

Comité du Lait ASBL	Feuille d'enregistrement	FEU-ASQ-00002(1)
Signatures des responsables (document N° 2580)		

0.1 Généralités

Code et version NOT-INH-00004(7)
Titre du document Rech subst inhib - Test autorisation de reprise après résultat défavorable
Type de document Note Technique
Date d'impression 30/8/19

0.2 Résumé

Note technique décrivant comment réaliser la recherche de substances inhibitrices directement en ferme afin de savoir si le lait peut être collecter. Deux tests sont possibles :




- Le test rapide 2IN1 BT Cef sensible aux beta lactames
- Le test Delvo-test T sensible à un large spectre de substances inhibitrices

0.3 Modification par rapport à la version précédente

§5.2 : révision complète pour introduction du test 2IN1 BT Cef

0.4 Dates et Signatures

Approbateur PIRAUX Emile
 Directeur - Responsable Qualité
Auteur VESELKO Didier
 Responsable technique
Vérificateur DELLICOUR Stéphanie
 Responsable laboratoire

30/9/19 
19/8/19 
30/9/19 

Recherche de substances inhibitricesTest pour l'autorisation de reprise de livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices

1 Objet et domaine d'application

Cette note décrit les mesures prises pour la reprise des livraisons de lait après un résultat défavorable et plusieurs résultats détectables en substances inhibitrices au Comité du lait. Elle décrit les deux modes opératoires reconnus par le CdL et devant être utilisés par les acheteurs.

Les deux tests sont les suivants

- Le test rapide 2IN1 BTCef (EU) sensible notamment aux beta lactames et durant une dizaine de minutes.
- Le test Delvo-test T® sensible à un large spectre de substances inhibitrices et durant 3 heures

Cette note technique précise également dans quelles circonstances l'un ou l'autre test doit être utilisé.

2 Définitions

- Résultat **défavorable** : présence de substances inhibitrices avec une concentration supérieure ou égale à la norme conformément à l'instruction technique du CdL (INT-MOP-00014).
- Résultat **détectable** : présence de substances inhibitrices conformément aux tests et procédure reconnus par l'autorité compétente et suivant l'instruction technique du CdL (INT-MOP-00014).
- Suspension **spéciale** de livraison : Suspension de la collecte après minimum quatre résultats détectables dans les 12 mois.

3 Références

- 2IN1 BTCef : Mode d'emploi » (disponible dans chaque kit)
- PRO-INH-00001 : Procédure pour l'autorisation de reprise des livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices.

4 Modification par rapport à la version précédente

Utilisation du test 2IN1 BTCef en remplacement du Beta Star Combo.

5 Contenu

5.1 Introduction

1^{er}, 2^{ème} ou 3^{ème} résultat défavorable dans les 12 mois

Lors de la détection d'un résultat défavorable en substances inhibitrices du lait d'une exploitation, celui-ci ne peut plus être collecté par l'acheteur avant qu'il n'ait été contrôlé et afin de montrer qu'il est désormais exempt de toute trace de substances inhibitrices.

Le « Comité du Lait ASBL » informe l'acheteur d'un résultat défavorable en substances inhibitrices :

- la pénalisation résulte de la détection de substances inhibitrices de la famille des bêta-lactames. L'acheteur testera le lait de l'exploitation avec le test 2IN1 BTCef (EU) (§ 5.2)

Comité du Lait ASBL	NOTE TECHNIQUE	NOT-INH-00004(7)
<u>Recherche de substances inhibitrices</u> <u>Test pour l'autorisation de reprise de livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices</u>		

- la pénalisation résulte de la détection de substances inhibitrices non bêta-lactames. L'acheteur testera le lait de l'exploitation avec le test Delvo-test T® (§ 5.3)

4^{ème} résultat défavorable ou détectable dans les 12 mois

L'échantillon est analysé au Comité du lait avec le 2IN1 BTCef (EU), selon la procédure reprise ci-dessous. Si le résultat est négatif, l'échantillon est analysé avec le Delvo-test T® et confirmé avec les autres tests rapides (INT-MOP-00018 et INT-MOP-00028)

5.2 Le 2IN1 BTCef (EU)

5.2.1 Principe de l'analyse

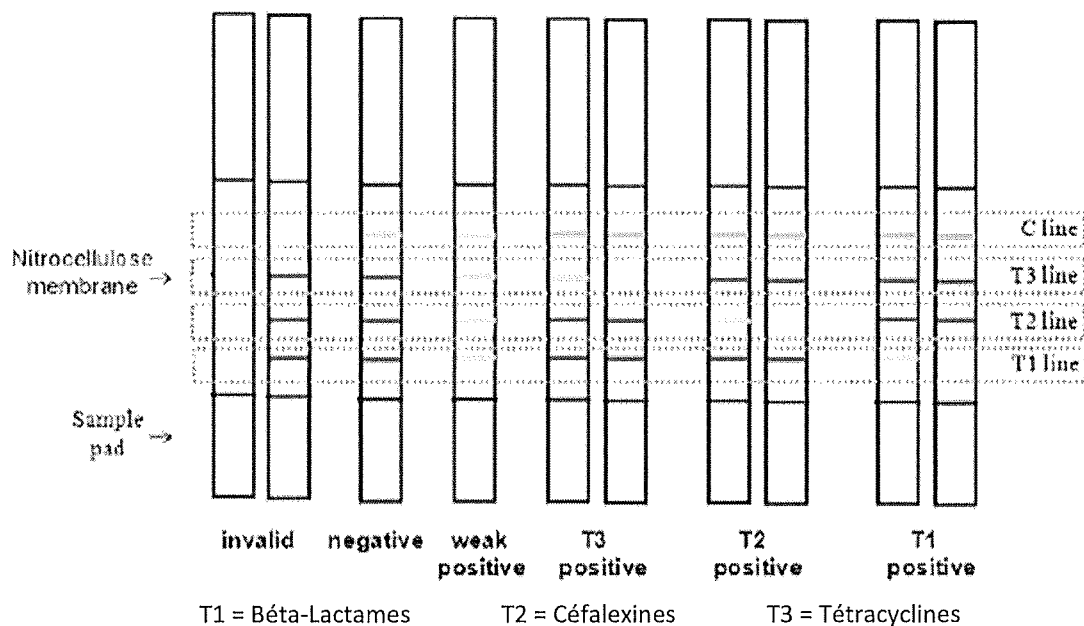
Le 2IN1 BTCef (EU) est une méthode de type "Récepteur Assay" pour la recherche rapide, dans le lait de résidus actifs d'antibiotiques de la famille

- des β lactames (ex pénicillines,...)
- des tétracyclines

Le test est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Au cours de la première étape d'incubation, les antibiotiques β lactames et tétracyclines, s'ils sont présents dans l'échantillon de lait, se lient au récepteur.

Pendant la deuxième étape d'incubation, le lait migre sur un support immunochromatographique qui présente quatre lignes de capture.

- une ligne retient tous les récepteurs qui n'ont pas lié d'antibiotiques β lactames (T1)
- une ligne retient tous les récepteurs qui n'ont pas lié d'antibiotiques β lactames Cefalexine (T2)
- une ligne retient tous les récepteurs qui n'ont pas lié d'antibiotiques tétracyclines (T3)
- une ligne sert de référence (C)



5.2.2 Réactifs

Le coffret 2IN1 BTC permet la réalisation de 96 analyses. Il contient:

Recherche de substances inhibitricesTest pour l'autorisation de reprise de livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices

- 12 tubes contenant chacun 1 barrette de 8 cupules de réactif (rouge) et 8 tigettes de test.
- 1 pipette (200µL), 100 embouts de pipette
- 8 contrôles positifs et 8 contrôles négatifs en cupule (si nécessaire).
- 1 manuel d'utilisation.

Conservation du kit

- Durée : jusqu'à la date de péremption
- Température :
 - 2-8 °C
 - Ne pas congeler.
 - Protéger du soleil, de l'humidité et de la chaleur

5.2.3 Matériel

- Le kit contient la pipette 200µl nécessaires à la réalisation du test
- Incubateur réglé sur $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (utiliser de préférence le modèle du fournisseur, référence 763.100001.00)

5.2.4 Mode opératoire

- Suivre les instructions contenues dans la notice rédigée par le fabricant
- Faire chauffer l'incubateur et attendre sa stabilisation (15 minutes)
- Retirer un tube de réactifs du réfrigérateur 15 minutes avant utilisation.
- Prélever un échantillon dans le tank bien homogène (si nécessaire, lancer manuellement l'agitateur)
- Sortir une cupule du tube et s'assurer que tout le lyophilisat se trouve au fond. Remarque: pour faire descendre le lyophilisat, frapper délicatement le flacon sur une surface solide.
- Prélèvement du lait
 - Enlever le bouchon de chaque cupule utilisée.
 - Placer un embout neuf sur la pipette.
 - Prélever 200 µl de lait avec la pipette.
 - Distribuer les 200 µl de l'échantillon dans la cupule contenant le récepteur.
 - Mélanger pas aspiration – refoulement 5 à 10 fois.
- Mettre la cupule dans l'incubateur et incuber pendant 3 minutes.
- Pendant l'incubation
 - Les mains propres et sèches
 - Travailler sur une surface propre et sèche
 - Identifier les tigettes (N° Producteur + Date)
- A la fin de l'incubation, prendre une tigette et la déposer dans les cupules.
 - Contrôler l'identification de la tigette et du flacon pour éviter toute confusion
 - Veiller à ce que la tigette soit orientée pour que le tampon d'absorption trempe dans le liquide.
 - Poursuivre l'incubation 6 minutes
- Après la seconde incubation
 - Retirer immédiatement la tigette des cupules
 - Enlever le tampon en bout de tigette
 - Interpréter la tigette comme décrit dans § 5.2.5

5.2.5 Interprétation (Cfr. schéma § 5.2.1)

- Interpréter immédiatement et visuellement le résultat comme suit :

Recherche de substances inhibitricesTest pour l'autorisation de reprise de livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices

- Test non valide si
 - La ligne de contrôle (C line) est absente → recommencer
 - Aucune ligne rouge n'apparaît aux endroits prévus → recommencer
 - Remarques :
 - Cela peut se produire si les réactifs ne sont pas conformes
 - Cela peut se produire si le lait est non conforme.
 - Le test sera recommencé sur un lait « blanc » exempt de substances inhibitrices (par exemple un lait de consommation). Si le résultat est de nouveau non valide sur le blanc, les réactifs sont à mettre en cause. Le test devra être refait au siège de l'acheteur ou du CdL. Si l'échantillon blanc donne un résultat valable, le problème se situe au niveau du lait. On prélèvera un autre échantillon et on recommencera l'analyse. Si le résultat est toujours non valide, l'analyse devra être refaite au siège de l'acheteur ou du CdL.
- La ligne T1 (béta-lactames) / T2 (Céfalosporines) / T3 (Tétracyclines) a une intensité
 - supérieure à celle de la ligne de contrôle → l'échantillon ne contient pas ou peu de résidus de substances inhibitrices de la famille spécifique à la ligne T concernée → le résultat est négatif.
 - égale ou inférieure à celle de la ligne de contrôle → l'échantillon contient des substances inhibitrices de la famille spécifique à la ligne T concernée → le résultat est POSITIF
 - très faible ou est absente → l'échantillon contient des substances inhibitrices de la famille spécifique à la ligne T concernée → le résultat est POSITIF
 - Il y a autorisation de reprendre les livraisons si et seulement si **les trois lignes T1 T2 T3** ont donné un résultat négatif.
- Enregistrer le résultat de l'analyse sur le document prévu dans la procédure PRO-LEG-00002 (modèle FEU-INH-00021) et le laisser à l'exploitation.
- La tigette est conservée par l'acheteur

5.2.6 Remarques et précautions

- Température du lait
 - Le lait doit être à température ambiante avant de commencer l'analyse (15-30°C)
- Bien manipuler la pipette de prélèvement
 - Ne pas mettre trop ou trop peu de lait
 - Ne pas polluer la pipette avec du lait
 - Toujours changer de d'embout de prélèvement entre deux échantillons.
- Température d'incubation
 - La température d'incubation idéale est 40 °C +/- 2,0°C.
 - En dehors de la plage de température indiquée, les performances du test sont modifiées et sa réponse devient incorrecte.
- Précautions
 - Lors de la mise en œuvre du test 2IN1 BTC, il convient d'avoir les mains propres et sèches pour éviter toute contamination des réactifs.
 - Avant son ouverture, le flacon blanc devra être resté au moins 15 minutes à température ambiante.
- Environnement : le résultat d'un test de recherche de résidus d'antibiotiques pouvant être modifié par la présence accidentelle de molécules actives dans l'environnement, il est

Recherche de substances inhibitricesTest pour l'autorisation de reprise de livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices

recommandé d'éviter la mise en oeuvre du 2IN1 BTC par toute personne subissant un traitement aux antibiotiques.

5.3 Le Delvotest[®]T ampoules

5.3.1 Principe de l'analyse

Le principe de l'analyse est basé sur la diffusion d'un échantillon de lait dans un milieu Agarensemencé avec une souche bactérienne. Après incubation pendant une durée déterminée (typiquement 3h00), s'il y a absence de substances inhibitrices dans l'échantillon, la souche bactérienne se développe, acidifie le milieu, et provoque le virage du pourpre au jaune de l'indicateur de pH présent dans le milieu. En présence de substances inhibitrices, l'acidification est freinée et la coloration ne varie pas ou peu.

5.3.2 Réactifs

- Le kit contient 25 ou 100 tubes (Delvotest[®] T ampoules)
 - Chaque tube contient une gélose nutritive, d'un indicateur de pH et de triméthoprime,ensemencé avec des spores d'un micro-organisme test
 - Chaque kit a un numéro de lot
 - Précautions
 - Eviter les fortes variations de température
 - Ne pas congeler (dénaturation de la gélose)
 - Eviter les températures < 4°C
 - Lors de la réception d'une livraison, contrôler que le témoin de température haute de chaque boîte n'a pas viré du gris au noir
 - Conservation
 - Durée : jusqu'à la date de péremption
 - Température : 5-16 °C

5.3.3 Matériel

- Chaque kit contient les pipettes nécessaires au prélèvement de 100 µl de lait
- Un incubateur réglé à 64 ± 1°C (DSM Incubator, fourni par le fabricant)

5.3.4 Mode opératoire

- Suivre les instructions contenues dans la notice rédigée par le fabricant
- Faire chauffer l'incubateur et attendre sa stabilisation
- Prélever un échantillon dans le tank bien homogène (si nécessaire, lancer manuellement l'agitateur)
- A l'aide de la micro pipette prélever 100 µl de lait et les déposer dans le tube
- Incuber durant 3h00 ± 5 minutes le tube à 64 ± 1°C (incubateur DSM)

5.3.5 Interprétation

- Après incubation, interpréter immédiatement (5 minutes maximum) la coloration à l'aide de la carte fournie par le fabricant et en conclure la présence ou absence de substances inhibitrices dans l'échantillon
- Enregistrer le résultat de l'analyse sur le document prévu dans la procédure PRO-LEG-00002 (modèle FEU-INH-00021) et le laisser à l'exploitation.

Comité du Lait ASBL	NOTE TECHNIQUE	NOT-INH-00004(7)
<u>Recherche de substances inhibitrices</u> <u>Test pour l'autorisation de reprise de livraisons de lait après un résultat défavorable en</u> <u>substances inhibitrices</u>		

5.3.6 Remarques et précautions

- Toujours changer de pipette entre deux échantillons
- Le Delvotest T[®] est un test capable de détecter un large spectre de substances inhibitrices.
- Quelques remarques importantes :
 - Il est très important de ne pas dépasser la durée d'incubation prescrite par le fabricant car celle-ci a une répercussion directe sur la sensibilité du test.
 - Si le lait contient des substances de type désinfectant, anti-parasitaire ou que le pH est élevé (dans le cas de mammites par exemple), il peut y avoir détection de positifs.
 - La présence d'un agent conservateur dans le lait peut entraîner un résultat positif.