



## **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/JWS/96718		Date	04/05/2018
Version actuelle	2.4	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	Vicky Lefevre, directeur général

### **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.

## **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**

Le lait cru doit faire l'objet d'une prise d'échantillon pour le contrôle sur la présence de substances inhibitrices (contrôle d'entrée).

Une liste des tests rapides pouvant être mis en œuvre à cette fin ainsi que les conditions pour la reconnaissance d'un test sont reprises en annexes 1 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 du camion-citerne à l'aide d'un test rapide, un résultat non conforme est obtenu, le lait du camion-citerne en question peut être analysé au moyen d'un test inhibiteur microbiologique avant de décider de l'acceptation ou non du chargement du camion-citerne 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.

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'analyse complémentaire (test inhibiteur microbiologique), vous ne pouvez pas transformer ce lait en produits destinés à la consommation humaine. Il en va de même si vous faites une analyse complémentaire (test inhibiteur microbiologique) 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, 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) et que celle-ci se révèle conforme, le résultat non conforme au test rapide ne doit pas être notifié.

## 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>Date de publication</b>	- Modification des annexes 1, 2 et 4

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

### - **Beta-s.t.a.r. combo v1.0** (Neogen Corporation)

Verser 200 µl de lait dans un flacon, mélanger le lait avec le récepteur et incuber à 47,5±1°C durant 2 minutes, mettre une bandelette et poursuivre l'incubation durant 3 minutes à 47,5±1°C et lire la formation de couleur à l'aide d'un lecteur Accuscan III ou Accuscan Pro avec une valeur cut-off de 1,00.

### - **Betastar S Combo** (Neogen Corporation)

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

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

Verser 200 µl de lait dans une cupule, mélanger le lait avec le récepteur, mettre une bandelette dans le support du HeatSensor et incuber à 45±1°C durant 3 minutes, lire la formation de couleur à l'aide d'un lecteur Readsensor avec une valeur cut-off de 1,10.

### - **BT Sensors Test Kit** (Ballya)

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 et 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 céphalexine et 1,8 pour le canal β-lactame.

### - **Charm MRLBL (ROSA)** (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 avec 0,000 pour valeur cut-off.

### - **Charm 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 tige avec 0,000 pour valeur cut-off.

### - **Charm MRLBL3** (Charm Sciences Inc.)

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

### - **EXTENSO KIT075** (Unisensor)

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

### - **'A Rapid Test for Beta-lactams, Cefalexin & Tetracyclines in Milk'** (Order Code: YRM1008-40; Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.)

Placer la cupule dans l'incubateur, verser 200 µl de lait dans la cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 40±3°C durant 3 minutes, placer une bandelette réactive et poursuivre l'incubation à 40±3°C durant 6 minutes, ôter le matériel absorbant en bas de la tigette et lire la formation de couleur dans les 5 minutes à l'aide d'un lecteur SAFF Reader LF en Bioeasy Data Export software avec une valeur cut-off de 1,10.

**- SNAP Beta 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 ST Plus, activer le dispositif une fois que le flux a atteint le cercle d'activité, attendre 6 minutes. Lire la formation de couleur à l'aide d'un lecteur SNAPshot DSR avec une valeur cut-off de 1,05.

**- SNAPduo 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 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 à l'aide d'un lecteur SNAPshot DSR avec une valeur cut-off de 1,05.

**- TwinSensor KIT020 (ancienne réf. BT660+) (Unisensor s.a.)**

200 µl de lait en cupule, bien mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 40°C durant 3 minutes, mettre une bandelette et poursuivre l'incubation durant 3 minutes à 40°C. Lire la formation de couleur à l'aide d'un lecteur ReadSensor avec une valeur cut-off de 1,10.

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

Verser 200 µl de lait dans une cupule, bien mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 40°C durant 3 minutes, mettre une bandelette et poursuivre l'incubation durant 3 minutes à 40°C. Lire la formation de couleur à l'aide d'un lecteur Sensor avec une valeur cut-off de 1,10.

**- 4-Sensor KIT060 (Unisensor s.a.)**

200 µl de lait en cupule, mélanger le lait avec le récepteur et incubé à 40±1°C pendant 10 minutes dans un HeatSensor préchauffé, placer les bandelettes réactives dans un support spécial. Les bandelettes réactives sont ajoutées automatiquement après un certain temps. Lecture de la formation de couleur à l'aide d'un ReadSensor avec une valeur cut-off de 1,10 (1,25 pour le canal chloramphénicol).

Tableau A. Capacité de détection des différents tests rapides reconnus par l'AFSCA pour les antibiotiques  $\beta$ -lactame dans le lait cru de vache (mise à jour 13/02/2018) partie 1.

Résidu marqueur	LMR <sup>b</sup> $\mu\text{g kg}^{-1}$	Capacité de détection ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>a</sup>							
		$\beta$ -s.t.a.r. combo (v1.0)	$\beta$ -s.t.a.r. S Combo	Beta Xpress Milk MRL KIT044	BT Sensors Test kit	Charm MRLBL (ROSA)	Charm MRLBL1	Charm MRLBL3	
								Pearl reader	EZ Reader
benzylpenicilline	4	≤3	1,5	2	1	2	2	3	3
ampicilline	4	4	3	3	1	3	4	4	4
amoxicilline	4	≤4	2	3	2	3	4	4	4
cloxacilline	30	6	6	9	1	25	16	25	25
nafcilline	30	14	5	100	7	45	150	175	175
ceftiofur	100 <sup>c</sup>	100	30	10	50	6	16	14	14
desfuroylceftiofur	100 <sup>c</sup>	1000	35	60	400	8	90	≤100	≤100
cefquinome	20	≤8	16	20	6	14	≤20	20	20
cefazoline	50	50	90	12	25	10	20	25	30
cephapirine	60 <sup>d</sup>	10	20	4	5	5	30	9	10
desacetylcephapirine	60 <sup>d</sup>	50	60	20	12	7	≤60	≤60	≤60
cefoperazone	50	≤8	3	1	1	4	1	2	2
cefalexine	100	>700	3000	900	12	15	1750	1250	1250
cefalonium	20	≤5	2	2	1	3	9	12	12

Tableau B. Capacité de détection des différents tests rapides reconnus par l'AFSCA pour les antibiotiques  $\beta$ -lactame dans le lait cru de vache (mise à jour 13/02/2018) partie 2.

Résidu marqueur	LMR <sup>b</sup> $\mu\text{g kg}^{-1}$	Capacité de détection ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>a</sup>						
		EX-TENSO KIT075	SNAP BETA ST Plus	A Rapid Test for Beta-lactams, Cefalexin & Tetracyclines in Milk	SNAPduo ST Plus	Twin Sensor KIT020	Tri Sensor KIT035	4Sensor Milk KIT060
benzylpenicilline	4	2	2	2	2	3	3	2
ampicilline	4	4	4	2	4	4	4	4
amoxicilline	4	3	2	3	3	4	4	4
cloxacilline	30	12	3	3	4	8	9	6
nafcilline	30	350	4	9	3	80	70	80
ceftiofur	100 <sup>c</sup>	8	9	90	8	10	10	10
desfuroylceftiofur	100 <sup>c</sup>	60	30	1000	25	60	≤100	60
cefquinome	20	14	12	7	16	16	20	20
cefazoline	50	9	18	45	20	12	18	12
cephapirine	60 <sup>d</sup>	4	25	14	30	4	5	4
desacetylcephapirine	60 <sup>d</sup>	16	≤60	45	≤60	18	≤60	20
cefoperazone	50	3	20	3	35	4	3	1
cefalexine	100	4	40	6	30	1250	800	900
cefalonium	20	20	18	2	14	4	4	2

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 op 40 of 57 ou 60 répétitions.

<sup>b</sup> LMR, Limite Maximale de Résidu (Règlement (CE) No 470/2009; Règlement de la Commission (UE) No 37/2010 et modifications (statut au 20/11/2013).

<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 désacetylcephapirine.

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

## **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 de 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 : benzylopénicilline, 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) 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 (CE) N° 37/2012 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.



**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** (Charm Sciences Inc, Lawrence, MA)

Incubation 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.

**Delvotest SP-NT (MCS)** (DSM Food Specialties bv, Delft, NL)

Incubation 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 3h. Lecture visuelle selon les instructions du producteur du kit ou lecture instrumentale : lecture réflectométrique (Delvoscan software (plaques de microtitration) ou Premiscan (ampoules)) des ampoules/plaques fermées avec le lait sur l'agar, cut-off z-value -3,0. Un échantillon de contrôle négatif et un positif sont analysés en même temps.

**Delvotest T** (DSM Food Specialties bv, Delft, NL)

Incubation 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 (Delvoscan software (plaques de microtitration) ou Premiscan (ampoules)) des ampoules/plaques fermées avec le lait sur l'agar, cut-off z-value -3,0. Un échantillon de contrôle négatif et un positif sont analysés en même temps.

**Eclipse 3G** (ZEULAB S.L., Zaragoza, ES)

Incubation 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.

## **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) 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) No 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.