



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

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

VERSION 2 du 03/07/2026

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
3.4. Reconduction en 2022.....	26
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).....	32
5. UN BILAN DES RECLAMATIONS UTILISATEURS	35
6. UN ETAT DES MODIFICATIONS INTERVENUES DEPUIS LA PRECEDENTE VALIDATION	35
7. UNE PRESENTATION DES MODIFICATIONS EVENTUELLES ENVISAGEES DANS LA METHODE ALTERNATIVE.....	36
8. UN PROJET DE COMPLEMENT D'ETUDE DE VALIDATION SI NECESSAIRE	36
10. CONCLUSIONS.....	36
11. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	38
12. ANNEXES	42
Annexe 1. Certificat No. RBP 31/02 – 04/11 (2022).....	43

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 2a. Notice d'utilisation 1011 (29/11/2010).....	45
Annexe 2b. Notice d'utilisation 1011 (15/10/2014).....	46
Annexe 2c. Notice d'utilisation 1011 Recto (21/03/2019).....	47
Annexe 2d. Notice d'utilisation 1011 Verso (21/03/2019).	48
Annexe 2e. Agrandissement de la notice d'utilisation 1011 en français (21/03/2019).....	49
Annexe 2f. Notice d'utilisation 1011 en anglais : changements entre les notices 15/10/2014 et 21/03/2019).	51
Annexe 2g. Notice d'utilisation 1012 (16/05/2022).....	53
Annexe 2h. Notice d'utilisation 1013 (17/10/2025).....	55
Annexe 2i. Notice d'utilisation 1014 (21/05/2026).....	57
Annexe 3a. Certificat No. 060601 d'Octobre 2021.	65
Annexe 3b. Certificats No. 060601 de Décembre 2022 à Décembre 2025.....	68
Annexe 3c. Certificat No. 060601 de Janvier 2026 (validité 31/12/2026).	71
Annexe 4. Tableau de synthèse des réclamations de 2022 au 09/03/2026.	74
Annexe 5a. Limites de détection du Premi®Test annoncées par le fabricant (Mars 2022).	75
Annexe 5b. Matériel commercial et limites de détection du Premi®Test annoncées par le fabricant (Juin 2026).	76

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: 16 Juin 2022.
- Date de fin de validité : 30 Août 2026.

L'attestation de la certification NF VALIDATION RBP 31/02-04/11 est présentée en [Annexe 1 \(2022\)](#).

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 gélose dans l'ampoule. N'altérez pas la gélose.		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



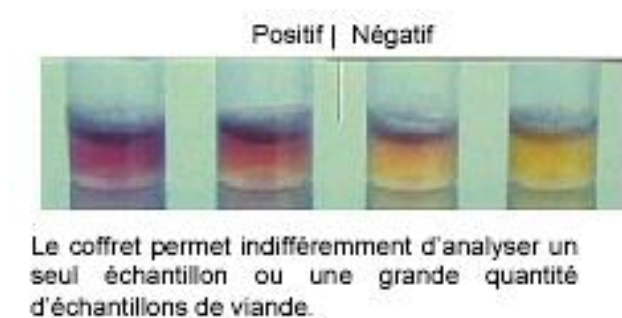
Positif → Pas de bactérie → Pas de changement de couleur



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.



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](#)).

En 2022, la reconduction a porté sur la notice suivante : **Notice 1011 (21/03/2019)** ([Annexes 2c à 2e](#)).

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.

Après le BT AFNOR de 2022, la nouvelle notice était : **Notice 1012 (16/05/2022)** ([Annexe 2g](#)). Une nouvelle version avait été éditée : **Notice 1013 (17/10/2025)** ([Annexe 2h](#)).

Aujourd'hui, la reconduction porte sur la notice suivante : **Notice 1014 (21/05/2026)** ([Annexe 2i](#)).

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

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 et attestation	<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	Etapas 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 Boîtes et avec le Premi®Test. Le tableau suivant permet de résumer les résultats obtenus.

Tableau 3. Comparaison des performances de la méthode des 4 Boîtes 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 Boîtes	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 Boîtes 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 Boîtes**. En effet la sensibilité de la méthode des 4 Boîtes 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 Boîtes.
- 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 Boîtes (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 Boîtes. 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 Boîtes. 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 oxytetracycline	L0	0	36	0	0%	FP0 ^(a)
	L1	20	36	0	0%	FP1 ^(b)
	L2	200	32	4	11%	VP2 ^(c)
	L3	400	11	25	69%	VP3 ^(d)
Porc ceftiofur	L0	0	30	6	17%	FP0
	L1	40	34	2	6%	FP1
	L2	400	32	4	11%	VP2
	L3	800	0	36	100%	VP3
Bœuf sulfadimerazine	L0	0	32	4	11%	FP0
	L1	20	33	3	8%	FP1
	L2	200	30	6	17%	VP2
	L3	400	17	19	53%	VP3
Poulet Tylosine	L0	0	36	0	0%	FP0
	L1	10	36	0	0%	FP1
	L2	100	6	30	83%	VP2
	L3	200	0	36	100%	VP3

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

Certains laboratoires ont obtenu des résultats faux-positifs au niveau L0 pour le matériau porc ceftiofur (2 laboratoires) et le matériau bœuf sulfadimerazine (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 Boîtes (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.

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 β) 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 µg/kg (5 fois sur 5).
- La méthode des 4 Boites présente toujours un défaut de détection de la tylosine (10*LMR nouvelle version / > 7.5 LMR en 2006). Or le Premi®Test est capable de détecter la tylosine au minimum à 2*LMR (200 µg/kg) (100 % des laboratoires dans l'étude collaborative) et même à la LMR (100 µg/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 β est resté fixé à la LMR (50 µg/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 µg/kg. Donc si on comparait à présent la nouvelle MR et la MA, on conclurait que les 2 méthodes ont des seuils de détection équivalents et donc l'exactitude relative serait très bonne, et même la MA reste plus sensible que la MR pour l'amoxicilline, comme c'était le cas avec la 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) (cf. Capacités de détection en [Annexes 5a et 5b](#)).

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**

([Annexes 2e, 2g, 2h et 2i](#)) : « 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. »

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 β , 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 β . 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 β 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 β . 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 β 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 β réel.

b) Capacités de détection (CC β)

La capacité de détection CC β 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, porc 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 β . 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 amphénicols, les quinolones, la tiamuline et la lincomycine sont détectées au-dessus de la limite maximale de résidus (LMR). »

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

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. 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 CCβ ≤ à la ½ LMR : Analyse de 20 échantillons
- Si le CCβ est compris entre la ½ LMR et 90% de la LMR : Analyse de 40 échantillons
- Si le CCβ 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 (µg/kg)	CCβ fabricant (µg/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	Sulfadimethoxine	100	75	40
	Sulfadiazine	100	75	40
MACROLIDES	Erythromycine A	200	100	20
	Tylosine	100	50	20

Chaque CCβ 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 CC β 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 (CC β , 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 ° C $\pm$ 0,5 ° C)
- Volume d'échantillon (100 μ l $\pm$ 10 μ l)
- Pré-incubation de jus de viande sur l'agar (20 min $\pm$ 1 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 (CC β) (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 (CC β) (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

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	Sulfadimethoxine	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.

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).

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 18I17/16 (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.

3.4. Reconduction en 2022

En 2022, 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, les principaux résultats de l'étude complémentaire menée en 2018-2019

pour répondre au nouveau référentiel antibiotiques, la nouvelle étude bibliographique (2018-2022) et les réclamations fournisseurs (2018/19-2022).

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 boîtes)).

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 bêta-lactames et les sulfamides, toujours plus sensible pour ces molécules que les méthodes Boîtes type méthode des 4 Boîtes ou des 2 boîtes; 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, quel que 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 œufs. 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.

Lors de la reconduction en 2022, 8 nouvelles publications scientifiques avaient été identifiées et résumées, concernant les performances du Premi®Test dans le muscle, le foie, le rein, les produits d'aquaculture, les œufs, le lait et le miel.

Conclusion générale sur la synthèse bibliographique (2022) :

Huit 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, le foie, le rein, les produits d'aquaculture, les œufs, le lait et le miel. Le kit PremiTest® a été utilisé dans cinq études pour déterminer la prévalence de résidus d'antibiotiques dans différentes matrices alimentaires d'origine animale (muscles de porc, bœuf, poulet, poissons) (Ekli et al. 2019, Mitiku and Adugna 2018, Njoga et al. 2018). Cependant, ces échantillons suspects n'ont jamais été confirmés par méthode physico-chimique, sauf dans deux études, l'une a confirmé que 5,7 % (26/450) des échantillons contenaient des tétracyclines (Bahmani et al. 2020) et l'autre des résidus d'amoxicilline, d'oxytétracycline, de tétracycline, et de tylosine dans le muscle, le foie et les reins (Sallam et al. 2022).

Trois autres articles présentaient la comparaison des performances du Premi®Test avec d'autres méthodes (microbiologiques). Le premier a comparé le Premi®Test avec la méthode des 4 Boîtes (FPT) et un test ELISA pour la détection de l'oxytétracycline (OTC) dans le muscle et foie de volaille (Ezenduka et al. 2019). La méthode FPT a présenté une plus grande sensibilité pour l'OTC que le kit Premi®Test (conforme à la validation 2018-2019 CCβ OTC > LMR). Ensuite, le Premi®Test a été comparé avec 3 autres méthodes microbiologiques (Kožárová et al. 2020). Les tests d'inhibition microbienne se sont avérés utiles pour détecter les antibiotiques, mais aussi les anticoccidiens dans différents aliments d'origine animale (tissus, lait, œufs). Enfin, le Premi®Test a été comparé avec une nouvelle méthode basée sur l'inhibition microbiologique, utilisant la souche *Geobacillus stearothermophilus* C953, dans le lait, les œufs de poule et le miel. Les limites de détection (LOD) de cette méthode pour différents types d'antibiotiques dans les œufs de poule étaient inférieures ou équivalentes aux LMR et aux LOD du Premi®Test (à l'exception des sulfamides). Pour le miel, les LOD étaient inférieures ou équivalentes aux LOD du Premi®test. (Wu et al. 2021).

A ce jour, 13 nouvelles publications scientifiques ont été identifiées et résumées, concernant les performances du Premi®Test dans le muscle, le foie, le rein, les produits d'aquaculture, les œufs, le lait et le miel.

- Détection de résidus d'antibiotiques dans la viande de chameau et de chèvre vendue sur les marchés de la ville de Mogadiscio, en Somalie (Mohamed et al. 2022) :

Cette étude visait à déterminer la prévalence des résidus d'antibiotiques dans la viande fraîche de chameau et de chèvre provenant de trois marchés de la ville de Mogadiscio, à l'aide du kit Premi®. Les

résultats ont montré une prévalence légèrement plus élevée de résidus d'antibiotiques dans la viande de chameau (par rapport à la viande de chèvre).

- **Détection et incidence des traitements thermiques sur les résidus de tétracycline dans la viande de poulet vendue dans la ville d'Amman, en Jordanie (Aboudi et al. 2022) :**

Cette étude a porté sur le type et la concentration de tétracyclines dans des échantillons de viande de volaille en Jordanie. Au total, 180 échantillons (muscles, foies et reins) ont été prélevés de manière aléatoire à l'abattoir et ont fait l'objet d'un dépistage qualitatif à l'aide du Premi®Test et d'une analyse quantitative par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour détecter la présence d'oxytétracycline, de tétracycline et de chlortétracycline. 84 échantillons (46,6 %) ont donné un résultat positif pour la présence de résidus de tétracycline. Sur les 84 échantillons positifs, les molécules mères de tétracyclines ont été identifiées dans 12 (6,6 %) échantillons de muscle, 14 (7,7 %) de foie et 13 (7,2 %) de rein. De plus, les échantillons dépassant la limite maximale de résidus représentaient respectivement 4,4 %, 5,0 % et 2,7 % des échantillons de muscle, de foie et de rein.

- **Résidus d'antibiotiques dans des échantillons de viande fraîche de poulet, de poisson et de bœuf prélevés à Maiduguri, au Nigeria (Mustapha et al. 2023) :**

Cette étude visait à déterminer la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes fraîches. Au total, 150 échantillons de viande fraîche (poulet, poisson et bœuf) ont été prélevés dans différents points de vente, puis analysés à l'aide du Premi®Test. Les résultats ont montré que 127 échantillons de viande sur 150 (84,7 %) étaient positifs aux résidus d'antibiotiques. Des résidus d'antibiotiques ont été détectés dans la viande de poulet (47/50, soit 94 %), suivie du poisson (43/50, soit 86 %) et du bœuf (37/50, soit 74 %). Les résultats de cette étude montrent la présence de résidus d'antibiotiques dans la viande.

- **Prévalence des résidus d'antibiotiques dans la viande de porc au Kenya et intérêt de l'utilisation des lésions macroscopiques comme approche fondée sur les risques pour prédire la présence de résidus dans la viande (Bor et al. 2023):**

Cette étude visait à déterminer la présence de résidus d'antibiotiques dans des carcasses de porcs. Au total, 387 échantillons de viande de porc ont été analysés pour détecter la présence de résidus d'antibiotiques à l'aide du Premi®Test. La prévalence des résidus d'antibiotiques était de 41,26 %.

- **Étude sur les résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet de chair dans le nord de l'Iran (Vahedi Nouri and Salehi 2024) :**

Cette étude visait à déterminer la présence de résidus d'antibiotiques dans la viande de poulet de chair. Sur 200 carcasses analysées, 108 carcasses (54 %) contenaient des résidus d'antibiotiques.

- **Résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale au Cameroun : prévalence, perception des risques par les consommateurs et attitudes (Mouliom Mouiche et al. 2024) :**

Cette étude avait pour objectif d'évaluer la présence de résidus d'antibiotiques dans les œufs crus, le lait cru et la viande bovine. Des kits de dépistage qualitatif des résidus d'antibiotiques (PremiTest® et Delvotest®) ont été utilisés pour analyser 407 échantillons. Une prévalence de résidus de 70,55 %, 17,39 % et 69,63 % a été observée respectivement pour le bœuf, les œufs et le lait.

- **Dépistage rapide des résidus d'antibiotiques pour sensibiliser davantage à la sécurité sanitaire des aliments d'origine animale (Widiasih et al. 2024) :**

L'objectif de cette étude était de détecter la présence de résidus d'antibiotiques. 345 échantillons d'aliments d'origine animale ont été analysés à l'aide du Premi®Test. La présence de résidus d'antibiotiques a été constatée dans 9,28 % des cas (32/345), dont 11,3 % (18/97) d'échantillons de poisson, 15,65 % (1/114) d'œufs et 0,87 % (13/102) d'échantillons de viande de poulet. Le pourcentage le plus élevé d'échantillons positifs pour les résidus d'antibiotiques était de 21,9 % (7/32) parmi les échantillons de viande provenant de supermarchés. Le nombre d'échantillons contenant des résidus d'antibiotiques était plus élevé dans les échantillons de poisson prélevés dans la régence de Sleman, atteignant 25 % (8/32), tandis que dans les échantillons de poisson provenant de supermarchés, le pourcentage de positifs était de 18,8 % (6/32).

- **Utilisation vétérinaire d'antibiotiques et contamination de la viande de porc consommée en Côte d'Ivoire par des résidus d'oxytétracycline, de tylosine et d'amoxicilline (Kaba et al. 2026) :**

Cette étude visait à évaluer les concentrations de trois antibiotiques à usage vétérinaire dans la viande de porc. Des échantillons de muscle prélevés sur 90 porcs ont été analysés à l'aide du Premi®Test. Les concentrations de résidus d'oxytétracycline, de tylosine et d'amoxicilline ont été mesurées par CLHP. Sur les 90 échantillons analysés, 31,11 % étaient contaminés par de l'oxytétracycline, de la tylosine et de l'amoxicilline. Le niveau moyen de contamination de la viande de porc par les résidus d'oxytétracycline était de $488,57 \pm 285,95 \mu\text{g/kg}$; ceux des résidus de tylosine et d'amoxicilline étaient respectivement de $353,21 \pm 391,51$ et $279,64 \pm 104,82 \mu\text{g/kg}$. Par rapport aux LMR, les quantités de résidus détectées dans la viande de porc étaient bien supérieures

- **Analyse exhaustive de la salinomycine dans les aliments pour animaux et de ses résidus dans les tissus de volaille à l'aide de tests d'inhibition microbienne associés à un dosage immuno-enzymatique (ELISA) (Spišáková et al. 2024) :**

L'objectif de cette étude était d'évaluer la pertinence de trois tests d'inhibition microbienne (MIT) : Premi®Test, Explorer 2.0, et le Screening Test for Antibiotic Residues (STAR) associé au test immuno-enzymatique (ELISA), pour le dépistage des résidus de salinomycine dans les tissus de poulets de chair (muscles de la poitrine et de la cuisse, cœur, foie, gésier, reins, poumons, rate, peau et graisse) nourris avec des aliments commerciaux contenant 70 mg/kg de salinomycine dans l'aliment complet. Le premier dépistage des résidus (échantillonnage A) a été réalisé le dernier jour d'administration de l'aliment médicamenteux à base de salinomycine (jour 30), et le deuxième dépistage (échantillonnage B) a été réalisé le jour de l'abattage (jour 37), après l'expiration de la période d'attente et l'alimentation avec des aliments non médicamenteux. Sur la base de la confirmation quantitative des résidus de salinomycine dans les tissus de poulet examinés par la méthode ELISA (échantillonnage A de 0,025 à 0,241 mg/kg ; échantillonnage B de 0,003 à 0,076 mg/kg), tous les MIT, y compris le Premi®Test, ont démontré leur capacité à détecter les résidus de salinomycine dans les tissus de poulets de chair à un niveau correspondant aux LMR.

- **Résidus d'antibiotiques dans les poissons d'eau douce commercialisés en Côte d'Ivoire : comparaison entre le tilapia importé d'Asie et le tilapia local (Diakité et al. 2025) :**

L'objectif de cette étude était d'évaluer la contamination des tilapias importés d'Asie et des tilapias produits localement par des résidus d'antibiotiques, à l'aide du Premi®Test. Sur 118 poissons testés,

22, soit 18,6 %, étaient contaminés par des résidus d'antibiotiques au-delà du seuil de détection. Plus spécifiquement, 55,9 % des tilapias importés d'Asie étaient contaminés par des résidus d'antibiotiques contre seulement 3,6 % des tilapias provenant de la pisciculture locale.

- **Utilisation d'antibiotiques et détection de résidus dans les œufs de pintade dans les zones rurales du Togo : une évaluation des pratiques et des risques (Tcheou et al. 2025) :**

L'objectif de cette étude était d'évaluer les pratiques en matière de traitement antibiotique et de détecter la présence de résidus d'antibiotiques dans les œufs provenant d'élevages de pintades. Une analyse qualitative de la présence de résidus d'antibiotiques dans les œufs de pintade a été réalisée à l'aide du Premi®Test. 49,43 % des échantillons d'œufs de pintade analysés contenaient des résidus d'antibiotiques.

- **Détection d'antibiotiques dans les œufs de poules pondeuses (Gallus gallus domesticus) commercialisés dans la ville de Machala, en Équateur (Vargas-González et al. 2025) :**

L'objectif de cette étude était de déterminer la présence d'antibiotiques dans les œufs de poules pondeuses. Les analyses ont porté sur le jaune et le blanc des œufs avec le Premi®Test. Il a été constaté que 20 % des échantillons contenaient des résidus d'antibiotiques.

- **Prévalence des résidus d'antibiotiques dans les aliments pour volaille disponibles dans le commerce et dans la viande provenant de volailles d'élevage industriel et de basse-cour à Iquitos, au Pérou (Fischer et al. 2026) :**

Cette étude visait à déterminer la prévalence d'antibiotiques dans les aliments pour volaille et la viande de volaille. Les aliments pour animaux (59 échantillons) et la viande (276 poulets de chair) ont été testés pour détecter la présence d'antibiotiques avec le Premi®Test. Des résidus d'antibiotiques ont souvent été détectés dans les aliments pour volaille (49,2 % positifs) et la viande de volaille peu transformée (27,7 % positifs), et ce à différents stades de la chaîne de production avicole. Des résidus d'antibiotiques ont été fréquemment détectés dans la viande de poulet, qu'elle ait été achetée en supermarché ou sur des marchés en plein air (99 échantillons, 35,4 % positifs).

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

Le kit Premi®Test est toujours certifié par l'AOAC, sans essais complémentaires à réaliser depuis le début de la validation. Les certificats AOAC de Décembre 2022 à Décembre 2025 sont présentés en [Annexe 3b](#). Le certificat le plus récent date du 14 Janvier 2026 ([Annexe 3c](#)).

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	16Juin 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.

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 Premi®Test est capable de détecter les résidus de pénicilline G dans des muscles de bovin artificiellement **contaminés** à **10 µg kg⁻¹** avec un niveau de confiance de 95%.
- Il a été confirmé que le Premi®Test est également capable de détecter des résidus de pénicilline G dans des muscles de bovin **naturellement chargés** à des concentrations supérieures ou égales à **12 µg kg⁻¹** avec un niveau de confiance de 95%.
- Le Premi®Test présente des réactions croisées avec les médicaments suivants à un niveau de **100 µg kg⁻¹** :
 - β-lactamines: amoxicilline, ampicilline, céphapirine, cloxacilline ;
 - Tétracyclines: chlortétracycline, tétracycline ;
 - Macrolides: érythromycine, tylosine, tilmicosine ;
 - Glycopeptides: Virginiamycine ;
 - Sulfamides: sulfadiazine, 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 28 réclamations clients a été transmis au laboratoire expert par le fournisseur (nombre similaire aux renouvellements de 2018-2019 et 2022) (cf. [Annexe 4](#)).

Ces réclamations ont eu lieu entre Janvier 2022 et Mars 2026, en provenance de 17 clients différents. Les réclamations étaient en lien avec 19 lots différents de Premi®Test.

- 6 réclamations étaient des réclamations commerciales ou logistique (problème de livraison ou d'étiquetage).
- 17 réclamations concernaient des problèmes de réactifs (réactif manquant ou endommagé, tube pas assez rempli).
- 5 réclamations reportaient des problèmes de résultats (faux-positifs et/ou faux négatifs). Pour 4 réclamations sur 5, le client n'a pas suivi les instructions d'utilisation (erreur de manipulation). Pour la dernière réclamation, le client n'a détecté ni l'enrofloxacin à 1 000 µg/kg, ni la lincomycine à 222 µg/kg. Or, selon la notice d'utilisation, la LOD de l'enrofloxacin (LMR 100 µg/kg) est > 600 ppb et celle de la lincomycine (LMR 100 ppb) est de 100 ppb. Suite à cette réclamation, la LOD de la lincomycine a été modifiée dans le matériel commercial : elle passe de 100 ppb à > 100 ppb (cf. [Annexe 5b](#)).

27 réclamations ont été soldées. Une seule est en cours et concerne une erreur de livraison. En conclusion, ces 28 réclamations 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

- Nouvelle version 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°12, Septembre 2024), qui remplace la révision n° 01 de Juin 2017.
 - o Cette nouvelle version est sans impact sur les résultats de la validation réalisée en 2018-2019. En effet, cette nouvelle version a intégré les évolutions réglementaires européennes

(remplacement de la décision EU/2002/657 par le règlement EU/2021/808). Ces évolutions n'ont pas modifié les règles de validation pour les méthodes de dépistage. Cette modification n'implique donc pas d'essais complémentaires.

- 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 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). 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.

Aboudi AR, Almashhadany DA, Hijazin M. 2022. Detection and impact of heat treatments on tetracycline residues in chicken meats sold in Amman city, Jordan. Food Research. 6:53-59.

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.

Bor N, Seguino A, Sentamu DN, Chepyatich D, Akoko JM, Muinde P, Thomas LF. 2023. Prevalence of Antibiotic Residues in Pork in Kenya and the Potential of Using Gross Pathological Lesions as a Risk-Based Approach to Predict Residues in Meat. Antibiotics. 12:492.

Cantwell H, O'Keeffe 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: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_vet-med-residues_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.

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

Diakité A, Monde EF, Kouamé KYE, Yao AM, Nzoughet Kouassi J, Cachet X. 2025. Résidus d'antibiotiques dans les poissons d'eau douce commercialisés en Côte d'Ivoire : comparaison entre le tilapia importé d'Asie et le tilapia local. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. 78:1-9.

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.

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.

Fischer E, Huiñapi Z, Zegarra Paredes LF, Olortegui MP, Yori PP, Schiaffino F, Kosek MN. 2026. Prevalence of Antibiotic Residues in Commercial Poultry Feed and Meat from Industrial and Backyard Poultry in Iquitos, Peru. *IJID One Health*. 100112.

Gaudin V, Gauguain-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.

Kaba S, Koko KB, Zannou-Tchoko VJ, Konan BA, Datté JY. 2026. VETERINARY USE OF ANTIBIOTICS AND CONTAMINATION OF PORK CONSUMED IN CÔTE D'IVOIRE BY OXYTETRACYCLINE, TYLOSIN AND AMOXICILLIN RESIDUES. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 29:180-188.

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.

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

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.

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, Adugna 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.

Mohamed MA, Ali A, Shair MA, Abatcha M, Hersi M, Ahmed A, Osman A. 2022. Detection of antibiotic residues in camel and goat meat from markets in Mogadishu city, Somalia. PAMJ - One Health. 9:

Mouliom Mouiche MM, Okah-Nnane NH, Moffo F, Djibo I, Mapiefou NP, Mpouam SE, Mfopit YM, Mingoas J-PK, Tebug SF, Ndukum JA. 2024. Antibiotic Residues in Foods of Animal Origin in Cameroon: Prevalence, Consumers' Risk Perceptions, and attitudes. J. Food Prot. 87:100237.

Mouokeu RSN, J-M.;choumboungang, F.T. ;Ngono Mballa, R. ;Tigmo Matiotso, C. ;Sacar Libam IV, P. ;Ndi Messi, S.B. ; Kuiate; 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.

Mustapha A, Musa S, Suleiman M, Abdullahi M, Isa T, Mahmoud F, Michael M, Mohammed J, Muhammad F, Balumi A, Ahmed U, Jacob L, Bukar H, Audu F, Musa M. 2023. Antibiotic Residues in fresh Chicken, Fish and Beef Meat samples in Maiduguri, Nigeria. Sahel Journal of Veterinary Sciences. 20:53-58.

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

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.

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.

Spišáková D, Kožárová I, Hriciková S, Marcinčák S. 2024. Comprehensive Screening of Salinomycin in Feed and Its Residues in Poultry Tissues Using Microbial Inhibition Tests Coupled to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Foods.* 13:1661.

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.

Tcheou PB, Bedekelabou AP, Adjei-Mensah B, Kpomasse CC, Talaki E, Salou M. 2025. Antibiotic use and residue detection in guinea fowl eggs in rural Togo: An assessment of practices and risks. *Veterinary and Animal Science*. 28:100448.

Vahedi Nouri N, Salehi A. 2024. Investigation of the antibiotic residues of broiler meat in northern Iran. *JSFA reports*. 4:33-38.

Vargas-González ON, Vega-Díaz OS, Maza-León JF, Sánchez-Quinche AR. 2025. Determinación de antibióticos en huevos de gallinas ponedoras (*Gallus gallus domesticus*) que se expenden en la ciudad de Machala, Ecuador. Nota técnica. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 35:6.

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.

Widiasih DA, Pratama R, Drastini Y, Putri K, Fatimah L, Indarjulianto S. 2024. Rapid testing of antibiotic residues to increase food safety awareness of animal origin. *Veterinary World*. 17:1177-1183.

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 (2022).



CERTIF 2023.1 09/2021

A RAPPELER DANS TOUTE CORRESPONDANCE

N° de dossier : MET/XSDL/NF102/Clients/R-
BIOPHARM/Décision BT_PREMI Test_2022-08-05_V1
(R3).docx

N° Prestation : NF102

DECISION RELATIVE AU DROIT D'USAGE

Affaire suivie par le Département : PGCP6
Ingénierie Certification : **Mélaine TERRO**
Tél : 01 41 62 62 39
Email : melaine.terro@afnor.org

Chargée de clientèle : **Stella DUFLO**
Tél : 01 41 62 60 63
Email : stella.duflo@afnor.org

R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt
GERMANY

À l'attention de **Mme Claire THOMAS**

Objet : Marque NF VALIDATION

La Plaine Saint-Denis, le 05 août 2022

Madame,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 16 Juin 2022 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-2026

La méthode alternative est validée pour la détection de résidus d'antibiotiques dans la viande de bœuf, le porc et la volaille (à l'exception de la viande hachée), selon le protocole de validation des méthodes de détection et de quantification des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits agroalimentaires - Rév. 1 (2017) de la marque NF VALIDATION, dans son application à l'agroalimentaire (NF102).

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

Mélaine TERRO
Ingénierie Certification



CERTIF 2023.1 09/2021

TO REMIND IN ALL CORRESPONDANCE

No. File: MET/XSDL/NF102/Clients/R-BIOPHARM/Décision BT_PREMI Test_2022-08-05_V1 (R3).docx

No. Application: NF102

DECISION RELATED TO THE USAGE RIGHT

File followed by the Department: PGCP6
Certification Engineer: **Mélaine TERRO**
Phone: +33 (0)1 41 62 62 39
Email: melaine.terro@afnor.org

Operations supervisor : **Stella DUFLO**
Phone: 01 41 62 60 63
Email: stella.duflo@afnor.org

R-BIOPHARM AG

An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt
GERMANY

To the attn. of **Mrs Claire THOMAS**

Subject: NF VALIDATION mark

La Plaine Saint-Denis, August 5th 2022

Dear Madam,

Following the positive agreement expressed on June 16th 2022, by the Technical Board of the NF VALIDATION mark (NF102), in its application to the food industry, I beg to inform you that the **NF VALIDATION certification has been renewed** for the following alternative method:

PREMI®TEST

Certificate reference No. RBP 31/02-04/11, with end of validity 30th-Aug.-2026

The alternative method has been validated for the detection of antibiotics residues in beef, pork and poultry meat (with the exception of ground meat), according to the validation protocol for detection and quantification of residues of veterinary drugs in food matrices - Rev. 1 (2017) of the NF VALIDATION mark, in its application to the food industry (NF102).

Yours Sincerely.

Mélaine TERRO
Certification Engineer

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 germées 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 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. 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 germées 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'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



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

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 (CC₅₀ = 6 µg / kg) ; Amoxicilline (CC₅₀ = 11 µg / kg) ; Cloxacilline (CC₅₀ = 150 µg / kg)

Tétracyclines : Chlortétracycline (CC₅₀ = 160 µg / kg) ; Oxytétracycline (CC₅₀ = 160 µg / kg) ; Doxycycline (CC₅₀ = 100 µg / kg)

Sulfamides : Sulfadiméthoxine (CC₅₀ = 75 µg / kg) ; Sulfadiazine (CC₅₀ = 90 µg / kg)

Macrolides : Erythromycine A (CC₅₀ = 200 µg / kg) ; Tylosine A (CC₅₀ = 90 µg / kg)

Les valeurs de CC₅₀ 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. *caldolactis* 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 (CC₅₀). 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. NFVALIDATION certification scope includes beef, pork and poultry meat (with the exception of ground meat).



RBP 31/02 - 04/11 ALTERNATIVE
ANALYTICAL METHODS FOR
AGRI-BUSINESS
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 250 µl 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 NFVALIDATION)**. 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: Chlortetracycline (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: Erythromycin 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 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 2g. Notice d'utilisation 1012 (16/05/2022).

Premi®Test



RBP 31/02-04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
End of validity: see AFNOR website
<http://nf-validation.afnor.org/en>,
search PremiTest.

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 (CCB = 6 µg/kg); Amoxicillin (CCB = 11 µg/kg); Cloxacillin (CCB = 150 µg/kg)
Tetracyclines: Chlortetracycline (CCB = 160 µg/kg); Epichlortetracycline (CCB = 500 µg/kg); Oxytetracycline (CCB = 160 µg/kg); Epioxytetracycline (CCB = 500 µg/kg); Doxycycline (CCB = 100 µg/kg)
Sulfonamides: Sulfadimethoxine (CCB = 75 µg/kg); Sulfadiazine (CCB = 90 µg/kg)
Macrolides: Erythromycine A (CCB = 200 µg/kg); Tylosine A (CCB = 90 µg/kg)
The CCB values were determined by spiking in meat juice; the detection capabilities in other samples may differ.
Tetracyclines, Cefalosporins, Aminoglycosides, Amphenicols, Quinolones, Tiamulin, and Lincomycin are detected above the Maximum Residue Level (MRL).

20220516 - Insert 1012

Contents

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

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 standardized 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 color 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 color 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 times. 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.
- Remove the required number of ampoules without damaging the aluminum foil of the adjacent ampoules.
- Remove foil carefully from the required number of ampoules (do not open more ampoules than needed).
- Take approximately 2 cm³ of lean meat and use a meat press to extract approximately 250 µL of meat fluid. Alternatively, the meat juice can be obtained by freeze/thawing the meat.
- For each sample use a new and clean pipette.
- 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 ± 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 (CCB). 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 color, in particular that of a yellow/purple result, may differ from person to person. In cases where severe consequences are involved for the user, test results should be confirmed by a validated comprehensive analytical method. 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 Hirsch, Ute Salzbrenner,
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



Premi®Test



RBP 31/02-04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
Fin de validité: see AFNOR website
<http://nf-validation.afnor.org/en>,
search PremiTest.

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 (CC₅₀ = 6 µg / kg) ; Amoxicilline (CC₅₀ = 11 µg / kg) ; Cloxacilline (CC₅₀ = 150 µg / kg)
Tétracyclines : Chlortétracycline (CC₅₀ = 160 µg / kg) ; Epichlortétracycline (CC₅₀ = 500 µg / kg) ; Oxytétracycline (CC₅₀ = 160 µg / kg) ;
Époxytétracycline (CC₅₀ = 500 µg / kg) ; Doxycycline (CC₅₀ = 100 µg / kg)
Sulfamides : Sulfadiméthoxine (CC₅₀ = 75 µg / kg) ; Sulfadiazine (CC₅₀ = 90 µg / kg)
Macrolides : Érythromycine A (CC₅₀ = 200 µg / kg) ; Tylosine A (CC₅₀ = 90 µg / kg)
Les valeurs de CC₅₀ ont été déterminées en réalisant des ajouts dosés dans du jus de viande. Les capacités de détection dans d'autres échantillons peuvent différer.
Les tétracyclines, les céfalosporines, les aminosides, les amphénicols, les quinolones, la tiamuline et la lincomycine sont détectées au-dessus de la limite maximale de résidus (LMR).

20220516 - Insert 1012

Contenu du coffret

25 ampoules contenant des spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* enrobées dans une gélose, pipettes jetables, film de protection perforé.

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.
- Retirer 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 en faisant congeler/décongeler la viande.
- Pour chaque échantillon, utilisez une nouvelle pipette propre.
- 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.

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 (CC₅₀). 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, Ute Salzbrenner,
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 2h. Notice d'utilisation 1013 (17/10/2025).

Premi®Test



RBP 31/02-04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
End of validity: see AFNOR website
<http://nf-validation.afnor.org/en>,
search PremiTest.

Microbial Screening test for the presumptive detection of antibiotic and sulfonamide residues in particularly fresh meat. NFVALIDATION certification scope includes beef, pork and poultry meat (with the exception of ground meat). The following selected antibiotics were investigated:
Penicillins: Penicillin G (CCB = 6 µg/kg); Amoxicillin (CCB = 11 µg/kg); Cloxacillin (CCB = 150 µg/kg)
Tetracyclines: Chlortetracycline (CCB = 160 µg/kg); Epichlortetracycline (CCB = 500 µg/kg); Oxytetracycline (CCB = 160 µg/kg); Epioxytetracycline (CCB = 500 µg/kg); Doxycycline (CCB = 100 µg/kg)
Sulfonamides: Sulfadimethoxine (CCB = 75 µg/kg); Sulfadiazine (CCB = 90 µg/kg)
Macrolides: Erythromycin A (CCB = 200 µg/kg); Tylosine A (CCB = 90 µg/kg)
The CCB values were determined by spiking in meat juice; the detection capabilities in other samples may differ.
Tetracyclines, Cephalosporins, Aminoglycosides, Amphenicols, Quinolones, Tiamulin, and Lincomycin are detected above the Maximum Residue Level (MRL).

20251017 - Insert 1013

Contents

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

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 standardized 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 color 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 color 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 times. 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.
- Remove the required number of ampoules without damaging the aluminum foil of the adjacent ampoules.
- Remove foil carefully from the required number of ampoules (do not open more ampoules than needed).
- Take approximately 2 cm³ of lean meat and use a meat press to extract approximately 250 µL of meat fluid. Alternatively, the meat juice can be obtained by freeze/thawing the meat.
- For each sample use a new and clean pipette.
- 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 ± 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 NFVALIDATION). 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 (CCB). 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 color, in particular that of a yellow/purple result, may differ from person to person. In cases where severe consequences are involved for the user, test results should be confirmed by a validated comprehensive analytical method. 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.

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

Premi®Test



RBP 31/02-04/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
Fin de validité: see AFNOR website
<http://nf-validation.afnor.org/en>,
search PremiTest.

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 (CCB = 6 µg / kg) ; Amoxicilline (CCB = 11 µg / kg) ; Cloxacilline (CCB = 150 µg / kg)
Tétracyclines : Chlortétracycline (CCB = 160 µg / kg) ; Epichlortétracycline (CCB = 500 µg / kg) ; Oxytétracycline (CCB = 160 µg / kg) ;
Epioxytétracycline (CCB = 500 µg / kg) ; Doxycycline (CCB = 100 µg / kg)

Sulfamides : Sulfadiméthoxine (CCB = 75 µg / kg) ; Sulfadiazine (CCB = 90 µg / kg)

Macrolides : Erythromycine A (CCB = 200 µg / kg) ; Tylosine A (CCB = 90 µg / kg)

Les valeurs de CCB ont été déterminées en réalisant des ajouts dosés dans du jus de viande. Les capacités de détection dans d'autres échantillons peuvent différer.

Les tétracyclines, les céfalosporines, les aminosides, les amphénols, les quinolones, la tiamuline et la lincomycine sont détectées au-dessus de la limite maximale de résidus (LMR).

20251017 - Insert 1013

Contenu du coffret

25 ampoules contenant des spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* enrobées dans une gélose, pipettes jetables, film de protection perforé.

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.
- Retirez 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 en faisant congeler/décongeler la viande.
- Pour chaque échantillon, utilisez une nouvelle pipette propre.
- 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.

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 présomptive 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 (CCB). 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), Ute Salzbrener,
Dr. Frank Apostel, Dr. Frank Vitzthum
Handelsregister/ Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt, HRB 8321
Sitz der Gesellschaft/ Corporate Seat: Pfungstadt
UStID-Nr. / VAT-No.: DE 111 657 409



Annexe 2i. Notice d'utilisation 1014 (21/05/2026).

Premi®Test



ISO 16343-2:2015
ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRI-FOODS
Certified by IFRC Certification
Not of validity: see IFRC's website
<https://ifrc-certification.org/en/our-services>
search Premi®Test

Microbial Screening test for the presumptive detection of antimicrobial residues in particularly fresh meat. NF VALIDATION certification scope includes beef, pork and poultry meat (after the evisceration of ground meat). The following selected antibiotics were investigated:
Penicillins: Penicillin G (CCB = 6 µg/kg), Amoxicillin (CCB = 11 µg/kg), Cloxacillin (CCB = 183 µg/kg)
Tetracyclines: Chlorotetracycline (CCB = 100 µg/kg), Tetracycline (CCB = 100 µg/kg), Doxycycline (CCB = 183 µg/kg), Erythromycin (CCB = 183 µg/kg)
Sulfonamides: Sulfadiazine (CCB = 75 µg/kg), Sulfamethoxazole (CCB = 90 µg/kg)
Macrolides: Erythromycin A (CCB = 100 µg/kg), Tylosine A (CCB = 90 µg/kg)
The CCB values were determined by spiking in meat (value, the detection capabilities in other samples may differ).
Tetracyclines, Cephalosporins, Aminoglycosides, Amphenicols, Quinolones, Fluoroquinolones, and Lincosamides are detected above the Maximum Residue Limit (MRL).
This validation study has been conducted according to the protocol NF ISO 16343-2:2015 for validation protocol for methods of detecting and quantifying traces of animal residues in food products (Ann. 12).

20200221 / Issue 03/IV

Conditions

25 ampoules with 100 µl of water (Premi®Test 100 µl) in a solid agar medium, **agarose plate**, performed over 6h.

Product description

Premi®Test is a broad spectrum microbial screening test especially developed for the detection of antimicrobial substances, such as antibiotics 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 *Escherichia coli* (ATCC 8739), a micro-organism very sensitive to many antibiotics and sulfonamide residues.
A standardized number of spores are inoculated in an agar medium with selected nutrients. When meat fluid is added to the Premi®Test and heated at 65 °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 color change from purple to yellow of the indicator in the ampoule. When antimicrobial residues are present in sufficient amount (above the detection limit) no growth will occur and the color will remain purple.

Caution

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

Instructions for use

- Wash hands thoroughly before starting the test procedure.
- Remove the required number of ampoules without damaging the aluminum foil of the adjacent ampoules.
- Remove foil carefully from the required number of ampoules (do not open more ampoules than needed).
- Take approximately 2 cm of meat (not a meat piece) and cut it into small pieces (approx. 2x2 cm) (alternatively, the meat juice can be obtained by pressing/tearing the meat).
- For each sample use a new and clean pipette.
- Pipette 100 µl of the fluid onto the agar in the ampoule. Do not disturb the agar.
- Allow to stand at room temperature for 20 minutes for a pre incubation.
- Push the meat juice evenly by gently filling and swirling the test ampoule twice with deiontized (dist.) water. Wash the ampoules with deiontized water only and do not use tap water!
- Remove the test water carefully from the test ampoule.
- Close the test ampoule with the foil applied to avoid evaporation.
- Incubate the test ampoule in a Premi®Test incubator or water bath (65 °C ± 1 °C).
- It is essential 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 PaperPoint document available on request for all users.

Reading test results

- Read the color only from the bottom 1/3 part of the ampoule.
- After color change from purple towards yellow indicates the absence of antibiotic / sulfonamides above the detection limit.
- No color change indicates the presence of antibiotic and/or sulfonamides and/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 1 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 (≥ 6 min) can lead to increased values of the detection capability (CCB). If there is no color change of the negative control after 4h, repeat the test. The negative control can be prepared by freezing and thawing 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 (provided) is available from R-Biopharm AG) to verify the correct application of the test.

Storage

The ampoules should be stored cool (5 - 10 °C). Attention: DO NOT FREEZE!

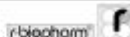
Limited Liability

Premi®Test is a screening test and as such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of color, in particular that of a yellow/purple result, may differ from person to person. In cases where severe consequences are involved for the user, test results should be confirmed by a validated comprehensive analytical method. R-Biopharm makes no warranty of any kind, whether expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality.

Recommendations for sample preparations of fish, shrimp, eggs, honey, beer, urine, blood and feed are available at R-Biopharm AG. These materials require individual validation by the customer. Supportive information are available at R-Biopharm upon request.

R-Biopharm AG
Postfach 101 / Postal Address: An
der Leber 101
63071 Darmstadt, Germany
800 / Corporate line: Pfungstadt
Tel: +49 (0) 61 81 - 81 22 13
Fax: +49 (0) 61 81 - 81 22 40
E-mail: info@rbiopharm.com
www.rbiopharm.com

Aufschlüsselung/Supermarket Road:
Dr. Ralf M. Oetzer (Vizepräsident/Chairman)
Vizepräsident/Chairman: Dr. Ralf M. Oetzer
Vizepräsident/Chairman: Dr. Ralf M. Oetzer
Dr. Frank Röhrl, Dr. Frank Röhrl
Hans-Joachim Oetzer, Ralf M. Oetzer
Anlage 101 Darmstadt, 63071
800 der Geschäftsführer Corporate line: Pfungstadt
100-101 / VLT 101 - 101 111 800 400



Mai 2026

Mai 2026

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

Premi®Test

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

2022/01/7 issue/0007



1. The Intended Use

Premi®Test is a Microbial inhibition test validated for the detection of residues of PENICILLIN in fresh bovine meat.

2. The Intended User

The test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with the antibiotic screening testing. All users of the Premi®Test should be trained by a Biopharm AG representative or by somebody who already successfully completed the training. To facilitate the use of the Premi®Test there is a French/English document available for all users.

3. Contents

- 20 ampoules containing an agar medium, pH indicator and spores of *Bacillus Stenothermophilus*
- 20 single use pipettes
- Premi®Test covering kit

4. Materials required but not included

- Premi®Test Starter Kit, containing the required equipment to do Premi®Test
- Biopharm AG heating block (Premi®Test incubator), meat press, pair of scissors, thermometer and timer.
- Instead of the Premi®Test incubator a water bath at 65 °C ± 1.0 °C can be used.
- Instead a water bath is used a rack or flask is required to accommodate the ampoules during incubation.
- Calibrated thermometer appropriate for designated use.
- Refrigerator at 0 - 10 °C (32 - 50 °F) for storage of the Premi®Test ampoules.
- Negative control muscle tissue (juice from a known antibiotic free sample, previously tested as negative).
- Premi®Scan, software to interpret the results of the Premi®Test, an HP (Gigaset 7620 or 8230 scanner), template, black cloth and Excel 2002 Color chart.

5. Test Performance

5.1 Detection sensitivity (false response) (Premi®Test)

32 ppb for Penicillin G

The Premi®Test has been validated to detect penicillin G residues in fresh bovine muscle tissue consistently with 99% confidence.

5.2 Selectivity

32 negative control meat samples were evaluated in an independent laboratory and 3 of these negative samples tested positive with the Premi®Test.

5.2.1 Cross reactivity

Premi®Test does cross react with the following drugs spiked at a concentration of 100 ppb

β-lactams: Amoxicillin, Ampicillin, Cephalixin, Cloxacillin

Tetracyclines: Chloramphenicol, Tetracycline

Macrolides: Erythromycin, Tylosin, Thiomycin

Glycopeptides: Vancomycin

Sulfonamides: Sulfadiazine, Sulfadimethoxine, Sulfathiazole

Misfoldamycin: Capreomycin

Premi®Test does cross react with the following drugs spiked at a concentration of 50 ppb

β-lactams: Amoxicillin, Ampicillin, Cephalixin

Macrolides: Erythromycin, Tylosin, Thiomycin

Misfoldamycin: Capreomycin

Premi®Test does cross react with the following drugs spiked at a concentration of 10 ppb

β-lactams: Amoxicillin, Ampicillin

Misfoldamycin: Capreomycin

6. Test principle

- Premi®Test is based on the inhibition of the growth of *Bacillus Stenothermophilus* var. *colliditellus*, a thermophilic microorganism which is very sensitive to many antibiotics and sulfonamide residues. A standardized number of spores is inoculated in an agar medium with selected nutrients and a pH indicator (from neutral purple).
- When muscle tissue fluid containing no antimicrobials or non-inhibitory substances is added to the Premi®Test and heated at 65 °C, the spores will grow, multiply and produce acid. This process is characterized by a visible change in the color of the pH indicator from purple to yellow in the ampoule.
- When muscle tissue fluid containing antimicrobial residues or inhibitory substances are present at or above the detection sensitivity, no growth will occur and there will be no acid production. As a result, there will be no change in the color of the pH indicator and the color of the ampoule will remain purple.

7. Cautions

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

8. Operating instructions Premi®Test

8.1 Before starting the test procedure

1. Premi®Test: take the number of ampoules needed from storage and let them warm up to room temperature (20 - 25 °C / 64 - 77 °F)

2. Premi®Test incubator: Allow the Premi®Test incubator or water bath to reach the required temperature of 65 °C ± 1.0 °C (147 °F).

3. Samples: Take approximately 4 grams of fresh, lean bovine muscle tissue and use a meat press to extract approximately 250 % of meat fluid. The juice can be obtained somewhat easier, when heating the meat press first (e.g. by placing it in an incubator of 55 °C (132 °F)).

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

4. Number of samples: The number of meat samples that can be tested in one series is 5. The Premi@Test incubator contains 10 holes. One hole should be reserved for the negative control.
5. Wash hands thoroughly before starting the test procedure.
- 5.2 Testing procedure**
 1. Remove the required number of ampoules. Do not tear off ampoules, as this may damage the foil of adjacent ampoules. Any test with torn foil must be used immediately or discarded.
 2. Mark the ampoules with a meat sample identification code.
 3. Remove foil carefully from the required amount of ampoules (do not open more ampoules than needed after opening, the test can not be stored any longer).
 4. Pick up a disposable pipette tip without touching the ends and place it on the syringe.
 5. For each sample use a new and clean pipette.
 6. Pipette 100 µl of 1% of each muscle tissue juice sample to be tested into the labeled ampoules. Depress the plunger of the pipette, dip the pipette tip into muscle tissue juice and let the plunger return slowly to its original position. Transfer the meat juice onto the agar of the labeled ampoules by depressing the plunger slowly and completely. Do not disturb the agar.
 7. Pre-incubate the test 20 minutes at room temperature (18 - 25 °C / 64 - 77 °F).
 8. Remove the muscle tissue juice by gently emptying the test, by putting the ampoule(s) upside down.
 9. Wash the test base lines, by gently filling and emptying the test ampoules with deionized (distilled) water.
 10. Remove the test bases of water as fully from the test ampoules, by putting the ampoules upside down on a tissue.
 11. Close the test ampoules with the foil supplied with the kit to avoid evaporation during incubation.
 12. Incubate the test ampoules in the Premi@Test incubator at water bath (55 °C / 131 °F), until the negative control changes color from purple to yellow (See Section 5.3).
 13. When the negative control has changed color (after approximately 5 hours), the ampoules can be read with the Premi@Scan.
- 5.3 Guidelines to Determine the Readout of Samples from the Incubator**
 1. Interpreting results for screening to meat color changed. **NOTE:** The VALIDATION WAS NOT INTENDED TO COVER THE USE OF THE PREM@TEST as a guideline for triggering the point at which the test samples should be removed from the incubator to be read by the Premi@Scan. **DISCLAIMER FOR TRANSMISSION OF THE POINT AT WHICH THE TEST SAMPLES SHOULD BE REMOVED FROM THE INCUBATOR TO BE READ BY THE PREMI@SCAN.**
 2. Read the color only from the bottom 20 mm of the ampoules.
 3. A partly or completely yellow color of the agar medium indicates the absence of antibiotic residues in the corresponding meat sample as it shows the weak indicated above. Such a result should be regarded as a negative result (important as not found).
 4. When the color changes to "doublet", incubate 5 minutes longer and read again. When the result is still not clear, test the sample again.
- 5. Operating Instructions Premi@Scan**
 1. Place the Premi@Scan in the CD drive; the program will start up automatically.
 2. Accept the license agreement by clicking on OK and the program will be ready to use.
 3. Place the Serial DSC Color chart, delivered with the Premi@Scan, on the scanner (50 Samples 7400 or 8200).
 4. Calibrate the Premi@Scan with the Serial DSC Color chart, by following the instructions of the software.
 5. Put the ampoules to be tested in the templates, delivered with the Premi@Scan.
 6. Place the black cloth over the templates.
 7. The Premi@Scan recognizes the position of the ampoules automatically and determines the result of the ampoules.
 8. Results can be printed.
- 5B Storage and Precautions**
 1. The Premi@Test ampoules should be stored in a dry and cool place (preferable below 5 °C / 41 °F). Attention: DO NOT FREEZE ampoules should not be used after the expiration date, indicated on the label.
 2. Anything that may come in contact with the meat (hands, pipette tips, etc.) must be cleaned thoroughly, rinsed with tap water and dried with a clean (paper) towel to avoid contamination with inhibiting substances like antibiotics, other drugs, cleaning agents or disinfectants.
 3. Store the meat below 5 °C (41 °F). If it is not possible to carry out the test immediately, it is not possible to test the meat within 48 hours, the sample should be stored at or below -18 °C.
- 16 Technical Assistance**

For assistance in use, interpretation, or troubleshooting contact the results of this test contact sales@r-biopharm.de. To facilitate the use of Premi@Test there is a Premi@Point document available for all users.
- 18 Limited Liability**

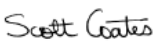
Premi@Test is a screening test and as such 100% accuracy of the test results cannot be guaranteed. Besides, the assessment of color, in particular that of a yellow/brown result, may differ from person to person. In cases where severe consequences are involved for the user, test results should be confirmed by a validated comprehensive analytical method (like HPLC or GC-MS/MS). 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 damages, or expenses arising directly or indirectly from the use of this product. The above text has received AGAC approval for this test kit use in North America.

R-Biopharm AG
Postfach 18 (Postal Address: An
der Leber 18) 717
65021 Darmstadt, Germany
RBL Corporate Inc. (Pfungstadt)
Tel.: +49 (0) 61 81 81 81 82 40
Fax: +49 (0) 61 81 81 82 40
E-mail: sales@r-biopharm.de
www.r-biopharm.de

Aufschlüsselungspersonen: Name:
Dr. Ralf M. Greiner (Vorsitzender/Chairman)
Vorsitzender/Chairman: Christian Greiner
(Vorsitzender/Chairman), Ute Kalkbrenner
Dr. Frank Puschke, Dr. Frank Völckner
Handelsregister/Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt, HRB 1621
RBL der Greiner AG Corporate Inc. (Pfungstadt)
LBR 12345 / URT 567 89 111 887 432



Annexe 3a. 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 LICENSEE 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 SM License Number, 060601 this method is distributed by: NONE	Under this AOAC® Performance Tested SM 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 TestedSM 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 .

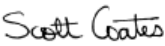
Table 9: Scanner results to confirm the Premi®Test's detection sensitivity as 10 ppb for penicillin G (1)

Zero control			
Sample		Sample	
	Interpreted Scanner Results		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, Angelique., Validation Study Report Premi®Test, AOAC® Performance TestedSM certification number 060601.

Annexe 3b. Certificats No. 060601 de Décembre 2022 à Décembre 2025.

	
CERTIFICATION	
AOAC Research Institute <i>Performance Tested MethodsSM</i>	
Certificate No. 060601	
The AOAC Research Institute hereby certifies 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 Research Institute <i>Performance Tested MethodsSM</i> Program and found to perform as stated in the applicability of the method. This certificate indicates an AOAC Research Institute Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Research Institute <i>Performance Tested MethodsSM</i> certification mark on the above-mentioned method for the period below. Renewal may be granted by the Expiration Date under the rules stated in the licensing agreement.	
 _____ Scott Coates, Senior Director Signature for AOAC Research Institute	Issue Date December 19, 2022 Expiration Date December 31, 2023
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	



CERTIFICATION

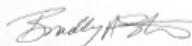
AOAC Research Institute
Performance Tested MethodsSM

Certificate No.
060601

The AOAC Research Institute hereby certifies 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 Research Institute *Performance Tested MethodsSM* Program and found to perform as stated in the applicability of the method. This certificate indicates an AOAC Research Institute Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Research Institute *Performance Tested MethodsSM* certification mark on the above-mentioned method for the period below. Renewal may be granted by the Expiration Date under the rules stated in the licensing agreement.


Bradley A. Stawick, Senior Director
Signature for AOAC Research Institute

Issue Date	January 17, 2024
Expiration Date	December 31, 2024

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>

		
CERTIFICATION		
AOAC Research Institute <i>Performance Tested MethodsSM</i>		
Certificate No. 060601		
The AOAC Research Institute hereby certifies the method known as:		
Premi®Test manufactured for R-Biopharm AG An der neuen Bergstr. 17 64297 Darmstadt, Germany		
This method has been evaluated and certified according to the policies and procedures of the AOAC <i>Performance Tested MethodsSM</i> Program. This certificate indicates an AOAC Research Institute Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Research Institute <i>Performance Tested MethodsSM</i> certification mark on the above-mentioned method for the period below. Renewal may be granted by the Expiration Date under the rules stated in the licensing agreement.		
 Bradley A. Stawick, Senior Director Signature for AOAC Research Institute	Issue Date Expiration Date	December 13, 2024 December 31, 2025
2275 Research Blvd., Ste. 300, Rockville, Maryland, USA Telephone: +1-301-924-7077 www.aoac.org		

Annexe 3c. Certificat No. 060601 de Janvier 2026 (validité 31/12/2026).

	
CERTIFICATION	
AOAC Research Institute <i>Performance Tested MethodsSM</i>	
Certificate No. 060601	
The AOAC Research Institute hereby certifies the method known as PremiTest manufactured by R-Biopharm AG an der neuen Bergstraße 64297 Darmstadt Germany	
This method has been evaluated and certified according to the policies and procedures of the AOAC <i>Performance Tested MethodsSM</i> Program. This certificate indicates an AOAC Research Institute Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Research Institute <i>Performance Tested MethodsSM</i> certification mark on the above-mentioned method for the period below. Renewal may be granted by the Expiration Date under the rules stated in the licensing agreement.	
 _____ Bradley A. Stawick, AOAC Research Institute Senior Director	Issue Date January 14, 2026 Expiration Date December 31, 2026
2275 Research Blvd., Ste. 300, Rockville, Maryland, USA Telephone: +1-301-924-7077 www.aoc.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

AUTHORS Angelique de Rijk	MANUFACTURED FOR 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	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 through December 2026.
METHOD MODIFICATION RECORD 1. November 2019 Level 1 2. December 2022 Level 1 3. January 2024 Level 1 4. December 2024 Level 1	SUMMARY OF MODIFICATION 1. Editorial changes. 2. Editorial changes. 3. Editorial changes. 4. Editorial changes.
Under this AOAC <i>Performance Tested Methods</i> SM License Number, 060601 this method is distributed by: NONE	Under this AOAC <i>Performance Tested Methods</i> SM 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 MethodsSM 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		Sample	
	Interpreted Scanner Results		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, Angelique., Validation Study Report Premi®Test, AOAC Performance Tested MethodsSM certification number 060601.

Annexe 4. Tableau de synthèse des réclamations de 2022 au 09/03/2026.

Type de réclamation	Catégorie	Date de création	Évaluation de la réclamation	Mots-clés
Logistique	Clôturée	22/09/2025	Justifié	Erreur de livraison
Réclamation commerciale	Clôturée	23/01/2025	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Échec de livraison
	Clôturée	25/11/2022	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Livraison en double
	En cours de traitement	04/05/2022	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Erreur de livraison
	Clôturée	17/11/2023	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Livraison retardée
	Clôturée	24/07/2023	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Etiquetage manquant
	Clôturée	18/10/2024	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Réactif manquant
Réclamation concernant les réactifs	Clôturée	20/03/2024	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Réactif endommagé
	Clôturée	26/01/2024	Non justifié	Résultat, faux-positif
	Clôturée	05/12/2023	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Numéro de lot et date de péremption absents de l'étiquette
	Clôturée	16/11/2023	Non justifié	Réactif endommagé
	Clôturée	19/10/2023	Non justifié	Tube pas assez rempli
	Clôturée	03/10/2023	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Tube pas assez rempli
	Clôturée	07/09/2023	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Fuite de réactif
	Clôturée	19/05/2022	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Tube pas assez rempli
	Clôturée	21/01/2022	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Tube pas assez rempli
	Clôturée	21/05/2025	Non confirmé	Résultat
	Clôturée	28/10/2024	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Film d'étanchéité endommagé
	Clôturée	02/04/2024	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Tube pas assez rempli
	Clôturée	07/02/2024	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Tube pas assez rempli
	Clôturée	17/07/2023	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Réactif endommagé
	Clôturée	12/06/2023	Non justifié	Faux-négatif
	Clôturée	14/04/2023	Non justifié	Faux-négatifs / faux-positifs
Réclamation concernant les réactifs	Clôturée	27/02/2023	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Fuite de réactif
	Clôturée	26/08/2022	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Colis endommagé
	Clôturée	08/08/2022	Non justifié	Faux-positifs
	Clôturée	20/06/2022	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Etiquetage
	Clôturée	31/05/2022	Justifié ; sans incidence sur l'écart	Réactif manquant

Limite de quantification (LOQ) ; limite maximale de résidus (LMR).

Annexe 5a. Limites de détection du Premi®Test annoncées par le fabricant (Mars 2022).

● 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		
Sulphadime-thoxine		25 - 50	<100		50
Sulphapyridine	<50	50	<100		
Sulphamethoxy-pyridine	<100	25			
Sulphisoxazole	<100	25			
Sulphathiazole	<100	25			
Sulphachloropyri-dazine	<100	25			
Sulphamerazine	<100	25	<100		
Sulphanilamide	<100	150			
Sulphaquinoxaline	<100	50	<50		
Sulphamethiazole	<100		<50		
Sulfamethoxazole				25	
Aminoglycosides					
Gentamicin	100	100	100	100	
Streptomycin	1500	1500	3000	1000	
Neomycine	300	300	300	300	200
Dihydrostrepto-mycin					
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				

All detection limits are given in µg/kg = ppb

Annexe 5b. Matériel commercial et limites de détection du Premi®Test annoncées par le fabricant (Juin 2026).

Cette annexe remplace l'annexe 5a. Le protocole n'a pas été modifié ni le tableau final des capacités de détection. La date de validité du logo NF Validation a été mise à jour, ainsi que la LOD de la lincomycine (cf. chapitre 5.).



Antibiotic residue screening

Premi®Test – microbial inhibition test for the screening of food



For food of animal origin



Simple to perform



Results in less than 4 hours



PERFORMANCE TESTED
Bovine muscle tissue was certified by the AOAC Research Institute.



RBP 31/02 - 4/11
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
End of validity: see AFNOR website
<http://nf-validation.afnor.org/en>
search for PremiTest

06/2026

Premi®Test – screening of antibiotic residues in animal origin food

In livestock breeding, antibiotics are used for the treatment of bacterial infections and diseases. Additionally, antibiotics can illegally be used as antimicrobial growth promoters (AGP). As a consequence, antibiotic residues can remain in food of animal origin and bear a health risk for the consumers.

The Premi®Test antibiotic residue screening test detects a broad spectrum of the most veterinary used antibiotics in animal husbandry. The easy-to-implement and easy-to-use test enables on-site screening by farmers, slaughterhouses, meat-processors, fisheries etc. In contrast to conventional plate tests, reliable results are available in less than four hours.

Premi®Test is suitable especially for the analysis of fresh meat.

Recommendations for sample-preparations of fish, shrimps, eggs, kidney, liver, urine, blood and feed are available. These matrices require individual validation by the customer.

Supportive information are available at R-Biopharm upon request.

Test kits and equipment



Premi®Test (Art. No. R3900): 100 test ampoules
or
Premi®Test (Art. No. R3925): 25 test ampoules



Premi®Test Starter Kit (Art. No. ZPT-2000)
Contains meatpress, incubator, timer, scissors
and briefcase



How to use Premi®Test – detection of antibiotic residues in meat



1 Remove the required amount of ampoules from the frame. Be careful not to damage the foil of the remaining ampoules. Use one additional ampoule for the negative control, which is a sample containing no antibiotics.



6 Incubate ampoules for 20 minutes at room temperature.

Switch on the Premi®Test Incubator for temperature stabilization at 64 °C.



2 Cut the meat into pieces of approx. 2 cm² and put one piece into the meatpress. Increase pressure slowly and hold constant until approx. 200 µL of meat juice is obtained.



7 Wash the ampoules twice with demineralized water. Remove excessive water by turning the ampoules upside down on a piece of soaking paper, but do not tap the ampoules.



3 Open the ampoules with one corner of the green frame and label the ampoules.



8 Close the ampoules with the supplied perforated foil.



4 Dip the pipette into the liquid and decrease the pressure on the bubble to allow the stem to fill with the meat juice.

Add the meat juice to the pipette by squeezing the smaller upper bulb.



9 Put the ampoules into the incubator at 64 °C.



5 By fully squeezing the top bulb, approximately 100 µL of the meat juice will be released.
(Note: A small excess of liquid may remain in the lower bulb.)



10 Read the results of the samples, when the negative control shows a clear colour change into yellow (approx. after 3 h).

Determination of results

Compare the colour of the sample ampoules to the colour of the negative control ampoule. If the sample ampoule remain purple or if the colour deviate from the colour of the negative control ampoule, the sample potentially contains antibiotic residues and the results have to be verified by the official reference method.



Premi®Test products

Premi®Test detection limits in different animal food products

Substances	Chicken	Pork	Beef	Substances	Chicken	Pork	Beef
β-lactams				Aminoglycosides			
Amoxicillin	5	5	5	Gentamicin	100	100	100
Ampicillin	5	5	5	Streptomycin	1500	1500	3000
Penicillin-G	2.5	2.5	10*	Neomycine	300	300	300
Cloxacillin		>100		Spectinomycine			5000
Oxacillin		100		Chinolones			
Dicloxacillin				Oxolin acid			
Cephalosporins				Enrofloxacin	>600	>600	>600
Cefquinome	75	100	100	Flumequine	>100	>100	>100
Ceftiofur	100	200	100	Polypeptides			
Macrolides				Virginiamycin	500	500	500
Tylosin	90	90	90	Bacitracin	500	500	500
Erythromycin	200	200	200	Zn-bacitracin	1250		
Lincomycin	>100	>100	>100	Colistin	>1000		
Tilmicosin	50	50	50	Ionophores			
Spiramycin	1000	1000	1000	Salinomycin	1000		
Tetracyclins				Monensin	1250		
Chlortetracycline	160	160	160	Lasalocid	10000		
Oxytetracycline	160	160	160	Oligosaccharides			
Doxycycline	100	100	100	Avilamycin	>5000		
Tetracycline		50		Others			
Demeclocycline		50		Florfenicol	100	100	100
Sulfonamides				Chloramphenicol	2500	2500	2500
Sulfamethazine	75	50-100	100	Trimethoprim	50		
Sulfadiazine	90	90	90	Narasin	1250		
Sulfamethizole		50-100		Amprolium	>2000		
Sulfguanidine	<200	150	<200	Phosphomycine	>1500		
Sulfadimethoxine		25 - 50	<100	Ronidazole			
Sulfapyridine	<50	50	<100	Furazolidone	>1500		
Sulfamethoxypyridine	<100	25					
Sulfisoxazole	<100	25					
Sulfathiazole	<100	25					
Sulfachloropyridazine	<100	25					
Sulfamerazine	<100	25	<100				
Sulfanilamide	<100	150					
Sulfaquinoxaline	<100	50	<50				
Sulfametiozole	<100		<50				
Sulfamethoxazole							

All detection limits are given in µg/kg = ppb.

* = Certified by the AOAC PTM Program.