



## PRINCIPE DE LA METHODE

Le test  $\beta$  s.t.a.r. est une méthode du type "Receptor Assay" basée sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or.

Lors de la première étape d'incubation, les antibiotiques  $\beta$ -Lactames présents se lient au récepteur. Pendant la seconde étape d'incubation, le lait migre sur un support immunochromatographique qui comporte deux bandes de capture. La première bande retient tous les récepteurs qui n'ont pas lié d'antibiotiques pendant la première étape, faisant apparaître une coloration rouge intense qui traduit une absence de résidus. En cas de présence de  $\beta$  lactames en excès, les complexes récepteurs-antibiotiques formés ne peuvent pas se lier et aucune coloration n'apparaît. La deuxième bande, basée sur la fixation d'un anticorps, sert de référence.

## NOTE

La deuxième demande de reconduction du droit d'usage de la marque AFNOR Validation faisant l'objet de la présente attestation, tout comme la première, n'ont pas donné lieu à des essais complémentaires. La méthode  $\beta$  s.t.a.r. et la méthode de référence n'ayant pas été modifiées depuis la précédente validation, la reconduction a consisté, pour la seconde fois, en une réinterprétation des résultats de l'étude de validation initiale réalisée en 1999/2000, selon le protocole de validation élaboré par le bureau technique microbiologie en 2004/2005 et intitulé « Exigences pour les méthodes de recherche de résidus d'antibiotiques et molécules à effet apparenté ». Certaines parties de ce protocole sont inspirées de la norme NF EN ISO 16140 qui ne peut pas s'appliquer dans son intégralité à la validation de méthodes de recherche d'antibiotiques.

Il convient de préciser que la méthode alternative  $\beta$  s.t.a.r. et la méthode officielle prise en référence sont basées sur des principes très différents : la méthode  $\beta$  s.t.a.r. ne détecte que la famille des bêta-lactamines alors que la méthode de référence détecte l'ensemble des résidus d'antibiotiques. Ces deux méthodes ne peuvent donc pas être équivalentes, ce qui explique les données obtenues au chapitre justesse.

La validation a porté sur les protocoles suivants : FRJLT 12-2008-AAC-2013

## PRATICABILITE

- Les résultats (positifs ou négatifs) sont obtenus en 6 minutes avec le test  $\beta$  s.t.a.r., contre 2h30 avec la première partie (acidification) de la méthode de référence.

## SPECIFICITE (étude 1999)

- L'analyse de 5 exemplaires de 4 échantillons de lait cru supplémentés avec des antibiotiques n'appartenant pas à la famille des  $\beta$  lactamines (oxytétracycline, dihydrostreptomycine, erythromycine, chloramphenicol), à des concentrations très élevées (50 000  $\mu$ g/l) n' a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.
- 20 échantillons de matrice blanche (dépourvue de résidus d'antibiotiques ou autres substances à activité antibactérienne) ont été analysés en double par chacune des deux méthodes.

En fonction des deux versions de la méthode alternative et des deux types de lait (cru ou reconstitué), les résultats sont les suivants :

	$\beta$ s.t.a.r. 25 lait cru	$\beta$ s.t.a.r. 100 lait cru	$\beta$ s.t.a.r. 100 lait reconstitué
Spécificité	100%	100%	100%
Taux de faux positifs	0%	0%	0%

## LIMITE DE DETECTION (étude 1999)

- Des essais ont été effectués sur du lait cru supplémenté artificiellement avec les antibiotiques de la famille des  $\beta$  lactamines aux 5 niveaux de concentration figurant dans le tableau ci-après. Chaque échantillon a été analysé une fois par la méthode alternative et une fois par la méthode de référence.

La limite de détection figure dans la dernière colonne du tableau (en  $\mu\text{g/l}$ )

Antibiotiques (LMR)	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5	Limite de détection*
Pénicilline (4)	0	2	4	8	16	<2
Ampicilline (4)	0	2	4	8	16	4
Cloxacilline (30)	0	5	20	80	320	$\leq 5$
Céphapirine (10)	0	5	10	20	40	$\leq 5$
Ceftiofur (100)	0	50	100	200	400	$\leq 50$
Cefquinome (20)	0	10	20	40	80	$\leq 10$
Céphalonium (20)	0	5	10	20	40	<5

LMR : Limite Maximale en Résidus

### Remarques :

- Concernant le Céphalonium, le site de l'EMEA donne une LMR provisoire (annexe III) jusqu'en janvier 2003. La LMR définitive n'a apparemment pas encore été fixée.
- Pour les 4 substances dont la limite de détection est assortie du signe  $\leq$ , l'examen des résultats de la concentration indiquée (majorité de  $\pm$ ) laisse à penser que cette valeur correspond bien à la limite de détection. Pour conforter ce point, l'analyse d'un niveau de concentration deux fois plus faible aurait été nécessaire.

## ETUDE COMPARATIVE

### Comparaison des performances de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 1999 sur 39 échantillons de lait cru, analysés 5 fois par les méthodes prises en référence et les deux versions de la méthode alternative.

Les résultats sont les suivants :

	PA	NA	ND	PD	N	AC (%)	N+	SE (%)	N-	SP (%)
Beta-Star 25 lait cru	31	39	19 <sup>(2)</sup>	106 <sup>(1)</sup>	195	35.9 $\pm$ 6.9	50	62 $\pm$ 13.7	145	26.9 $\pm$ 7.3
Beta-Star 100 lait cru	31	37	19 <sup>(2)</sup>	108 <sup>(1)</sup>	195	34.9 $\pm$ 6.8	50	62 $\pm$ 13.7	145	25.5 $\pm$ 7.2
Beta-Star 100 lait reconstitué	31	37	19 <sup>(2)</sup>	108 <sup>(1)</sup>	195	34.9 $\pm$ 6.8	50	62 $\pm$ 13.7	145	25.5 $\pm$ 7.2

Les paramètres suivants sont définis dans la norme EN ISO 16140 :

PA = accord positif                      N = nombre total de répétitions                      AC = exactitude relative

NA = accord négatif                      N+ = nombre de répétitions (échantillons positifs)                      SE = sensibilité relative

ND = déviation négative                      N- = nombre de répétitions (échantillons négatifs)                      SP = spécificité relative

PD = déviation positive

(1) Le nombre de positifs supplémentaires s'explique par le fait que le  $\beta$  s.t.a.r. présente une meilleure sensibilité aux  $\beta$  - lactamines

(2) Il s'agit d'échantillons qui contenaient des antibiotiques autres que des  $\beta$  - lactamines ou dont la concentration en ampicilline était inférieure à la LMR (4  $\mu\text{g/L}$ )

**Conclusion :**

Les deux méthodes sont différentes pour un risque de  $\alpha = 5\%$  (test de Mc Nemar), pour les deux formats du  $\beta$  s.t.a.r et les 2 types de lait testés.

La déviation négative traduit une **spécificité du test  $\beta$  s.t.a.r pour les  $\beta$  lactamines**, ce qui n'est pas le cas pour la méthode de référence.

La déviation positive observée traduit une **meilleure sensibilité du test  $\beta$  s.t.a.r. aux  $\beta$  lactamines**. D'où une faible exactitude relative, une faible spécificité relative et une faible sensibilité relative.

**FIDELITE (étude 2000)**

Les valeurs de fidélité ont été déterminées au cours d'un essai effectué en 2000, comprenant 12 laboratoires.

Chaque laboratoire a reçu 28 échantillons de lait cru, répartis de la manière suivante : 24 échantillons positifs en antibiotiques représentant 12 niveaux en double aveugles et 4 échantillons représentant le lot témoin sans antibiotique.

Les laboratoires ont analysé deux fois chaque échantillon.

Trois laboratoires ont utilisé le  $\beta$  s.t.a.r. version 100 et les neuf autres laboratoires ont utilisé le  $\beta$  s.t.a.r. version 25.

Les résultats par niveau de contamination sont les suivants :

Niveaux	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs	Nombre de résultats inexploités
Cloxacilline sodique 2,5 $\mu$ g/l	2	2	44	4	0
Cloxacilline sodique 5 $\mu$ g/l	2	2	13	35	0
Cloxacilline sodique 20 $\mu$ g/l	2	2	0	48	0
Cloxacilline sodique 80 $\mu$ g/l	2	2	0	48	0
Ceftiofur sodique 25 $\mu$ g/l	2	2	46	2	0
Ceftiofur sodique 50 $\mu$ g/l	2	2	26	22	0
Ceftiofur sodique 100 $\mu$ g/l	2	2	0	48	0
Ceftiofur sodique 200 $\mu$ g/l	2	2	0	48	0
Oxytétracycline 50 000 $\mu$ g/l	2	2	48	0	0
Dihydrostreptomycine 50 000 $\mu$ g/l	2	2	48	0	0
Erythromycine 50 000 $\mu$ g/l	2	2	48	0	0
Chloramphénicol 50 000 $\mu$ g/l	2	2	48	0	0
Echantillons sans résidus 0 $\mu$ g/l	4	4	96	0	0

**Conclusion**

Le pourcentage de concordance globale avec les résultats attendus est de 89%.

**La méthode est fidèle.**

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

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire sur le site [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)