in sheep carcasses marketed in Kuwait. Food Chem. 383:132401.

Schneider M, Lehotay S. 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.

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

Staruch L, Mati M. 2012. Detection of inhibitory substances in poultry meat and poultry meat quality AND POULTRY MEAT QUALIT. FOLIA VETERINARIA, 56, Supplementum I: 51—53.

Villa Parra MGVR, A.E. . DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN CANALES BOVINAS FAENADAS EN EL CAMAL MUNICIPAL DE LA CIUDAD DE AZOGUES MEDIANTE LA PRUEBA MICROBIANA PREMI®-TEST. UNIVERSIDAD DE CUENCA, 2016.

Wu Q, Shabbir MAB, Peng D, Yuan Z, Wang Y. 2021. Microbiological inhibition-based method for screening and identifying of antibiotic residues in milk, chicken egg and honey. Food Chem. 363:130074.

Yang S-C, Yu M-C, Lee Y-H, Wang J-L, *Antibiotic Residues in Meat and Eggs in Taiwan: A Local Surveillance*. 2016; Vol. 12, p 1-6.

Ziani K, Pérez-López M, Mansouri A, Khaled MB, Rodriguez AS, Slimani M. 2018. Assessment of Oxytetracycline Residue in Cooked and Raw Meat of Chicken Broilers Before and After the End of Official Withdrawal Period. Food Analytical Methods. 11:2528-2537.

12. ANNEXES

Annexe 1. Certificat No. RBP 31/02 - 04/11.



Contacts :

Méline TERRO
Chargée de clientèle
melaine.terro@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 62 39

Laurine OKITOSONGO
Chargée de clientèle en assistance
laurine.okitosongo@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 60 63

Réf.: MET/LOK/NF102/Clients/R-Biopharm/
Avis BT_PREMITEST_2019-03-21_(R2).docx

Objet : Marque NF VALIDATION

R-Biopharm AG
Monsieur Walter LÜBBE
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
GERMANY

La Plaine Saint-Denis, le 21 mars 2019

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 21 mars 2019 par le Bureau Technique de la marque NF VALIDATION (NF102), dans son application à l'agroalimentaire, j'ai l'honneur de vous annoncer que le **droit d'usage de la marque NF VALIDATION est reconduit** pour la méthode alternative suivante :

PREMI®TEST

Certifiée sous le N° RBP 31/02-04/11, avec pour fin de validité le 30-Août-2022

La méthode alternative est validée pour la détection des résidus antibiotiques sur les viandes de bœuf, de porc et de volaille avec changement de protocole.

Un courrier complet de conclusions mentionnant d'éventuelles réserves prononcées par le Bureau Technique, vous sera prochainement adressé. Le cas échéant, celles-ci devront être prises en compte sans délai.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, mes salutations distinguées.

Directeur Général
Franck LEBEUGLE





Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire
Performances analytiques certifiées

ATTESTATION DE VALIDATION* DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE

**selon le protocole défini par le bureau technique NF VALIDATION et applicable aux méthodes de détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet apparenté*

N° attestation : RBP 31/02 – 04/11

Date de validation : 24.11.2011
Date de validation : 03.07.2014
Fin de validité : 30.08.2018

La Société R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt
Allemagne

Site de production DSM Food Specialties
Postbox 1
2600 MA Delft
Pays -Bas

est autorisée à faire référence à la marque NF VALIDATION pour la méthode alternative d'analyse ci-dessous :

PREMI®TEST

Test rapide pour la détection présomptive de résidus d'antibiotiques dans le muscle

Référence du protocole : Notice 1011 – 2014/10/15

DOMAINE D'APPLICATION

Viandes porcine, bovine et de volaille (hors viande hachée).

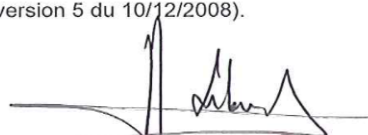
RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

Méthode officielle française des quatre boîtes LMV/90/01 (version 5 du 10/12/2008).




Directeur Général
Franck LEBEUGLE

AFNOR Certification
11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
www.afnor.org - <http://nf-validation.afnor.org/>

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test Premi®Test est une méthode à large spectre qui permet la détection présomptive des substances antimicrobiennes présentes dans la viande. Le principe est basé sur l'inhibition de la croissance du *Bacillus stearothermophilus*, bactérie très sensible aux antibiotiques et aux sulfamides. Des spores standardisées sont incluses dans de la gélose additionnée de nutriments sélectionnés.

Le Premi®Test est appliqué sur du jus de viande 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, le tube est incubé pendant 2 h 40 min heures à 64°C, et ensuite toutes les 5 minutes, jusqu'à ce que la couleur change du violet vers le jaune.

En cas de changement de couleur (apparition de bactéries qui entraînent l'acidification du milieu), le test est négatif. A l'inverse, en présence d'antibiotique, il n'y a pas de bactérie et la couleur du test ne change pas.

Les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification (hors cadre NF VALIDATION).

Note 1 : Il convient de préciser que la méthode alternative Premi®Test et la méthode officielle dite des 4 boîtes, prise en référence, sont basées sur des principes différents : la méthode Premi®Test permet de détecter un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande avec un germe unique, alors que la méthode de référence détecte les résidus des substances à activité antibiotique à l'aide de 4 germes (tous différents de celui du Premi®Test). De plus, la méthode des 4 Boîtes est basée sur l'analyse de rondelles de muscle congelé, alors que le Premi®Test est basé sur l'analyse de jus de viande. Ces deux méthodes ne peuvent donc pas être équivalentes, ce qui explique les données obtenues au chapitre justesse.

Note 2 (Historique de validation) : La méthode fut initialement validée en 2006 pour la société DSM Food Specialties sous la référence DSM 28/1 – 06/06. En 2011, la certification du Premi®Test a été attribuée à la société R-Biopharm AG sous la référence RBP 31/02 – 04/11, sans qu'aucune modification n'ait été apportée à la méthode alternative.

En juillet 2014, la certification de la méthode a été reconduite sans compléments d'étude de validation. La méthode alternative reste inchangée, ainsi que le protocole de validation et la méthode officielle prise en référence.

LIMITE DE DETECTION

- Des essais ont été effectués avec le Premi®Test uniquement, sur des jus de viande de porc contenant des antibiotiques. Six antibiotiques ont été testés, à 3 niveaux de concentration chacun. Les concentrations testées étaient proches des LMR. Cinq aliquots ont été testés par antibiotique et par concentration, soit 90 échantillons au total.
- Des jus de porc blancs (témoins négatifs) ont également été testés en double aveugle, soit 40 analyses.

Les limites de détection figurent dans le tableau suivant :

Famille	Sulfamide	Tétracycline	Macrolide	Beta-lactamine	Aminoside	Beta-lactamine	Global
Antibiotique	Sulfadimérazine	Oxytétracycline	Tylosine	Amoxicilline	Gentamicine	Ceftiofur	
LMR muscle (µg/kg)	100	100	100	50	50	1000	-
Concentrations testées (µg/kg)	50/100/200	50/100/200	50/100/200	25/50/100	50/100/200	100/200/400	-
Taux de détection à 50% LMR	0%	60%	80%	100%	0%	-	48%
Taux de détection à la LMR	20%	80%	100%	100%	0%	100%	67%
Taux de détection à 2 fois la LMR	100%	100%	100%	100%	40%	100%	90%

LMR : Limite Maximale en Résidus

La limite de détection est au niveau de la LMR pour 3 antibiotiques (tylosine, amoxicilline, ceftiofur), et à 2 X LMR pour 2 autres antibiotiques (sulfadimérazine et oxytétracycline).
Pour la gentamycine, la limite de détection est supérieure à la LMR (40% de positifs à 2 x LMR).

Echantillons blancs (n = 2 x 20 = 40) :

Répétitions	Blanc 1	Blanc 2	Blanc 3	Blanc 4	Blanc 5	Blanc 6	Blanc 7
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	D+	-	-	D+	-	-
Répétitions	Blanc 8	Blanc 9	Blanc 10	Blanc 11	Blanc 12	Blanc 13	Blanc 14
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	D+	-	-	-
Répétitions	Blanc 15	Blanc 16	Blanc 17	Blanc 18	Blanc 19	Blanc 20	
1	-	D+	-	-	-	-	
2	-	+	D+	-	-	-	

TAUX DE FAUX-POSITIFS ET DE FAUX-NEGATIFS :

Le taux de faux-négatifs du Premi®Test a toujours été inférieur à celui de la méthode des 4 Boîtes. C'est ce taux qui doit être minimal pour une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques.

A l'inverse le taux de faux-positifs du Premi®Test s'est révélé, dans la phase ultime* de l'étude plus élevé que celui de la méthode des 4 Boîtes. Ceci ne remet pas en cause les performances de la méthode puisque les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification.

* les résultats relatifs à la phase 3 de l'étude sont disponibles dans le rapport de synthèse.

ETUDE COMPARATIVE

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2006 sur des échantillons (porcs) naturellement chargés en antibiotiques. Cinq morceaux de muscle de porc ont été analysés par la méthode de référence et la méthode Premi®Test, pour 3 antibiotiques (oxytétracycline/sulfadiméthoxine, tylosine, amoxicilline) chacun à une concentration.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus en comparant le Premi®Test à la méthode de référence :

Méthode alternative	Réponse	Méthode de référence		
		R+	R-	Total
	A+	11	4	15
A-	2	3	5	
Total		13	7	20

Selon la norme EN ISO 16140, les calculs suivants ont été réalisés :

- Exactitude relative : AC = 70%
- Spécificité relative : SP = 42,9%
- Sensibilité relative : SE = 84,6%

Remarque : dans le cadre de ce protocole, la valeur de AC = 70% entre le Premi®Test et la méthode des quatre boîtes est la conséquence des résultats faux négatifs et faux positifs de la méthode des quatre boîtes, et non d'un problème de sensibilité ou de spécificité du Premi®Test.

PRATICABILITE

- Les **résultats (positifs ou négatifs)** sont obtenus en 4 à 5 heures avec le test Premi®Test contre 24 heures avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 11 laboratoires. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons provenant de 4 matrices différentes, chacune avec 4 concentrations en antibiotiques.

Les laboratoires ont testé, en double, un échantillon pour chaque niveau de contamination, soit 32 échantillons par laboratoire. Les laboratoires ont réalisé deux séries d'analyses. Seule la méthode Premi®Test a été testée

En sus de ces échantillons, les laboratoires ont testé un échantillon témoin négatif par matrice et un échantillon positif supplémenté avec de la pénicilline G à 10 µg/kg.

Les résultats par couple matrice/antibiotique et par niveau de contamination sont les suivants :

Matrice/antibiotique Niveaux (µg/kg)	Nombre total d'échan- tillons	Nombre d'échantillons analysés*	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs	% échantillons positifs
Porc/Oxytetracycline 0	22	18	36	0	0%
Porc/Oxytetracycline 20	22	18	36	0	0%
Porc/Oxytetracycline 200	22	18	32	4	11%
Porc/Oxytetracycline 400	22	18	11	25	69%
Boeuf/Sulfadimerazine 0	22	18	32	4	11%
Boeuf/Sulfadimerazine 20	22	18	33	3	8%
Boeuf/Sulfadimerazine 200	22	18	30	6	17%
Boeuf/Sulfadimerazine 400	22	18	17	19	53%
Porc/Ceftiofur 0	22	18	30	6	17%
Porc/Ceftiofur 40	22	18	34	2	6%
Porc/Ceftiofur 400	22	18	32	4	11%
Porc/Ceftiofur 800	22	18	0	36	100%
Poulet/Tylosine 0	22	18	36	0	0%
Poulet/Tylosine 10	22	18	36	0	0%
Poulet/Tylosine 100	22	18	6	30	83%
Poulet/Tylosine 200	22	18	0	36	100%
Total	352	288	401	175	-

* Un laboratoire a été éliminé de l'analyse en raison d'un délai de transport trop long, d'échantillons décongelés et du témoin négatif poulet détecté positif sur les deux séries d'analyses.

* Un autre laboratoire a été éliminé en raison d'un témoin négatif poulet détecté positif à la première série d'analyses.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

5/5

Pour rappel, les limites maximales en résidus (LMR) pour chacun des antibiotiques testés sont les suivantes :

Oxytetracycline :	LMR = 100 µg/kg
Sulfadimerazine :	LMR = 100 µg/kg
Ceftiofur	LMR = 1 000 µg/kg
Tylosine	LMR = 100 µg/kg

Conclusion

Les limites de détection à 50% ont été déterminées à partir des valeurs de l'étude interlaboratoire, pour chaque couple matrice/antibiotique. Les valeurs sont exprimées sous forme de fourchettes, la première valeur correspondant aux résultats du laboratoire expert et la deuxième aux résultats de l'étude interlaboratoire :

Porc/Oxytetracycline :	200 – 400 µg/kg	Boeuf/Sulfadimerazine :	200 – 400 µg/kg
Porc/Ceftiofur :	400 – 600 µg/kg	Poulet/Tylosine :	50 – 100 µg/kg

Conclusion générale

Les études préliminaire et interlaboratoire ont donné des résultats concordants en terme de niveau de détection.

Le taux de faux-négatifs du Premi®Test a toujours été inférieur à celui de la méthode des 4 Boîtes (ce taux devant être minimal pour une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques)

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site <http://nf-validation.afnor.org/>

Annexe 2a. Notice d'utilisation 1011 (29/11/2010).

Premi®Test



RBP 31/02 - 04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
www.afnor-validation.org

Test rapide pour la détection présomptive de résidus antibiotique dans la viande, le poisson, les crevettes, les œufs, les reins, les foies, l'urine, le sang et l'alimentation pour animaux. La marque NF VALIDATION porte sur les viandes de bovin, de porc et de volaille (hors viande hachée).

2010/11/29
Notice 1011

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. Ceci se traduira par un changement de couleur de l'indicateur qui vira du violet au jaune.

Si les résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection), le germe ne se développera pas et la couleur restera violette.

R-Biopharm AG vous propose des procédures de prélèvements d'échantillons de poisson, de crevettes, d'œufs, de reins, de foie d'urine et d'alimentation pour animaux.

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 un 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 sur www.r-biopharm.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 impérativement 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 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, incubateur et minuteur) est disponible dans le Premi®Test Starter Kit.
- 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 ou un changement de couleur peu évident, cela indique une présence d'antibiotiques/sulfamides présomptifs à une concentration supérieure ou égale au seuil de détection du test. Les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique (certifié cadre NF VALIDATION) pour identification et quantification.

Témoin négatif :

Utilisation d'un témoin négatif par espèce FORTEMENT RECOMMANDE (voire OBLIGATOIRE pour le protocole certifié NF VALIDATION). 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 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

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 R-Biopharm AG et de ses filiales ne pourra être engagée, et le client exemptera R-Biopharm AG de toute poursuite, de tout dédommagement, de tous frais et dépenses en rapport avec l'utilisation du test, R-Biopharm AG étant tout au plus tenu de remplacer les tests prouvés défectueux.

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt, Germany
info@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com



Annexe 2b. Notice d'utilisation 1011 (15/10/2014).

Premi®Test



RBP 31/02 - 04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
End of validity: 30th August 2018
<http://nf-validation.afnor.org>

Test rapide pour la détection présomptive de résidus antibiotique dans la viande, le poisson, les crevettes, les oeufs, les reins, les foies, l'urine, le sang et l'alimentation pour animaux. La marque NF VALIDATION porte sur les viandes de bovin, de porc et de volaille (hors viande hachée).

2014/10/15
Notice 1011

Contenu du coffret

25 ampoules contenant du *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* enrobé dans un excipient solide de gélose, embouts de seringues 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 oeufs, 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. Ceci se traduira par un changement de couleur de l'indicateur qui verra du violet au jaune.

Si les résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection), le germe ne se développera pas et la couleur restera violette. R-Biopharm AG vous propose des procédures de prélèvements d'échantillons de poisson, de crevettes, d'oeufs, de reins, de foie d'urine et d'alimentation pour animaux.

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 un 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 sur www.r-biopharm.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 impérativement 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.
- Tout le matériel nécessaire (presse-viande, ciseaux, incubateur et minuteur) est disponible dans le Premi®Test Starter Kit.
- Pour faciliter une bonne utilisation du Premi®Test, sur demande 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 ou un changement de couleur peu évident, cela indique une présence d'antibiotiques / sulfamides présomptifs à une concentration supérieure ou égale au seuil de détection du test. Les échantillons positifs doivent être confirmés par une méthode physico-chimique (hors cadre NF VALIDATION) pour identification et quantification.

Témoin négatif

Utilisation d'un témoin négatif par espèce FORTEMENT RECOMMANDE (voire OBLIGATOIRE pour le protocole certifié AFNOR VALIDATION). Vérifier la couleur du contrôle négatif seulement après une incubation de 2 h 40 min et ensuite toutes les 5 minutes, jusqu'à ce que la couleur change du violet vers le jaune. S'il n'y a pas de modification de la couleur avant 3 h 10 min, répéter le 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 TMOIN 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 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

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. Ces données correspondent à nos connaissances techniques actuelles et fournissent des informations sur nos produits et leur utilisation. R-Biopharm ne donne aucune garantie d'aucune sorte, exprimée ou implicite, en dehors du fait que les matières premières utilisées pour la fabrication de ce produit sont de qualité standard. Les produits défectueux seront remplacés. Il n'y a aucune garantie sur la valeur marchande ce produit, ou de son adéquation à un but quelconque. R-Biopharm ne pourra être tenu responsable pour aucun dommage, y compris dommages spéciaux ou indirects, ou pour des dépenses résultant directement ou indirectement de l'utilisation de ce produit

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt, Germany
Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-mail: info@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

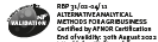
Vorsitzender des Aufsichtsrats /
Chairman of Supervisory Board:
Dietrich Mollat
Vorstand / Board of Management:
Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),
Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert
Handelsregister / Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt HRB 8321



Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi@Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Annexe 2c. Notice d'utilisation 1011 Recto (21/03/2019).

Premi@Test



Muscle Screening test for the presence of antibiotic and sulfamide residues in particular beef meat. NF VALIDATION certification only possible with pasteurized meat (in the exception of ground meat). The following antibiotic residues were investigated: Penicillins (PCP = 4 µg/g); Amoxicillins (ACP = 10 µg/g); Chloramphenicol (CCP = 100 µg/g); Tetracyclines (TCM = 10 µg/g); Sulphonamides (SCP = 10 µg/g); Streptomycin (STP = 100 µg/g); Tylosin (TYP = 100 µg/g); Macrolides (MCP = 100 µg/g); Trimethoprim (TTP = 10 µg/g). The CCP values are determined by gelatin diffusion method. The detection limit is 0.1 mg/kg. Colistin, gentamicin, ampicillin, amphotericin, quinolones, tetracyclines, and lincosamides are detected at the maximum residual level (MRL). <http://www.biopharm.com>

Contiene: 25 ampolline con Bacillus anthracis/anthracis (B. anthracis) in a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Perfect description: Premi@Test is a solid agar medium intended for microbiological detection of antibiotic residues in animal products. It is a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Test principle: Premi@Test is based on the inhibition of the growth of Bacillus anthracis (B. anthracis) by the action of antibiotic residues. A detection limit of 0.1 mg/kg is achieved.

Caution: This test is suitable to detect antibiotic and other antibiotics, any combination with sulfamide should be avoided at all times. It is advised to wear masks throughout the whole procedure. Use clean paper or clean towel to dry hands.

- Instructions for use:**
- Wash hands thoroughly before starting the test procedure.
 - Read the requirements of application before starting the application of the adjustment solution.
 - Remove the cap carefully from the required amount of ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Take approximately 1 cm³ of the adjustment solution and add it to the ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Allow the ampoules to sit for the syringe for each sample.
 - Pipette out 10 µl of the sample into the syringe. Do not touch the ampoules or needles.
 - Insert the ampoules into the syringe and push the plunger down to the 10 µl mark. Do not touch the ampoules or needles.
 - Close the test ampoules with the cap and push the plunger down to the 10 µl mark.
 - Incubate the test ampoules in a Premi@Test incubator or water bath at 37 °C ± 0.5 °C.
 - It is 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 color.
 - All necessary equipment (test paper, syringe, incubator, and solvent) are available in the Premi@Test Starter Kit.
 - To find out the use of the Premi@Test there is a thorough document available on request for all users.

Reading test results:

- Read the color only from the bottom 2 µl of the ampoule.
- A colorless change (from purple towards white) indicates the absence of antibiotic / sulfamide above the detection limit.
- No color change indicates the presence of antibiotic and / or sulfamide at or above the level of detection of the test.

Application: The use of an ampoule control is required (obligatory for NF VALIDATION). Start to check the color of the sample control after an incubation time of 2 h at 37 °C and then in intervals of 10 min until the color of the sample control stopped changing from purple to white. If that time, the sample should be compared to the negative control. Because a change from purple to white can lead to incorrect results of the detection capability (CCP). If there is no color change of the sample control after 4 h, repeat the test. The negative control can be prepared by heating and storing muscle from a sample of the negative control. New use water is a negative control.

Positive control: It is strongly recommended to test a positive control (control) is available from Biopharm AG to verify the correct application of the test.

Storage: The ampoules should be stored correctly (30 °C ± 2 °C, Attention: DO NOT FREEZE).

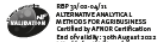
Label liability: Premi@Test is a screening test and such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of color, in particular that of a yellow (purple) color, may differ from person to person, in cases where severe color changes are involved for the user, test results should be confirmed by a suitable complementary analysis method. Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which the products are made are of standard quality.

Recommendations for sample preparation: of fish, shrimp, egg, honey, etc. urine, blood and feces are available at Biopharm AG. These matrices require special adaptation by the customer. Support is available at Biopharm upon request.

Biopharm AG
 Postfach 101111, Postfach 101111
 An der Ammersee 30, Postfach 101111
 84529 Gars am Inn, Germany
 Tel.: +49 (0) 84 41 - 93 10 0
 Fax: +49 (0) 84 41 - 93 10 10
 E-Mail: info@biopharm.com
www.biopharm.com

Autobrief/Supermarket Board:
 Dr. Ralf W. Ziemer (Vorsitzender/Chairman)
 Vorstand/Supermarket Board
 Chairman, Dr. Hans-Peter, Julia Henrich, Dr. Peter Schabert
 Anhangsleiter/Committee Members:
 Anhangsleiter/Committee Members
 UStD Dr. W. W. Dr. W. Dr. W. Dr. W.

Premi@Test



Muscle Screening test for the presence of antibiotic and sulfamide residues in particular beef meat. NF VALIDATION certification only possible with pasteurized meat (in the exception of ground meat). The following antibiotic residues were investigated: Penicillins (PCP = 4 µg/g); Amoxicillins (ACP = 10 µg/g); Chloramphenicol (CCP = 100 µg/g); Tetracyclines (TCM = 10 µg/g); Sulphonamides (SCP = 10 µg/g); Streptomycin (STP = 100 µg/g); Tylosin (TYP = 100 µg/g); Macrolides (MCP = 100 µg/g); Trimethoprim (TTP = 10 µg/g). The CCP values are determined by gelatin diffusion method. The detection limit is 0.1 mg/kg. Colistin, gentamicin, ampicillin, amphotericin, quinolones, tetracyclines, and lincosamides are detected at the maximum residual level (MRL). <http://www.biopharm.com>

Contiene: 25 ampolline con Bacillus anthracis/anthracis (B. anthracis) in a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Perfect description: Premi@Test is a solid agar medium intended for microbiological detection of antibiotic residues in animal products. It is a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Test principle: Premi@Test is based on the inhibition of the growth of Bacillus anthracis (B. anthracis) by the action of antibiotic residues. A detection limit of 0.1 mg/kg is achieved.

Caution: This test is suitable to detect antibiotic and other antibiotics, any combination with sulfamide should be avoided at all times. It is advised to wear masks throughout the whole procedure. Use clean paper or clean towel to dry hands.

- Instructions for use:**
- Wash hands thoroughly before starting the test procedure.
 - Read the requirements of application before starting the application of the adjustment solution.
 - Remove the cap carefully from the required amount of ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Take approximately 1 cm³ of the adjustment solution and add it to the ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Allow the ampoules to sit for the syringe for each sample.
 - Pipette out 10 µl of the sample into the syringe. Do not touch the ampoules or needles.
 - Insert the ampoules into the syringe and push the plunger down to the 10 µl mark. Do not touch the ampoules or needles.
 - Close the test ampoules with the cap and push the plunger down to the 10 µl mark.
 - Incubate the test ampoules in a Premi@Test incubator or water bath at 37 °C ± 0.5 °C.
 - It is 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 color.
 - All necessary equipment (test paper, syringe, incubator, and solvent) are available in the Premi@Test Starter Kit.
 - To find out the use of the Premi@Test there is a thorough document available on request for all users.

Reading test results:

- Read the color only from the bottom 2 µl of the ampoule.
- A colorless change (from purple towards white) indicates the absence of antibiotic / sulfamide above the detection limit.
- No color change indicates the presence of antibiotic and / or sulfamide at or above the level of detection of the test.

Application: The use of an ampoule control is required (obligatory for NF VALIDATION). Start to check the color of the sample control after an incubation time of 2 h at 37 °C and then in intervals of 10 min until the color of the sample control stopped changing from purple to white. If that time, the sample should be compared to the negative control. Because a change from purple to white can lead to incorrect results of the detection capability (CCP). If there is no color change of the sample control after 4 h, repeat the test. The negative control can be prepared by heating and storing muscle from a sample of the negative control. New use water is a negative control.

Positive control: It is strongly recommended to test a positive control (control) is available from Biopharm AG to verify the correct application of the test.

Storage: The ampoules should be stored correctly (30 °C ± 2 °C, Attention: DO NOT FREEZE).

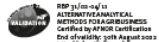
Label liability: Premi@Test is a screening test and such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of color, in particular that of a yellow (purple) color, may differ from person to person, in cases where severe color changes are involved for the user, test results should be confirmed by a suitable complementary analysis method. Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which the products are made are of standard quality.

Recommendations for sample preparation: of fish, shrimp, egg, honey, etc. urine, blood and feces are available at Biopharm AG. These matrices require special adaptation by the customer. Support is available at Biopharm upon request.

Biopharm AG
 Postfach 101111, Postfach 101111
 An der Ammersee 30, Postfach 101111
 84529 Gars am Inn, Germany
 Tel.: +49 (0) 84 41 - 93 10 0
 Fax: +49 (0) 84 41 - 93 10 10
 E-Mail: info@biopharm.com
www.biopharm.com

Autobrief/Supermarket Board:
 Dr. Ralf W. Ziemer (Vorsitzender/Chairman)
 Vorstand/Supermarket Board
 Chairman, Dr. Hans-Peter, Julia Henrich, Dr. Peter Schabert
 Anhangsleiter/Committee Members:
 Anhangsleiter/Committee Members
 UStD Dr. W. W. Dr. W. Dr. W. Dr. W.

Premi@Test



Muscle Screening test for the presence of antibiotic and sulfamide residues in particular beef meat. NF VALIDATION certification only possible with pasteurized meat (in the exception of ground meat). The following antibiotic residues were investigated: Penicillins (PCP = 4 µg/g); Amoxicillins (ACP = 10 µg/g); Chloramphenicol (CCP = 100 µg/g); Tetracyclines (TCM = 10 µg/g); Sulphonamides (SCP = 10 µg/g); Streptomycin (STP = 100 µg/g); Tylosin (TYP = 100 µg/g); Macrolides (MCP = 100 µg/g); Trimethoprim (TTP = 10 µg/g). The CCP values are determined by gelatin diffusion method. The detection limit is 0.1 mg/kg. Colistin, gentamicin, ampicillin, amphotericin, quinolones, tetracyclines, and lincosamides are detected at the maximum residual level (MRL). <http://www.biopharm.com>

Contiene: 25 ampolline con Bacillus anthracis/anthracis (B. anthracis) in a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Perfect description: Premi@Test is a solid agar medium intended for microbiological detection of antibiotic residues in animal products. It is a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Test principle: Premi@Test is based on the inhibition of the growth of Bacillus anthracis (B. anthracis) by the action of antibiotic residues. A detection limit of 0.1 mg/kg is achieved.

Caution: This test is suitable to detect antibiotic and other antibiotics, any combination with sulfamide should be avoided at all times. It is advised to wear masks throughout the whole procedure. Use clean paper or clean towel to dry hands.

- Instructions for use:**
- Wash hands thoroughly before starting the test procedure.
 - Read the requirements of application before starting the application of the adjustment solution.
 - Remove the cap carefully from the required amount of ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Take approximately 1 cm³ of the adjustment solution and add it to the ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Allow the ampoules to sit for the syringe for each sample.
 - Pipette out 10 µl of the sample into the syringe. Do not touch the ampoules or needles.
 - Insert the ampoules into the syringe and push the plunger down to the 10 µl mark. Do not touch the ampoules or needles.
 - Close the test ampoules with the cap and push the plunger down to the 10 µl mark.
 - Incubate the test ampoules in a Premi@Test incubator or water bath at 37 °C ± 0.5 °C.
 - It is 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 color.
 - All necessary equipment (test paper, syringe, incubator, and solvent) are available in the Premi@Test Starter Kit.
 - To find out the use of the Premi@Test there is a thorough document available on request for all users.

Reading test results:

- Read the color only from the bottom 2 µl of the ampoule.
- A colorless change (from purple towards white) indicates the absence of antibiotic / sulfamide above the detection limit.
- No color change indicates the presence of antibiotic and / or sulfamide at or above the level of detection of the test.

Application: The use of an ampoule control is required (obligatory for NF VALIDATION). Start to check the color of the sample control after an incubation time of 2 h at 37 °C and then in intervals of 10 min until the color of the sample control stopped changing from purple to white. If that time, the sample should be compared to the negative control. Because a change from purple to white can lead to incorrect results of the detection capability (CCP). If there is no color change of the sample control after 4 h, repeat the test. The negative control can be prepared by heating and storing muscle from a sample of the negative control. New use water is a negative control.

Positive control: It is strongly recommended to test a positive control (control) is available from Biopharm AG to verify the correct application of the test.

Storage: The ampoules should be stored correctly (30 °C ± 2 °C, Attention: DO NOT FREEZE).

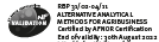
Label liability: Premi@Test is a screening test and such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of color, in particular that of a yellow (purple) color, may differ from person to person, in cases where severe color changes are involved for the user, test results should be confirmed by a suitable complementary analysis method. Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which the products are made are of standard quality.

Recommendations for sample preparation: of fish, shrimp, egg, honey, etc. urine, blood and feces are available at Biopharm AG. These matrices require special adaptation by the customer. Support is available at Biopharm upon request.

Biopharm AG
 Postfach 101111, Postfach 101111
 An der Ammersee 30, Postfach 101111
 84529 Gars am Inn, Germany
 Tel.: +49 (0) 84 41 - 93 10 0
 Fax: +49 (0) 84 41 - 93 10 10
 E-Mail: info@biopharm.com
www.biopharm.com

Autobrief/Supermarket Board:
 Dr. Ralf W. Ziemer (Vorsitzender/Chairman)
 Vorstand/Supermarket Board
 Chairman, Dr. Hans-Peter, Julia Henrich, Dr. Peter Schabert
 Anhangsleiter/Committee Members:
 Anhangsleiter/Committee Members
 UStD Dr. W. W. Dr. W. Dr. W. Dr. W.

Premi@Test



Muscle Screening test for the presence of antibiotic and sulfamide residues in particular beef meat. NF VALIDATION certification only possible with pasteurized meat (in the exception of ground meat). The following antibiotic residues were investigated: Penicillins (PCP = 4 µg/g); Amoxicillins (ACP = 10 µg/g); Chloramphenicol (CCP = 100 µg/g); Tetracyclines (TCM = 10 µg/g); Sulphonamides (SCP = 10 µg/g); Streptomycin (STP = 100 µg/g); Tylosin (TYP = 100 µg/g); Macrolides (MCP = 100 µg/g); Trimethoprim (TTP = 10 µg/g). The CCP values are determined by gelatin diffusion method. The detection limit is 0.1 mg/kg. Colistin, gentamicin, ampicillin, amphotericin, quinolones, tetracyclines, and lincosamides are detected at the maximum residual level (MRL). <http://www.biopharm.com>

Contiene: 25 ampolline con Bacillus anthracis/anthracis (B. anthracis) in a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Perfect description: Premi@Test is a solid agar medium intended for microbiological detection of antibiotic residues in animal products. It is a solid agar medium, dispensable gelatin plate, perforated coverlid + syringe.

Test principle: Premi@Test is based on the inhibition of the growth of Bacillus anthracis (B. anthracis) by the action of antibiotic residues. A detection limit of 0.1 mg/kg is achieved.

Caution: This test is suitable to detect antibiotic and other antibiotics, any combination with sulfamide should be avoided at all times. It is advised to wear masks throughout the whole procedure. Use clean paper or clean towel to dry hands.

- Instructions for use:**
- Wash hands thoroughly before starting the test procedure.
 - Read the requirements of application before starting the application of the adjustment solution.
 - Remove the cap carefully from the required amount of ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Take approximately 1 cm³ of the adjustment solution and add it to the ampoules. Do not touch the ampoules or needles.
 - Allow the ampoules to sit for the syringe for each sample.
 - Pipette out 10 µl of the sample into the syringe. Do not touch the ampoules or needles.
 - Insert the ampoules into the syringe and push the plunger down to the 10 µl mark. Do not touch the ampoules or needles.
 - Close the test ampoules with the cap and push the plunger down to the 10 µl mark.
 - Incubate the test ampoules in a Premi@Test incubator or water bath at 37 °C ± 0.5 °C.
 - It is 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 color.
 - All necessary equipment (test paper, syringe, incubator, and solvent) are available in the Premi@Test Starter Kit.
 - To find out the use of the Premi@Test there is a thorough document available on request for all users.

Reading test results:

- Read the color only from the bottom 2 µl of the ampoule.
- A colorless change (from purple towards white) indicates the absence of antibiotic / sulfamide above the detection limit.
- No color change indicates the presence of antibiotic and / or sulfamide at or above the level of detection of the test.

Application: The use of an ampoule control is required (obligatory for NF VALIDATION). Start to check the color of the sample control after an incubation time of 2 h at 37 °C and then in intervals of 10 min until the color of the sample control stopped changing from purple to white. If that time, the sample should be compared to the negative control. Because a change from purple to white can lead to incorrect results of the detection capability (CCP). If there is no color change of the sample control after 4 h, repeat the test. The negative control can be prepared by heating and storing muscle from a sample of the negative control. New use water is a negative control.

Positive control: It is strongly recommended to test a positive control (control) is available from Biopharm AG to verify the correct application of the test.

Storage: The ampoules should be stored correctly (30 °C ± 2 °C, Attention: DO NOT FREEZE).

Label liability: Premi@Test is a screening test and such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of color, in particular that of a yellow (purple) color, may differ from person to person, in cases where severe color changes are involved for the user, test results should be confirmed by a suitable complementary analysis method. Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which the products are made are of standard quality.

Recommendations for sample preparation: of fish, shrimp, egg, honey, etc. urine, blood and feces are available at Biopharm AG. These matrices require special adaptation by the customer. Support is available at Biopharm upon request.

Biopharm AG
 Postfach 101111, Postfach 101111
 An der Ammersee 30, Postfach 101111
 84529 Gars am Inn, Germany
 Tel.: +49 (0) 84 41 - 93 10 0
 Fax: +49 (0) 84 41 - 93 10 10
 E-Mail: info@biopharm.com
www.biopharm.com

Autobrief/Supermarket Board:
 Dr. Ralf W. Ziemer (Vorsitzender/Chairman)
 Vorstand/Supermarket Board
 Chairman, Dr. Hans-Peter, Julia Henrich, Dr. Peter Schabert
 Anhangsleiter/Committee Members:
 Anhangsleiter/Committee Members
 UStD Dr. W. W. Dr. W. Dr. W. Dr. W.

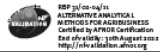
Dossier de validation réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

Annexe 2d. Notice d'utilisation 1011 Verso (21/03/2019).

Premi®Test



Premi®Test



Premi®Test



Test rapide pour la détection de résidus d'antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières. La certification AFNOR (NF VALIDATION) prouve que les résultats sont fiables, précis et validés dans les vaches laitières. Les antibiotiques concernés sont les suivants :

- Penicillines : Benzathine (CIP = 500 µg / kg), ampicilline (CIP = 100 µg / kg), ampicilline (CIP = 100 µg / kg)
- Tétracyclines : Chloramphenicol (CIP = 50 µg / kg), Doxycycline (CIP = 50 µg / kg), Oxytétracycline (CIP = 100 µg / kg)
- Sulfamides : Sulfadiazine (CIP = 100 µg / kg), Sulfamonométil (CIP = 100 µg / kg)
- Métronidazole : Métronidazole (CIP = 100 µg / kg)

La valeur de CIP est l'abréviation du contenu des unités de mesure de la dose de vente. Les capacités de détection sont d'autres résidus de médicaments vétérinaires. Les chloramphenicol, les tetracyclines, les quinolones, les furazolidone, la florfenicol et la triméthoprime sont classés de la même manière que les autres.

Diagnostic fiable pour la détection de résidus antibiotiques et de sulfamides particulièrement dans les vaches laitières. La certification NF VALIDATION prouve que les résultats sont fiables, précis et validés dans les vaches laitières. Les antibiotiques concernés sont les suivants :

- Penicillines : Benzathine (CIP = 500 µg / kg), ampicilline (CIP = 100 µg / kg), ampicilline (CIP = 100 µg / kg)
- Tétracyclines : Chloramphenicol (CIP = 50 µg / kg), Doxycycline (CIP = 50 µg / kg), Oxytétracycline (CIP = 100 µg / kg)
- Sulfamides : Sulfadiazine (CIP = 100 µg / kg), Sulfamonométil (CIP = 100 µg / kg)
- Métronidazole : Métronidazole (CIP = 100 µg / kg)

La valeur de CIP est l'abréviation du contenu des unités de mesure de la dose de vente. Les capacités de détection sont d'autres résidus de médicaments vétérinaires. Les chloramphenicol, les tetracyclines, les quinolones, les furazolidone, la florfenicol et la triméthoprime sont classés de la même manière que les autres.

Fast and reliable test for the detection of antibiotic residues and sulfonamides particularly in dairy cows. The certification NF VALIDATION proves that the results are reliable, accurate and validated in dairy cows. The antibiotics concerned are the following:

- Penicillins: Benzathine (CIP = 500 µg/kg), ampicillin (CIP = 100 µg/kg), ampicillin (CIP = 100 µg/kg)
- Tetracyclines: Chloramphenicol (CIP = 50 µg/kg), doxycycline (CIP = 50 µg/kg), oxytetracycline (CIP = 100 µg/kg)
- Sulfonamides: Sulfadiazine (CIP = 100 µg/kg), sulfamonomethyl (CIP = 100 µg/kg)
- Metronidazole: Metronidazole (CIP = 100 µg/kg)

The value of CIP is the abbreviation of the content of the units of sale. The detection capacities are other residues of veterinary medicines. Chloramphenicol, tetracyclines, quinolones, furazolidone, florfenicol and trimethoprim are classified in the same way as the others.

Contenus du coffret

Le coffret comprend des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières, des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières, des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Description du produit

Premi®Test est un test de détection microbiologique à large spectre, applicable dans les vaches laitières, particulièrement dans les vaches laitières. Le principe de détection est basé sur la mesure de la fluorescence induite par la réaction de l'antibiotique ou du sulfamide à un niveau qui est inférieur au LMR (limite maximale résiduelle).

Préparation et utilisation

Le test est effectué à l'aide de la méthode de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières. Il est donc recommandé de lire attentivement les instructions de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Utilisation

- Ne pas ouvrir le coffret avant de commencer la lecture.
- Préparer le nombre de tubes nécessaires dans le délai de validité des tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.
- Préparer les tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contenus du coffret

Le coffret comprend des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières, des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Description du produit

Premi®Test est un test de détection microbiologique à large spectre, applicable dans les vaches laitières, particulièrement dans les vaches laitières. Le principe de détection est basé sur la mesure de la fluorescence induite par la réaction de l'antibiotique ou du sulfamide à un niveau qui est inférieur au LMR (limite maximale résiduelle).

Préparation et utilisation

Le test est effectué à l'aide de la méthode de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières. Il est donc recommandé de lire attentivement les instructions de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Utilisation

- Ne pas ouvrir le coffret avant de commencer la lecture.
- Préparer le nombre de tubes nécessaires dans le délai de validité des tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.
- Préparer les tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contenus du coffret

Le coffret comprend des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières, des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Description du produit

Premi®Test est un test de détection microbiologique à large spectre, applicable dans les vaches laitières, particulièrement dans les vaches laitières. Le principe de détection est basé sur la mesure de la fluorescence induite par la réaction de l'antibiotique ou du sulfamide à un niveau qui est inférieur au LMR (limite maximale résiduelle).

Préparation et utilisation

Le test est effectué à l'aide de la méthode de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières. Il est donc recommandé de lire attentivement les instructions de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Utilisation

- Ne pas ouvrir le coffret avant de commencer la lecture.
- Préparer le nombre de tubes nécessaires dans le délai de validité des tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.
- Préparer les tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Fast and reliable test for the detection of antibiotic residues and sulfonamides particularly in dairy cows. The certification NF VALIDATION proves that the results are reliable, accurate and validated in dairy cows. The antibiotics concerned are the following:

- Penicillins: Benzathine (CIP = 500 µg/kg), ampicillin (CIP = 100 µg/kg), ampicillin (CIP = 100 µg/kg)
- Tetracyclines: Chloramphenicol (CIP = 50 µg/kg), doxycycline (CIP = 50 µg/kg), oxytetracycline (CIP = 100 µg/kg)
- Sulfonamides: Sulfadiazine (CIP = 100 µg/kg), sulfamonomethyl (CIP = 100 µg/kg)
- Metronidazole: Metronidazole (CIP = 100 µg/kg)

The value of CIP is the abbreviation of the content of the units of sale. The detection capacities are other residues of veterinary medicines. Chloramphenicol, tetracyclines, quinolones, furazolidone, florfenicol and trimethoprim are classified in the same way as the others.

Contenus du coffret

Le coffret comprend des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières, des agents de liaison antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Description du produit

Premi®Test est un test de détection microbiologique à large spectre, applicable dans les vaches laitières, particulièrement dans les vaches laitières. Le principe de détection est basé sur la mesure de la fluorescence induite par la réaction de l'antibiotique ou du sulfamide à un niveau qui est inférieur au LMR (limite maximale résiduelle).

Préparation et utilisation

Le test est effectué à l'aide de la méthode de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières. Il est donc recommandé de lire attentivement les instructions de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Utilisation

- Ne pas ouvrir le coffret avant de commencer la lecture.
- Préparer le nombre de tubes nécessaires dans le délai de validité des tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.
- Préparer les tubes de détection de résidus antibiotiques et sulfamides aux particularités dans les vaches laitières.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

Contre-indications

- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.
- Ne pas utiliser le produit sur des animaux atteints de maladies infectieuses.

r-Biopharm

Autheuil/Superphar Road
Dreux (France)
Tel: +33 (0) 253 51 51 00
www.biopharm.com

r-Biopharm

Autheuil/Superphar Road
Dreux (France)
Tel: +33 (0) 253 51 51 00
www.biopharm.com

r-Biopharm

Autheuil/Superphar Road
Dreux (France)
Tel: +33 (0) 253 51 51 00
www.biopharm.com

r-Biopharm

Autheuil/Superphar Road
Dreux (France)
Tel: +33 (0) 253 51 51 00
www.biopharm.com

Annexe 2e. Agrandissement de la notice d'utilisation 1011 en français (21/03/2019).

Premi®Test



RBP 31/02-04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
End of validity: 30th August 2022
<http://nf-validation.afnor.org>

Test rapide pour la détection de résidus d'antibiotiques et sulfamides en particulier dans les viandes fraîches. La validation AFNOR (NF VALIDATION) porte sur les viandes bovines, porcines et de volaille (hors viande hachée). Les antibiotiques suivants ont été étudiés :
Pénicillines : Pénicilline G (CCβ = 6 µg / kg) ; Amoxicilline (CCβ = 11 µg / kg) ; Cloxacilline (CCβ = 150 µg / kg)
Tétracyclines : Chlorotétracycline (CCβ = 160 µg / kg) ; Oxytétracycline (CCβ = 160 µg / kg) ; Doxycycline (CCβ = 100 µg / kg)
Sulfamides : Sulfadiméthoxine (CCβ = 75 µg / kg) ; Sulfadiazine (CCβ = 90 µg / kg)
Macrolides : Érythromycine A (CCβ = 200 µg / kg) ; Tylosine A (CCβ = 90 µg / kg)
Les valeurs de CCβ ont été déterminées en réalisant des ajouts dosés dans du jus de viande. Les capacités de détection dans d'autres échantillons peuvent différer. Les céfalosporines, les aminosides, les amphénicols, les quinolones, la tiamuline et la lincomycine sont détectées au-dessus de la limite maximale de résidus (LMR).
21/03/2019 - Notice 1011

Contenu du coffret

25 ampoules contenant des spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *caldolaectis* enrobées dans une gélose, embouts de seringue jetables, film de protection perforé et seringue doseuse.

Description du produit

Premi®Test est un test de détection microbiologique à large spectre, spécialement mis au point pour la détection, en particulier dans les viandes fraîches, de substances antimicrobiennes telles que les résidus d'antibiotiques ou de sulfamides à un niveau égal ou inférieur aux LMR (limite maximale de résidus).

Principe du test

Premi®Test est basé sur l'inhibition du développement de *Bacillus stearothermophilus* qui est un micro-organisme très sensible à de nombreux résidus d'antibiotiques et de sulfamides. Un nombre standardisé de spores est enrobé dans une gélose contenant des nutriments. Lorsque le jus de viande est ajouté dans l'ampoule Premi®Test puis mis à incuber à 64 °C, les spores germent. Ces spores germées vont se multiplier et acidifier le milieu en l'absence de substances inhibitrices. Ceci se traduit par un changement de couleur de la gélose qui vire alors du violet au jaune. Quand des résidus antimicrobiens sont présents en quantité suffisante (au-dessus du seuil de détection), le germe ne se développe pas et la couleur de la gélose reste violette.

Précautions à prendre

Ce test est sensible à certains antibiotiques et à d'autres substances inhibitrices ; il est donc nécessaire d'éviter tout risque de contamination croisée par de telles substances. De ce fait, il est conseillé de bien se laver et se sécher les mains (à l'aide de papier absorbant ou d'une serviette propre) avant de débiter l'analyse.

Utilisation

- Bien se laver les mains avant de commencer le test.
- Découper le nombre d'ampoules nécessaires sans abîmer le film en aluminium qui protège les ampoules voisines.
- Enlever prudemment le film recouvrant les ampoules souhaitées (ne pas ouvrir plus d'ampoules que nécessaire).
- Prendre environ 2 cm³ de viande maigre et utiliser un presse-viande pour en extraire environ 250 µl de jus. Il est également possible d'obtenir du jus de viande à l'aide du Multipress ou en faisant congeler/décongeler la viande (une notice technique sur le Multipress est disponible sur www.r-biopharm.com).
- Utiliser un nouvel embout jetable de seringue pour chaque prélèvement.
- Pipeter dans l'ampoule 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 l'ampoule de test deux fois de suite avec de l'eau déminéralisée. Laver impérativement 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 à l'aide du film fourni pour éviter toute évaporation.
- Mettre l'ampoule à incuber dans l'incubateur Premi®Test ou au bain-marie (64 °C ± 1 °C).
- Il est nécessaire de réaliser en parallèle un contrôle négatif de la matrice testée. Lire les résultats du test lorsque le témoin négatif change de couleur.
- Tout le matériel nécessaire (presse-viande, ciseaux, Incubateur et minuteur) est disponible dans le Premi®Test Starter Kit.
- Pour une bonne utilisation du Premi®Test, un document PowerPoint est à la disposition des utilisateurs sur demande.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

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'antibiotique / sulfamide à une concentration supérieure au seuil de détection.
- S'il n'y a aucun changement de couleur ou un changement de couleur peu évident, cela indique une présence présumptive d'antibiotiques / sulfamides à une concentration supérieure ou égale au seuil de détection du test.

Contrôle négatif

L'utilisation d'un témoin négatif est DEMANDÉ et OBLIGATOIRE pour le protocole certifié AFNOR. Vérifier la couleur du contrôle négatif après une incubation de 2 h 40 min, puis toutes les 5 minutes, jusqu'à ce que la couleur passe du violet au jaune. À ce stade, les échantillons doivent être comparés au contrôle négatif, car une mesure retardée (> 5 min.) peut entraîner une augmentation des valeurs de la capacité de détection (CC_β). S'il n'y a pas de modification de la couleur avant 4 h, répéter le test. Le témoin négatif peut être préparé en congelant et en conservant le jus de viande issu d'un échantillon testé négatif. Ne surtout pas utiliser de l'eau comme témoin négatif !

Contrôle positif

Il est fortement recommandé de tester régulièrement un TÉMOIN POSITIF (protocoles fournis sur demande) pour vérifier la bonne application du test.

Conservation

Les ampoules doivent être conservées entre 3 et 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. Ces données correspondent à nos connaissances techniques actuelles et fournissent des informations sur nos produits et leur utilisation. R-Biopharm ne donne aucune garantie d'aucune sorte, exprimée ou implicite, en dehors du fait que les matières premières utilisées pour la fabrication de ce produit sont de qualité standard.

Des recommandations concernant la préparation des échantillons de poissons, de crevettes, d'œufs, de reins, de foie, d'urine, de sang et d'aliments pour animaux sont disponibles auprès de R-Biopharm AG. Ces matrices doivent être validées individuellement par le client. Des informations complémentaires sont disponibles sur demande auprès de R-Biopharm.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Aufsichtsrat/Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender/Chairman)

Vorstand/Board of Management: Christian Dreher (Vorsitzender/

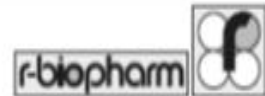
Chairman), Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister/ Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt, HRB 8321

Sitz der Gesellschaft/ Corporate Seat: Pfungstadt

USt.ID-Nr. / VAT-No.: DE 111 657 409



Annexe 2f. Notice d'utilisation 1011 en anglais : changements entre les notices 15/10/2014 et 21/03/2019).

Premi®Test

Microbial Screening test for the presumptive detection of antibiotic residues in meat, fish, shrimps, eggs, kidneys, liver, urine, blood and feed. NF VALIDATION certification scope includes beef, pork and poultry meat (with the exception of ground meat).



RBP 31/02 - 04/11 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
End of validity: 30th August 2018
<http://nf-validation.afnor.org>

2014/10/15 - insert 1011

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 standardised number of spores are imbedded 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 fish, shrimps, eggs, kidneys, liver, urine, blood and feed are available at R-Biopharm AG.

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 as needed).
- Take approximately 2 cm³ 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 bulletin on the Multipress is available at www.r-biopharm.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 color.
- All necessary equipment (meat press, scissors, incubator, and timer) are available in the Premi®Test Starter Kit.
- To facilitate the use of the Premi®Test there is a Powerpoint document available on request for all users.

Reading test results

- Read the color only from the bottom 2/3 part of the ampoule.
- A clear color change (from purple towards yellow) indicates the absence of antibiotics / sulphonamides above the detection limit.
- No clear color 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 (obligatory for NF VALIDATION)**. Start to check the color of the negative control after an incubation time of 2 h 40 min and then in intervals of 5 min until the color of the negative control has changed from purple to yellow. If there is no color change of the negative control after 3 h 10 min, repeat the test. The negative control can be prepared by freezing and storing meat juice from a sample tested negative. **Never use water as a negative control!**

Positive control

It is recommended to test regularly a positive control (protocol is available from R-Biopharm AG) 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. The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

R-Biopharm AG
Postanschrift / Postal Address:
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt, Germany
Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-mail: Info@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats / Chairman of
Supervisory Board:
Dietrich Mollat
Vorstand / Board of Management:
Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),
Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert
Handelsregister / Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt HRB 8321



Premi®Test



RBP 31/02-04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
End of validity: 30th August 2022
<http://nf-validation.afnor.org>

Microbial Screening test for the presumptive detection of antibiotic and sulfonamide residues in particularly fresh meat. NF VALIDATION certification scope includes beef, pork and poultry meat (with the exception of ground meat). The following selected antibiotics were investigated:
Penicillins: Penicillin G (CC β = 6 μ g/kg); Amoxicillin (CC β = 11 μ g/kg); Cloxacillin (CC β = 150 μ g/kg)
Tetracyclines: Chlorotetracycline (CC β = 160 μ g/kg); Oxytetracycline (CC β = 160 μ g/kg); Doxycycline (CC β = 100 μ g/kg)
Sulfonamides: Sulfadimethoxine (CC β = 75 μ g/kg); Sulfadiazine (CC β = 90 μ g/kg)
Macrolides: Erythromycine A (CC β = 200 μ g/kg); Tylosine A (CC β = 90 μ g/kg)
The CC β values were determined by spiking in meat juice; the detection capabilities in other samples may differ.
Cephalosporins, Aminoglycosides, Amphenicols, Quinolones, Tiamulin, and Lincomycin are detected above the Maximum Residue Level (MRL).
2019/03/21 - Insert 1011

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 sulfonamide residues particularly in fresh meat, in the range of MRL.

Test principle

Premi®Test is based on the inhibition of the growth of *Bacillus stearothermophilus*, a micro-organism very sensitive to many antibiotic and sulfonamide residues.

A standardised number of spores are imbedded 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.

Caution

This test is sensitive to certain 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 as needed).
- Take approximately 2 cm³ of lean meat and use a meat press to extract approximately 250 μ l of meat fluid. Alternatively, the meat juice can be obtained with the help of the Multipress or by freeze/thawing the meat. (A technical bulletin on the Multipress is available at www.r-biopharm.com).
- Use a new disposable tip on the syringe for each sample.
- Pipette 100 μ l 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 \pm 1 °C).
- It is required 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 color.
- All necessary equipment (meat press, scissors, incubator, and timer) are available in the Premi®Test Starter Kit.
- To facilitate the use of the Premi®Test there is a Powerpoint document available on request for all users.

Reading test results

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

Negative control

The use of a negative control is required (obligatory for NF VALIDATION). Start to check the color of the negative control after an incubation time of 2 h 40 min and then in intervals of 5 min until the color of the negative control has changed from purple to yellow. At that time, the samples should be compared to the negative control, because a delayed measuring (> 5 min.) can lead to increased values of the detection capability (CC β). If there is no color change of the negative control after 4 h, repeat the test. The negative control can be prepared by freezing and storing meat juice from a sample tested negative. Never use water as a negative control!

Positive control

It is strongly recommended to test a positive control (protocol is available from R-Biopharm AG) 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. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality.


Recommendations for sample-preparations of fish, shrimps, eggs, kidney, liver, urine, blood and feed are available at R-Biopharm AG. These matrices require individual validation by the customer. Supportive information are available at R-Biopharm upon request.

R-Biopharm AG
Postanschrift / Postal Address:
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt, Germany
Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-mail: info@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

Aufsichtsrat/Supervisory Board:
Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender/Chairman)
Vorstand/Board of Management: Christian Dreher (Vorsitzender/
Chairman), Dr. Hans Frickel, Jochen Hirscher, Dr. Peter Schubert
Handelsregister/ Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt, HRB 8321
Sitz der Gesellschaft/ Corporate Seat: Pfungstadt
USt.ID-Nr. / VAT-No.: DE 111 657 409



Annexe 3. Certificat No. 060601 d'Octobre 2021.


CERTIFICATION
AOAC® Performance TestedSM

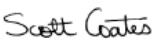
Certificate No.
060601

The AOAC Research Institute hereby certifies the performance of the method known as:

Premi®Test

manufactured by
DSM PREMI® Test B. V.
P. O. Box 6500
6401 JH HEERLEN
The Netherlands

This method has been evaluated in the AOAC® Performance Tested MethodsSM Program and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certificate means that an AOAC® Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Performance TestedSM certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above-mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (October 23, 2021 – December 31, 2022). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

 _____ Scott Coates, Senior Director Signature for AOAC Research Institute	October 23, 2021 _____ Date
--	-----------------------------------

2275 Research Blvd., Ste. 300, Rockville, Maryland, USA Telephone: +1-301-924-7077 Fax: +1-301-924-7089
Internet e-mail: aoacri@aoac.org * World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

METHOD AUTHORS Angelique de Rijk	MANUFACTURER DSM Nutritional Products DSM Premi® Test BV P. O. Box 6500 6401 JH Heerlen The Netherlands	CERTIFICATION MARK LICENSÉE R-Biopharm AG An der Neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
METHOD NAME Premi® Test	CATALOG NUMBERS R3925, R3900	
INDEPENDENT LABORATORY Central Science Laboratory (CSL) York YO41 1LZ, England USDA Agricultural Research Service Eastern Regional Research Center Microbial Biophysics and Residue Chemistry Research Unit 600 East Mermaid Lane Wyndmoor, PA 19038, USA	AOAC EXPERTS AND PEER REVIEWERS Joe Boison ¹ , Michael Murphy ² ¹ Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon, SK, Canada ² University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA	
APPLICABILITY OF METHOD Target analyte – Penicillin G Matrix – Bovine muscle tissue Performance claims – See Table 1		
ORIGINAL CERTIFICATION DATE September 27, 2006	CERTIFICATION RENEWAL RECORD Renewed annually through December 2022.	
METHOD MODIFICATION RECORD 1. November 2019 Level 1	SUMMARY OF MODIFICATION 1. Editorial changes to inserts.	
Under this AOAC® Performance Tested™ License Number, 060601 this method is distributed by: NONE	Under this AOAC® Performance Tested™ License Number, 060601 this method is distributed as: NONE	

PRINCIPLE OF THE METHOD (1)

The Premi®test is based on the inhibition of the growth of *Bacillus Stearothermophilus*, a bacterium which is very sensitive to many antibiotics and sulfa compounds. A standardized number of spores are imbedded in an agar medium with selected nutrients. A small amount of meat juice is added to the test tube. After a pre-incubation period of 20 minutes at room temperature (18-22 °C i.e. 64.4-71.6 °F), the test tube is washed and incubated for approximately 3 hours at 64°C (147°F). At this temperature, the spores will start to grow (germinate) and multiply with the production of acid if no antimicrobial (non-inhibitory) substances are present in the meat juice. This will be visible by a color change in the test tube from purple to yellow. When antimicrobial (inhibitory) substances are present (at or above the detection sensitivity), no growth will occur and the color in the test tube will remain purple.

DISCUSSION OF THE VALIDATION STUDY (1)

The results show that PremiTest met all the requirements for this AOAC validation study for the detection of penicillin G residues in bovine muscle tissue. The results also show that there is cross reactivity with many other antimicrobial compounds. PremiTest is a broad-spectrum screening test which can detect many relevant antimicrobials in meat.

Dossier de reconduction réalisé dans le cadre de la marque NF VALIDATION du Premi®Test (r-Biopharm) pour la détection des antibiotiques dans le muscle

R-biopharm Premi®Test, AOAC® Performance Tested™ Certification Number 060601

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

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 .

Table 9: Scanner results to confirm the Premi®Test's detection sensitivity as 10 ppb for penicillin G (1)

Zero control			
Sample	Interpreted Scanner Results	Sample	Interpreted Scanner Results
	NEG		
1	NEG	9	
2	NEG	10	
3	NEG	11	NEG
4	NEG	12	NEG
5	NEG	13	NEG
6	POS	14	NEG
7	NEG	15	NEG
8			NEG
Penicillin G 10 ppb			
Sample	Interpreted Scanner Results	Sample	Interpreted Scanner results
	POS		POS
	POS		POS
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		29	
15		30	

REFERENCE CITED

1. de Rijk, Angélique., Validation Study Report Premi®Test, AOAC® Performance Tested™ certification number 060601.

Annexe 4. Tableau de synthèse des réclamations depuis 2018/2019.

En couleur les clients qui ont fait plus d'une réclamation.

Start	Complaint-No.	Lot	Complaint
26.03.2018	REM-R3900-115199	17H07/16	Liquid leaked
31.10.2018	REM-R3900-116382	18F01B16	Contents of the ampoules liquefied
02.01.2019	REM-R3900-116712	18F01/16	Deformations on the media, during pipetting
07.01.2019	REM-R3900-116732	18F01B16	Gel partially liquefied
25.01.2019	REM-R3925-116851	18F01/16	Tubes are insufficiently filled
10.04.2019	REM-R3925-117223	18L18/16	No color change
16.05.2019	REM-R3925-117374	18L10/16	Fill level
24.07.2019	REM-R3900-117745	18L18/16	2 Tubes are dried out
26.07.2019	REM-R3925-117755	19D15/16	Wrong delivery
16.08.2019	REM-R3925-117853	19A04/16	Delivery went to wrong customer
04.09.2019	REM-R3925-118114	19D15/16	Results for egg samples are not correct
15.10.2019	REM-R3900-118173	19B18/16	Results are not correct
18.10.2019	REM-R3925-118190	19D15/16	Ampoules underfilled
22.11.2019	REM-R3900-118372	19H12/16	Forwarder has not found address
20.07.2020	REM-R3900-119485	20E08/16	Customer complains about fill level
07.08.2020	REM-R3925-119550	20D15/16	underfilled ampoule
08.10.2020	REM-R3925-119842	20C10/16	displaced gel in ampoule
14.10.2020	REM-R3925-119863	20A20B16	Tube insufficiently filled
06.11.2020	REM-R3900-119954	20F11/16	Syringes for dosing not included in any kit
19/03/2021	REM-100277 - R3900	20I08/16	Delayed colour change
12/04/2021	REM-100367 - R3925	20I03/16	Gel partially liquefied
20/04/2021	REM-120059 - R3925	21A18/16	Component missing
28/05/2021	REM-120182 - R3900	21B25/16	no colour change for negative control after 3h
04/06/2021	REM-120198 - R3925	21B25/16	no colour change for negative control after 3h
30/06/2021	REM-120305 - R3925	21A18/16	Vial unfilled
27/07/2021	REM-120385 - R3925	21D14/16	discolored gel in a tube
25/08/2021	REM-120498 - R3925	21D13/16	Vial unfilled
16/12/2021	REM-120905 - R3900	21F16/16	no colour change for negative control after 3h
21/01/2022	REM-121002 - R3900	21F30/16	Component unfilled

Annexe 5. Limites de détection du Premi®Test annoncées par le fabricant.

● Premi®Test detection limits in different animal food products

Substance	Chicken	Pork	Beef	Egg	Shrimp
β-lactams					
Amoxicillin	5	5	5	5	15
Ampicillin	5	5	5	5	
Penicillin-G	2,5	2,5	2,5	2,5	5
Cloxacillin		>100		100	
Oxacillin		100			
Dicloxacillin					
Cephalosporins					
Cefquinome	75	100	100		
Ceftiofur	100	200	100	400	
Macrolides					
Tylosin	50	25 - 50	50	50	
Erythromycin	100	100	100	50	100
Lincomycin	100	100	100		
Tilmicosin	50	50	50		
Spiramycin	1000	1000	1000		
Tetracyclines					
Chlortetracycline	100	100	100	600	1000
Oxytetracycline	100	100	100	400	100
Doxycycline	100	100	100	200	
Tetracycline		50		200	
Demeclocycline		50			
Sulphonamides					
Sulphamethazine	75	50-100	100	25	
Sulphadiazine	75	50-75	75	25	50
Sulphamethizole		50-100			
Sulphaguanidine	<200	150	<200		
Sulphadimethoxine		25 - 50	<100		50
Sulphapyridine	<50	50	<100		
Sulphamethoxypyridine	<100	25			
Sulphisoxazole	<100	25			
Sulphathiazole	<100	25			
Sulphachloropyridazine	<100	25			
Sulphamerazine	<100	25	<100		
Sulphanilamide	<100	150			
Sulphaquinoxaline	<100	50	<50		
Sulphamethiazole	<100		<50		
Sulfamethoxazole				25	

All detection limits are given in µg/kg = ppb

Substance	Chicken	Pork	Beef	Egg	Shrimp
Aminoglycosides					
Gentamicin	100	100	100	100	
Streptomycin	1500	1500	3000	1000	
Neomycine	300	300	300	300	200
Dihydrostreptomycin					
Quinolones					
Oxolinic acid					>10000
Enrofloxacin	>600	>600	>600		
Flumequine	>100	>100	>100		
Polypeptides					
Virginiamycin	500	500	500		
Bacitracin	500	500	500		
Zn-bacitracin	1250				
Colistin	>1000				
Ionophores					
Salinomycin	1000				
Monensin	1250				
Oligosaccharides					
Avilamycin	>5000				
Others					
Florphenicol	100	100	100		5000
Chloramphenicol	2500	2500	2500	2500	
Trimethoprim	50				
Narasin	1250				
Amprolium	>2000				
Phosphomycine	>1500				
Ronidazole					>5000
Furazolidone	>1500				