



## Circulaire relative aux tests rapides et aux tests inhibiteurs microbiologiques à utiliser pour la détection des substances inhibitrices dans le lait cru dans le cadre de l'autocontrôle

Référence	PCCB/S3/96718	Date	07/06/2021
Version actuelle	2.65	Applicable à partir de	Date de publication
Mots clefs	Lait cru, substances inhibitrices, test rapide, test inhibiteur microbiologique		

Rédigé par	Approuvé par
Wits Julie, attaché	Jean-François Heymans, directeur général <del>a.i.</del>

### 1. But

Cette circulaire a pour objectif d'informer les opérateurs sur les tests qui peuvent être utilisés dans le cadre de l'autocontrôle pour détecter les substances inhibitrices dans le lait cru.

### 2. Champ d'application

Contrôle d'entrée de la présence de substances inhibitrices dans le lait cru par les acheteurs dans le cadre de leur autocontrôle.

Cette circulaire ne concerne pas les analyses dans le cadre des contrôles officiels décrites dans la circulaire PCCB/S3/JWS/1352818 relative au contrôle de la qualité du lait cru.

### 3. Références

#### 3.1. Législation

Règlement (CE) No 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29/04/2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale

Règlement (CE) No 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le Règlement (CE) No 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux)

Arrêté royal du 14 novembre 2003 relatif à l'autocontrôle, à la notification obligatoire et à la traçabilité dans la chaîne alimentaire

Arrêté ministériel du 22 janvier 2004 relatif aux modalités de notification obligatoire dans la chaîne alimentaire

### 3.2. Autres

Guide d'autocontrôle de l'industrie laitière.

Guide système d'autocontrôle pour la production et la vente de produits laitiers à la ferme.

Guide autocontrôle pour le secteur de l'industrie du biscuit, du chocolat, de la praline, de la confiserie et des céréales petit-déjeuner.

Guide d'autocontrôle pour les boulangeries et pâtisseries.

Circulaire relative à l'approvisionnement direct par un producteur primaire du consommateur final ou du commerce de détail local en petites quantités de certaines denrées alimentaires d'origine animale.

Circulaire relative au contrôle de la qualité du lait cru.

## 4. Définitions et abréviations

Substances inhibitrices : substances inhibant la croissance des bactéries.

Lait cru : le lait produit par la sécrétion de la glande mammaire d'un ou plusieurs animaux producteurs de lait et non chauffé à plus de 40 °C, ni soumis à un traitement d'effet équivalent.

Acheteur : une entreprise du secteur alimentaire disposant de l'autorisation LAP ACT 98 Acheteur de lait cru de vache (PL2AC4PR87) et/ou LAP ACT 99 Acheteur de lait cru autre que lait de vache (PL2AC4PR86).

## 5. Recherche de substances inhibitrices

Si l'opérateur teste le lait cru pour le contrôle de la présence de substances inhibitrices à la réception dans le cadre de son autocontrôle, ce contrôle doit être effectué à l'aide d'un test rapide reconnu.~~Le lait cru doit faire l'objet d'une prise d'échantillon pour le contrôle de la présence de substances inhibitrices (contrôle d'entrée) dans ce lait.~~

Une liste des tests rapides pouvant être utilisés à cette fin ainsi que leurs capacités de détection et les conditions pour la reconnaissance d'un test sont reprises en annexes 1, 2 et 3. Les modalités d'utilisation de chaque test (température et temps d'incubation, cut-off reader,...) sont mentionnées dans la liste.

Dans le cas où, lors du contrôle du lait à l'aide d'un test rapide, un résultat non conforme est obtenu, le lait en question peut être analysé au moyen d'un test inhibiteur microbiologique avant de décider de son acceptation ou non pour transformation en produits laitiers pour consommation humaine. Cette analyse complémentaire n'est pas obligatoire mais permet de corriger la trop grande sensibilité du test rapide.

En cas de résultat non conforme au test rapide, la réalisation d'un autre test rapide sur le même lait est interdite ; seul le même test rapide peut être répété en double pour confirmation. Si un de ces tests de confirmation est à nouveau non conforme, un test inhibiteur microbiologique peut être effectué pour confirmer ou infirmer le résultat non conforme du test rapide. C'est alors sur base du résultat de ce test inhibiteur microbiologique qu'il est décidé si le lait est propre ou non à la consommation humaine. ~~Si un test inhibiteur microbiologique n'est pas effectué, seul le résultat non conforme au test rapide est pris en compte et il conduit à considérer que le lait est impropre à la consommation humaine.~~

Une liste des tests inhibiteurs microbiologiques pouvant être mis en œuvre à cette fin ainsi que les conditions pour la reconnaissance d'un test sont reprises en annexes 4 et 5. Les modalités d'utilisation de chaque test sont mentionnées dans la liste.

Si le test rapide révèle la présence de substances inhibitrices et ~~que vous ne faites pas d'aucune~~ analyse complémentaire (test inhibiteur microbiologique) n'est faite, ~~vous ne pouvez pas transformer~~ ce lait ne peut être transformé en produits destinés à la consommation humaine. Il en va de même si ~~vous faites~~ une analyse complémentaire (test inhibiteur microbiologique) est faite et que le résultat de celle-ci est non conforme.

Le lait dans lequel ont été retrouvées des substances inhibitrices ne peut pas non plus être utilisé pour l'alimentation animale. Conformément au Règlement (CE) No 1069/2009, ce lait est considéré comme un sous-produit de catégorie 2 et doit être collecté et éliminé selon les conditions de ce règlement.

Si un test rapide révèle la présence de substances inhibitrices et qu'~~aucune vous ne faites pas une~~ analyse complémentaire (test inhibiteur microbiologique) n'est faite, ce résultat doit être notifié à l'AFSCA conformément à l'AR du 14/11/2003 et à l'AM du 22/01/2004. Si ~~vous faites~~ une analyse complémentaire (test inhibiteur microbiologique) est faite et que celle-ci se révèle conforme, le résultat non conforme au test rapide ne doit pas être notifié. Si ~~vous faites~~ une analyse complémentaire (test inhibiteur microbiologique) est faite et que celle-ci se révèle non conforme, ce résultat non conforme doit être notifié à l'AFSCA conformément à l'AR du 14/11/2003 et à l'AM du 22/01/2004.

Pour plus d'informations au sujet des analyses sur le lait cru, voir aussi les circulaires reprises au point 3.2..

## 6. Annexes

Annexe 1 - Liste des tests rapides reconnus par l'AFSCA pour le screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru et leurs modalités d'utilisation.

Annexe 2 - Tableau des capacités de détection des différents tests rapides reconnus par l'AFSCA pour les antibiotiques  $\beta$ -lactame dans du lait cru de vache.

Annexe 3 - Conditions pour la reconnaissance d'un test rapide pour le screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru.

Annexe 4 – Liste des tests inhibiteurs microbiologiques reconnus par l'AFSCA pour la confirmation d'un résultat non conforme à un test rapide lors du screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru et leurs modalités d'utilisation.

Annexe 5 – Conditions pour la reconnaissance d'un test inhibiteur microbiologique pour la confirmation d'un résultat non conforme à un test rapide lors du screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru.

## 7. Aperçu des révisions

Aperçu des révisions de la circulaire		
Version	Applicable à partir de	Raisons et ampleur de la révision
1	31/05/2005	- Non applicable
2	07/04/2014	- Adaptation du format de la circulaire du 31/05/2005 - Référence à la liste de tests rapides reconnus par l'AFSCA pour le screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru par les acheteurs
2.1	22/12/14	- Référence à la liste des tests inhibiteurs microbiologiques reconnus par l'AFSCA pour la confirmation d'un résultat non conforme à un test rapide pour le screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru
2.2	12/05/2016	- Ajouts de tests rapides à l'annexe 1
2.3	03/02/2017	- Ajouts de tests rapides à l'annexe 1 - Suppression de l'information relative à l'autocontrôle disponible dans les guides
2.4	<b>04/05/2018</b>	- Modification des annexes 1, 2 et 4
2.5	<b><u>27/10/2020</u></b>	- Modification des annexes 1, 2 et 4
<b>2.6</b>	<b><u>Date de publication</u></b>	- <b><u>Modification des annexes 1, 2 et 4</u></b>

## Annexe 1

### Liste des tests rapides reconnus par l'AFSCA pour le screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru et leurs modalités d'utilisation

Généralités : l'utilisation quotidienne d'un échantillon de contrôle (négatif et) positif est fortement conseillée.

- **2IN1 BTCef** (A Rapid Test for Beta-lactams, Cefalexin & Tetracyclines in Milk ; produit YRM1008-40 ; Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.)

Placer la cupule dans l'incubateur, verser 200 µl de lait dans cette cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 40±2°C durant 3 minutes, placer une bandelette réactive et poursuivre l'incubation à 40±2°C durant 6 minutes, ôter le matériel absorbant en bas de la bandelette et lire la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide d'un lecteur SAFF Reader LF, TSR-100 ou TSR-20 avec une valeur cut-off de 1,30 pour le canal β-lactam et 1,10 pour le canal céfalexine et tétracycline.

- **4IN1 BSCT** (A rapid test for Beta-lactams, Streptomycin, Chloramphenicol & Tetracyclines in milk ; produit YRM1039C; Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.)

Placer une cupule dans l'incubateur, verser 200 µl de lait dans cette cupule, mélanger le lait avec le récepteur en incubé à 40±2°C durant 5 minutes, placer une bandelette réactive et poursuivre l'incubation à 40±2°C durant 7 minutes, ôter le matériel absorbant en bas de la bandelette et lire la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide d'un lecteur SAFF Reader LF ou Test Strip Reader (TSR-20 of TSR-100) avec une valeur cut-off de 1,10.

- **4-Sensor Milk** (produit KIT060 ; Unisensor s.a.)

Placer une cupule dans HeatSensor, verser 200 µl de lait dans cette cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 40±1°C pendant 5 minutes, placer les bandelettes réactives et continuer l'incubation à 40±1°C pendant 5 minutes. Ôter le matériel absorbant en bas de la bandelette et lire la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide d'un ReadSensor ou ReadSensor 2 avec une valeur cut-off de 1,10 (1,25 pour le canal chloramphénicol).

- **4SENSOR BSTQ** (produit KIT072 ; Unisensor s.a.)

Placer une cupule dans HeatSensor, verser 200 µl de lait dans cette cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 40±1°C pendant 5 minutes, placer la bandelette réactive et continuer l'incubation à 40±1°C pendant 5 minutes. Ôter le matériel absorbant en bas de la bandelette et lire la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide du lecteur ReadSensor 2 avec une valeur cut-off de 1,10.

- **Betastar S Combo PRO Reader** (produit BSC050, BSCR100 ; Neogen Corporation)

Ajouter 300 µl de lait et une bandelette réactive dans un flacon en plastique et incubation à 47,5±1°C pendant 5 minutes (Rapid test incubator). Lecture de la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide d'un lecteur Accuscan PRO Reader avec une valeur cut-off de 1,00.

**- BetaXpress Milk MRL** (produit KIT044 ; Unisensor s.a.)

Placer une cupule dans HeatSensor ; verser 200 µl de lait dans cette cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incuber à 45±1°C durant 1,5 minutes, placer une bandelette réactive et poursuivre l'incubation à 45±1°C durant 1,5 minutes. Lire la formation de couleur à l'aide d'un lecteur ReadSensor ou ReadSensor 2 reader avec une valeur cut-off de 1,10.

**- BT Sensors (Beta-lactam + Tetracycline rapid test** (product A1208-II ; Ballya)

Verser 200 µl de lait (porté à température ambiante) dans une cupule, mélanger le lait avec le récepteur, incubation à 37°C pendant 3 minutes, placer la bandelette réactive et poursuivre l'incubation à 37°C pendant 3 minutes. Lecture de la formation de couleur dans les 3 minutes à l'aide d'un système de lecture NB GEN avec les valeurs cut-off suivantes : 1,5 pour le canal tétracycline, 1,2 pour le canal céfalexine et 1,8 pour le canal β-lactame.

**- Charm MRLBL Pearl/EZ reader** (produit MRLBL ; Charm Sciences Inc.)

Verser 300 µl de lait, incubation à 56±1°C durant 8 minutes, suivie de la lecture immédiate de la bandelette à l'aide d'un lecteur Charm ROSA Pearl ou EZ avec 0,000 pour valeur cut-off.

**- Charm MRLBL1 EZ reader** (produit MRLBL1 ; Charm Sciences Inc.)

Verser 300 µl de lait, incubation à 56±1°C durant 1 minute dans EZ-Reader, suivie de la lecture automatique de la tigette avec 0,000 pour valeur cut-off. Le « mode d'incubation étendue » doit être activé avec l'EZ Reader.

**- Charm MRLBL3 Pearl/EZ reader** (produit MRLBL3 ; Charm Sciences Inc.)

Verser 300 µl de lait, incubation à 56±1°C durant 3 minutes, suivie de la lecture immédiate de la tigette à l'aide d'un lecteur Charm ROSA Pearl avec 0,000 pour valeur cut-off.

**- Charm MRLBL TET EZ reader** (produit MRLBLTET ; Charm Sciences Inc.)

Verser 300 µl de lait, incubation à 56±1°C durant 8 minutes, suivie de la lecture immédiate de la bandelette à l'aide d'un lecteur EZ avec 0,000 pour valeur cut-off.

**- Charm NZ TRIO Pearl/EZ reader** (produit NZ-TRIO ; Charm Sciences Inc.)

Verser 300 µl de lait, incubation à 56±1°C durant 8 minutes, suivie de la lecture immédiate de la bandelette à l'aide d'un lecteur Charm ROSA Pearl ou EZ avec 0,000 pour valeur cut-off.

**- COMBO BT 3+3** (produit 106002 ; Ring Biotechnology Co Ltd.)

Placer une cupule dans incubateur, verser 200 µl de lait (porté à température ambiante) dans cette cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incuber à 40°C durant 3 minutes, mettre une bandelette avec la partie "MAX" complètement immergée dans le liquide mélangé et poursuivre l'incubation à 40°C

durant 3 minutes. Enlever le matériel absorbant au bas de la bandelette et lire la formation de la couleur à l'aide d'un lecteur RingBio NB avec une valeur cut-off de 1,00.

- **EXTENSO** (produit KIT075 ; Unisensor s.a.)

Placer une cupule dans incubateur, verser 250 µl de lait dans cette cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 30±1°C durant 3 minutes, mettre une bandelette et poursuivre l'incubation à 30±1°C durant 10 minutes. Lire la formation de la couleur à l'aide du dispositif EXTENSO dans les 3 minutes. Activation minimale du dispositif EXTENSO pour la lecture des canaux BETA et CEFA avec une valeur cut-off de 1,00.

- **MilkGuard β-Lactams & Tetracyclines Combo Test Kit** (produit KB02127Y ; Beijing KwinBon Technology)

Verser 200 µl de lait (porté à température ambiante) dans une cupule, mélanger le lait avec le récepteur, incubé à 45°C durant 3 minutes, mettre une bandelette et poursuivre l'incubation à 45°C durant 5 minutes. Enlever le matériel absorbant au bas de la bandelette et lire la formation de couleur avec un lecteur K modèle GT-109 avec une valeur cut-off de 0,95.

- **Milksafe 2BC** (produit 720167 ; Chr. Hansen Holding A/S)

Verser 200 µl de lait dans une cupule, mélanger le lait avec le récepteur, mettre une bandelette et incubé à 40±0.5°C durant 5 minutes. Enlever le matériel absorbant au bas de la bandelette et lire la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide du lecteur CHR. HANSEN Desktop avec une valeur cut-off de 1,10.

- **Milksafe 3BTC** (produit 720158 ; Chr. Hansen Holding A/S)

Verser 200 µl de lait dans une cupule, mélanger le lait avec le récepteur, mettre une bandelette et incubé à 40±0.5°C durant 5 minutes. Enlever le matériel absorbant au bas de la bandelette et lire la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide du lecteur CHR. HANSEN Desktop avec une valeur cut-off de 1,10.

- **QuaTest BTSQ 4-in-1 Test Kit (Beta/Tetra/Sulfa/Quino)** (produit 1000 29 96T; Ring Biotechnology Co Ltd.)

Verser 200 µl de lait (porté à température ambiante) dans une cupule, mélanger le lait avec le récepteur, incubé à température ambiante (15-30°C) durant 3 minutes, mettre une bandelette et incubé durant 7 minutes. Lire la formation de couleur à l'aide d'un lecteur RingBio NB avec une valeur cut-off de 1,10.

- **SNAP Beta-Lactam ST Plus** (produit SNAP Beta-Lactam ST Plus ; IDEXX Inc.)

Le test s'effectue à une température ambiante (15-30°C). Verser 450 µl de lait dans le tube à échantillons, mélanger le lait avec le conjugué pendant maximum 15 secondes, verser le contenu dans le puits d'échantillon du dispositif SNAP Beta-Lactam ST Plus, activer le dispositif une fois que le flux a

atteint le cercle d'activité, attendre 6 minutes. Lire la formation de couleur visuellement ou à l'aide d'un lecteur SNAPshot DSR avec une valeur cut-off de 1,05.

- **SNAPduo ST Plus** (produit SNAPduo ST Plus Test ; IDEXX Inc.)

Le test s'effectue à une température ambiante (15-30°C). Verser 450 µl de lait dans le tube à échantillons, mélanger le lait avec le conjugué pendant maximum 15 secondes, verser le contenu dans le puits à échantillon du dispositif SNAP ST Plus, activer le dispositif une fois que le flux a atteint le cercle d'activité, attendre 6 minutes. Lire la formation de couleur visuellement ou à l'aide d'un lecteur SNAPshot DSR avec une valeur cut-off de 1,05.

- **TriSensor** (produit KIT035 ; Unisensor s.a.)

Placer une cupule dans HeatSensor, verser 200 µl de lait dans cette cupule, bien mélanger le lait avec le récepteur et incuber à 40°C durant 3 minutes, mettre une bandelette et poursuivre l'incubation durant 3 minutes à 40°C. Lire la formation de couleur dans les 10 minutes à l'aide d'un lecteur ReadSensor ou ReadSensor 2 avec une valeur cut-off de 1,10.

- **TwinSensor** (produit KIT020 ; Unisensor s.a.)

Placer une cupule dans HeatSensor, verser 200 µl de lait dans cette cupule, bien mélanger le lait avec le récepteur et incuber à 40°C durant 3 minutes, mettre une bandelette et poursuivre l'incubation durant 3 minutes à 40°C. Lire la formation de couleur dans les 15 minutes à l'aide d'un lecteur ReadSensor ou ReadSensor 2 avec une valeur cut-off de 1,10.



**Annexe 2**

Tableau. Capacité de détection ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )<sup>a</sup> des différents tests rapides reconnus par l'AFSCA pour les antibiotiques  $\beta$ -lactame dans le lait cru de vache (mise à jour 15/23/03/2021)

Résidu marqueur	LMR <sup>b</sup> $\mu\text{g kg}^{-1}$	2IN1 BTCef	4IN1 BSCT	4Sensor Milk KIT060	4Sensor OR BSCT KIT072	BetaStar S Combo PRO reader	Beta Xpress Milk MRL KIT044	BT Sensor	Charm MRLBL Pearl EZ reader	Charm MRLBL1 EZ reader	Charm MRLBL3 Pearl/ EZ reader	Charm MRLBL TET EZ reader	Charm NZ Trio Pearl/ EZ Reader	COMBO BT 3+3	EX- TENSO KIT075	Milksafe KIT033 Combo Test Kit	Milksafe 2BC	Milksafe 3BTC	QuaTest BT50 KIT031 Test Kit	SNAP Beta- Lactam ST Plus	SNAPdu o ST Plus	Tri Sensor KIT035	Twin Sensor KIT020
benzylpenicilline	4	2	1	2	2	2	2	1	2/*nt	2	3/3	4	3/3	2	2	2	1	1	1	2	2	3	3
ampicilline	4	2	1	4	3	3	3	1	3/≤3	4	4/4	3	3/3	2	4	2	3	3	2	4	4	4	4
amoxicilline	4	3	1	4	4	2	3	2	3/≤3	4	4/4	3	4/3	2	3	2	3	3	2	2	3	4	4
cloxacilline	30	4	3	6	7	6	9	1	25/≤30	16	25/25	30	22,5/ 15	2	12	2	6	6	3	3	4	9	8
naftilline	30	16	14	80	100	5	100	7	45/*nt	150	175/ 175	>45	150/ 300	6	350	9	30	30	7	4	3	70	80
ceftiofur	100 <sup>c</sup>	100	60	10	8	30	10	50	6/*nt	16	14/14	10	10/10	80	8	70	35	35	80	9	8	10	10
desfuroylceftiofur	100 <sup>c</sup>	>1000	700	60	30	35	60	400	8/*nt	90	≤100/ ≤100	25	50/50	600	60	600	30	35	600	30	25	≤100	60
cefquinome	20	8	5	20	14	16	20	6	14/≤20	≤20	20/20	20	20/20	6	14	5	16	16	7	12	16	20	16
cefazoline	50	70	35	12	12	90	12	25	10/*nt	20	25/30	12.5	25/25	40	9	30	125	100	30	18	20	18	12
cephapirine	60 <sup>d</sup>	14	8	4	4	20	4	5	5/*nt	30	9/10	6	30/30	4	4	6	20	18	3	25	30	5	4
desacetylcephapirine	60 <sup>d</sup>	50	25	20	25	60	20	12	7/*nt	≤60	≤60/ ≤60	15	45/45	14	16	14	50	50	8	≤60	≤60	≤60	18
cefoperazone	50	3	2	1	3	3	1	1	4/*nt	1	2/2	5	25/25	2	3	2	2	2	3	20	35	3	4
cefalexine	100	16	700	900	1000	3000	900	12	15/*nt	1750	1250/ 1250	50	au mieux 1000/>1 000	600	4	900	16	18	500	40	30	800	1250
cefalonium	20	2	1	2	4	2	2	1	3/*nt	9	12/12	5	20/20	2	20	2	1	1	2	18	14	4	4

Notes:<sup>a</sup> capacité de détection définie comme étant la plus faible concentration testée fournissant au minimum un résultat positif de respectivement 19 sur 20, 38 sur 40 ou 57 sur 60 répétitions.

<sup>b</sup> LMR, Limite Maximale de Résidu (Règlement (CE) n° 470/2009; Règlement ~~de la Commission~~ (UE) n° 37/2010 (statut au 01/01/2021)).

<sup>c</sup> somme de tous les résidus avec une structure  $\beta$ -lactame intacte exprimée en terme de desfuroylceftiofur.

<sup>d</sup> somme de céphapirine et désacétylcephapirine.

\* : même capacité de détection pour les deux appareils de lecture : non testé

Remarque : les cases colorées indiquent les antibiotiques pour lesquels la limite de détection d'un test est supérieure à la LMR.

### Annexe 3

#### Conditions pour la reconnaissance d'un test rapide pour le screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru.

Le groupe d'antibiotiques  $\beta$ -lactame (pénicillines et céfalosporines) constitue de loin le principal groupe d'antibiotiques dont on retrouve des résidus dans le lait cru (Reybroeck en Daeseleire, 2003; Kress *et al.*, 2007). Dès lors, en ce qui concerne le spectre de détection, le test doit pouvoir établir la présence des résidus de marqueur de tous les antibiotiques  $\beta$ -lactame enregistrés en Belgique comme substance pharmacologiquement active pour utilisation chez la vache laitière. Il s'agit des substances suivantes : benzylpénicilline, ampicilline, amoxicilline, cloxacilline, nafcilline, ceftiofur, desfuroylceftiofur, cefquinome, céfazoline, céphapirine, desacetyl céphapirine, céfopérazone, céfalexine et céfalonium.

En matière de capacité de détection, le test doit pouvoir établir la présence d'au moins 85% (soit 12/14) des résidus des marqueurs susmentionnés à leur limite maximale de résidus (LMR) (Règlement (UE) n° 37/2010) dans au moins 95% des cas.

Le test doit être robuste et peut donner au maximum 5% de résultats négatifs sur des échantillons positifs.

Le test doit être validé, aux frais du producteur de kit, par un LNR ou un laboratoire accrédité agréé suivant la Décision CE 2002/657. Pour les tests commercialisés après janvier 2010, la validation doit également avoir été réalisée suivant les directives CRL (*Anonymous*, 2010).

Le test doit être agréé par l'AFSCA sur l'avis du LNR belge, sur base de l'évaluation du dossier de validation. Si l'AFSCA l'estime nécessaire, un avis complémentaire du Comité scientifique de l'AFSCA peut être demandé.

#### Références :

Anonyme. 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Community Reference Laboratories Residues (CRLs). 20/01/2010: 1-18.

Décision 2002/657/CE de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.

Kress C., Seidler C., Kerp B., Schneider E., Usleber E. 2007. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Anal. Chim. Acta* 586: 275-279.

Reybroeck W., Daeseleire E. 2003. Influence de la conservation sur les résidus d'antibiotiques dans le lait. Nouvelle analyse d'échantillons positifs et identification des substances inhibitrices responsables d'un résultat défavorable lors de la détermination qualitative officielle du lait. Résultats Melle, Belgique: T&V-ILVO.

Règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale.

## Annexe 4

### Liste des tests inhibiteurs microbiologiques reconnus par l'AFSCA pour la confirmation d'un résultat non conforme à un test rapide lors du screening des résidus d'antibiotiques dans le lait cru et leurs modalités d'utilisation.

**Charm Blue Yellow II** (produit Charm Blue Yellow II Test; Charm Sciences, Inc.)

Ajouter 100 µl de lait sur la gélose de la microplaque. Incubation des plaques de microtitration dans un bain-marie en circuit fermé à 64°C ; temps d'incubation mentionné sur l'emballage du réactif. Lecture visuelle selon les instructions du producteur du kit ou lecture instrumentale : lecture réflectométrique (GVSCAN) des plaques fermées avec le lait sur l'agar, cut-off score 6,0. Un échantillon de contrôle négatif et un positif sont analysés en même temps.

**Charm Cowside II Test** (produit Cowside II Test; Charm Sciences, Inc.)

Ajouter 100 µl de lait sur la gélose de l'ampoule. Incubation des ampoules dans un block heater Charm Science à 64°C ; temps d'incubation mentionné sur l'emballage du réactif. Lecture visuelle selon les instructions du producteur du kit ou lecture instrumentale. Un échantillon de contrôle négatif et un positif sont analysés en même temps.

**Delvotest SP-NT (MCS)** (produit Delvotest SP-NT 5Pack 8422, 20Pack 8421; DSM Food Specialties)

Ajouter 100 µl de lait sur la gélose de la microplaque ou de l'ampoule. Incubation des plaques de microtitration ou des ampoules dans un bain-marie en circuit fermé ou dans un block heater à  $64 \pm 2$ °C ; temps d'incubation comme mentionné par le producteur du kit et maximum 3h. Lecture visuelle selon les instructions du producteur du kit ou lecture instrumentale : lecture réflectométrique des ampoules/plaques fermées avec le lait sur l'agar. DelvoScan-plaque software (plaques de microtitration) ou DelvoScan-ampoule software : HP Scanjet 7400 C avec cut-off z-value -3,0 ; Epson Perfection V600 Photo scanner avec cut-off z-value -1,00. Un échantillon de contrôle négatif et un positif sont analysés en même temps.

**Delvotest T** (produit Delvotest T (13300, 15459); DSM Food Specialties)

Ajouter 100 µl de lait sur la gélose de la microplaque ou de l'ampoule. Incubation des plaques de microtitration ou des ampoules dans un bain-marie en circuit fermé ou dans un block heater à 64°C ; temps d'incubation comme mentionné par le producteur du kit et maximum 3h15. Lecture visuelle selon les instructions du producteur du kit ou lecture instrumentale : lecture réflectométrique des ampoules/plaques fermées avec le lait sur l'agar. DelvoScan-plaque software (plaques de microtitration) ou DelvoScan-ampoule software : HP Scanjet 7400 C avec cut-off z-value -3,0 ; Epson Perfection V600 Photo scanner avec cut-off z-value -1,00. Un échantillon de contrôle négatif et un positif sont analysés en même temps.

**Eclipse 3G** (produit ECLIPSE 3G ; ZEULAB S.L.)

Ajouter 100 µl de lait sur la gélose de la microplaque. Incubation des plaques de microtitration dans un incubateur préchauffé (FX Incubator, Ref ZE. / EX ZEULAB S.L.) à 65°C ; temps d'incubation mentionné sur le certificat par lot de réactif. Lecture visuelle selon les instructions du producteur du kit ou lecture instrumentale : lecture spectrophotométrique à 590 nm (filtre 1) et 650 nm (filtre 2) après avoir enlevé le lait et avoir lavé les plaques, cut-off = absorption moyenne de 4 x blanc lait + 0,2. Un échantillon de contrôle négatif et un positif sont analysés en même temps.

**Eclipse Farm 3G** (produit ECLIPSE FARM 3G; ZEULAB S.L.)

Ajouter 100 µl de lait sur la gélose de l'ampoule. Incubation des ampoules dans un e-Reader (ZEULAB S.L.) à 63±1°C avec lait blanc de contrôle sur position 1. Temps d'incubation défini par l'e-Reader. Lecture instrumentale automatique avec valeur cut-off 56. Un échantillon de contrôle négatif et positif est analysé en même temps. Mode de fonctionnement « méthode de contrôle négatif (NC) » : lait blanco en position 1.

**Test4All (Eclipse Farm 4G & COMET)** (produit ECLIPSE 4G (ZE/EF4G25) + COMET device/app (ZE/COM4); ZEULAB S.L.)

Ajouter 100 µl de lait sur la gélose de l'ampoule. Incubation des ampoules dans un COMET (ZEULAB S.L.) à 63°C et activation du test. Durée d'incubation déterminée par le COMET. Lecture instrumentale automatique avec 'value' 50 comme valeur cut-off. Un échantillon de contrôle positif est également analysé.

## **Annexe 5**

### **Conditions de reconnaissance d'un test inhibiteur microbiologique pour la confirmation d'un résultat non conforme obtenu par test rapide lors du contrôle à l'entrée du lait cru quant aux résidus d'antibiotiques par l'industrie laitière**

Vu l'objectif du test, entrent en considération aussi bien une configuration de test en plaque de microtitration ou en ampoule.

En matière de capacité de détection, le test doit pouvoir établir la présence d'au moins 85% (soit 12/14) des résidus de marqueurs mentionnés ci-après à leur limite maximale de résidus (LMR) respective (Règlement (UE) n° 37/2010) dans au moins 95% des cas. Il s'agit des résidus de marqueurs de tous les antibiotiques  $\beta$ -lactame enregistrés en Belgique comme substance pharmacologiquement active pour utilisation chez les vaches laitières, à savoir : benzylpénicilline, ampicilline, amoxicilline, cloxacilline, nafcilline, ceftiofur, desfuroylceftiofur, céfquinome, céfazoline, céphapirine, céfapirine désacétylée, céfopérazone, céfalexine et céfalonium.

Le test doit avoir été validé par un LNR suivant la Décision 2002/657/CE. Pour les tests commercialisés après janvier 2010, la validation doit également avoir été réalisée suivant les directives CRL.

Le test doit être agréé par l'AFSCA après évaluation d'un dossier de validation établi par un LNR. Si l'AFSCA l'estime nécessaire, un avis complémentaire du Comité scientifique de l'AFSCA peut être demandé.

#### **Références:**

*Anonymous*. 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Community Reference Laboratories Residues (CRLs). 20/01/2010: 1-18.

Décision 2002/657/CE de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.

Règlement (CE) n° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale.