



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

ATTESTATION DE VALIDATION* DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE

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

N° attestation : RBP 31/02 – 04/11

Date de validation : 24.11.2011
Fin de validité : 30.08.2014

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

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

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

PREMI® TEST

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

Référence du protocole : Notice 1011

DOMAINE D'APPLICATION

Viande porcine, bovine et volaille (hors viande hachée).

RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

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

**Directrice Générale
Florence MÉAUX**



PRINCIPE DE LA METHODE

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

Le Premi®Test est appliqué sur du jus de viande déposé dans des tubes contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de *Bacillus stearothermophilus*. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus, le tube est incubé pendant 3 heures à 64°C, puis la couleur est vérifiée.

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

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

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

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

PRATICABILITE

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

LIMITE DE DETECTION

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

Les limites de détection figurent dans le tableau suivant :

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

LMR : Limite Maximale en Résidus

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

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

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

TAUX DE FAUX-POSITIFS ET DE FAUX-NEGATIFS :

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

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

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

ETUDE COMPARATIVE

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

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

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

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

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

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

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

ETUDE INTERLABORATOIRE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

| | | | |
|------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| Porc/Oxytétracycline : | 200 – 400 µg/kg | Boeuf/Sulfadimérazine : | 200 – 400 µg/kg |
| Porc/Ceftiofur : | 400 – 600 µg/kg | Poulet/Tylosine : | 50 – 100 µg/kg |

Conclusion générale

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

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

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

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org