

# commission du codex alimentarius



ORGANISATION DES NATIONS  
UNIES POUR L'ALIMENTATION  
ET L'AGRICULTURE

ORGANISATION  
MONDIALE  
DE LA SANTÉ



F

BUREAU CONJOINT: Viale delle Terme di Caracalla 00100 ROME Tél: +39 06 57051 www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593

Point 11 (a) de l'ordre du jour

CX/RVDF 03/10  
Novembre 2002

## PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES

### COMITÉ DU CODEX SUR LES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES DANS LES ALIMENTS

#### Quatorzième session

Washington, D.C. (USA), 4 – 7 mars 2003

### EXAMEN DES CRITÈRES DE PERFORMANCE POUR LES MÉTHODES D'ANALYSE DES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES DANS LES ALIMENTS

Les gouvernements et les organisations internationales souhaitant émettre des observations sur l'objet des présentes sont priés de les soumettre, par écrit, **au plus tard le 3 février 2003**, à : U.S. Codex Office, Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, Room 4861, South Building, 14th and Independence Avenue, S.W., Washington, DC 20250, USA (fax : +1.202.720.3157 ; courrier électronique : [uscodex@usda.gov](mailto:uscodex@usda.gov)), et d'en adresser une copie au Secrétariat de la Commission du Codex Alimentarius, Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie (fax : +39.06.5705.4593 ; courrier électronique : [Codex@fao.org](mailto:Codex@fao.org)).

## INTRODUCTION

1. À l'occasion de sa 12<sup>e</sup> session, le Comité du Codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (CCRVDF) a accepté la proposition du groupe de travail ad hoc sur les Méthodes d'analyse et d'échantillonnage concernant l'examen des critères de validation des méthodes d'analyse dans le but de compléter les procédures existantes par l'ajout de critères de validation de méthodes d'analyse en laboratoire unique. À sa 13<sup>e</sup> session, tenue à Charleston, en Caroline du Sud, en décembre 2001, le CCRVDF a formé un groupe de rédaction chargé de produire un document à soumettre à la considération de la 14<sup>e</sup> session.
2. Deux consultations d'experts (Vienne, 1998<sup>1</sup> et Miskolc, 1999<sup>2</sup>) ont recommandé qu'une approche de validation intralaboratoire soit reconnue comme un mécanisme viable d'identification des méthodes susceptibles d'être intégrées à un programme de réglementation visant à appuyer les recommandations de la Commission du Codex Alimentarius en matière de Limites maximales de résidus (LMR).
3. Ces consultations ont non seulement recommandé les spécifications techniques propices à l'évaluation des méthodes d'analyse en laboratoire unique (validation interne ou intralaboratoire), mais elles ont également admis que les laboratoires qui utilisent ces méthodes doivent être en mesure de démontrer leur capacité de les appliquer de manière adéquate. Élément clé de la procédure d'évaluation interne, le laboratoire doit pouvoir démontrer l'expertise analytique, les procédures d'assurance de la qualité et les compétences dont il dispose au soutien des

<sup>1</sup> Validation de méthodes d'analyse pour le contrôle des aliments, FAO Food and Nutrition Paper 68, Rome, 1998.

<sup>2</sup> Rapport de la Consultation d'experts FAO/IAEA sur les procédures pratiques de validation des performances des méthodes d'analyse des résidus de pesticides et de médicaments vétérinaires et des contaminants organiques à l'état de trace dans les aliments, (<http://www.iaea.org/trc>).

conclusions de ses analyses. La procédure intralaboratoire voit dans la performance des méthodes le produit direct des compétences du laboratoire qui fournit les services d'analyse.

4. Un rapport technique de l'Union internationale de chimie pure et appliquée, *Directives harmonisées pour la validation interne des méthodes d'analyse*, a été publié récemment sur la validation des méthodes en laboratoire unique<sup>3</sup>.

5. Les exigences pour la validation interne des méthodes aux fins du Codex ont été soumises à la considération du Comité du Codex sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage (CX/MAS 02/11).

6. Reconnaissant qu'au centre du problème se trouve l'acceptation mutuelle des données de laboratoire, la proposition convient que la méthode et les résultats obtenus doivent être envisagés dans le contexte de laboratoires agréés respectant les directives d'assurance qualité, d'essai d'aptitude et de validation interne des méthodes. L'acceptabilité des résultats obtenus des méthodes validées par un laboratoire unique peut être démontrée par étalonnage sur matériaux de référence, comparaison avec d'autres méthodes au rendement bien défini ou participation systématique à des essais d'aptitude. Les conditions suivantes ont été proposées pour ajout au Manuel de procédure, concernant l'établissement des critères d'admission des méthodes validées par un laboratoire unique :

- i. Aucune méthode validée par une étude interlaboratoires n'est appropriée.
- ii. Les méthodes validées par un laboratoire unique doivent répondre aux critères suivants :
  - la méthode est validée conformément à un protocole reconnu au plan international (le protocole UICPA susdit, par exemple) ;
  - l'utilisation de la méthode est intégrée dans un système d'assurance de la qualité en cours d'accréditation ;
  - une référence extérieure est donnée au moins par la participation systématique à des essais d'aptitude. Une référence extérieure supplémentaire peut être obtenue par étalonnage en utilisant des matériaux de référence et par comparaison des résultats avec ceux d'autres méthodes.

7. À l'occasion de sa 34<sup>e</sup> rencontre en avril 2002, le Comité du Codex sur les résidus de pesticides (CCPR) a avancé la considération des amendements proposés aux Directives sur les bonnes pratiques de laboratoire en matière d'analyse des résidus de pesticides à l'étape 5 de la procédure Codex (Alinorm 01/24, annexe VI). Ces amendements incorporent les concepts et recommandations élaborés par la Consultation d'experts AOAC/FAO/IAEA/UICPA de Miskolc en 1999, publiés par le Centre de formation de l'Agence internationale de l'énergie atomique au site Web <http://www.iaea.org/trc>. Ces travaux se poursuivront à la prochaine rencontre du CCPR.

## CRITÈRES DE VALIDATION DES MÉTHODES

8. Les spécifications d'évaluation des méthodes d'analyse définies précédemment par le CCRVDF au Volume 3 du Codex Alimentarius, Résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (2<sup>e</sup> édition, 1994) correspondent aux concepts élaborés dans le cadre de ces consultations plus récentes. Ainsi, l'ensemble des attributs ou propriétés considérés pour déterminer la pertinence d'une méthode d'analyse y est défini comme suit :

- i. spécificité
- ii. fidélité
- iii. erreur de justesse ou erreur systématique
- iv. exactitude
- v. limite de détection

<sup>3</sup> Thompson, M., Ellison, S.L.R. & Wood, R. (2002) *Pure Appl. Chem.* **74**:835-8552

- vi. sensibilité de la méthode
- vii. utilité pratique
- viii. applicabilité aux divers tissus et espèces
- ix. limite de dosage
- x. résultats faux positifs et faux négatifs

9. Le *Manuel de procédure* (12<sup>e</sup> édition, 2001) fait état des critères ci-dessous pour la sélection de méthodes principalement internationales de vérification des dispositions établies dans les normes Codex et normalement dérivées d'une étude interlaboratoires collaborative formelle :

- i. spécificité
- ii. exactitude
- iii. précision, répétabilité intralaboratoire et reproductibilité interlaboratoires
- iv. limite de détection
- v. sensibilité
- vi. utilité pratique et applicabilité dans des conditions normales de laboratoire
- vii. autres critères pouvant être choisis en fonction des besoins

10. Cette section du *Manuel de procédure* reconnaît aussi la nécessité éventuelle d'autres critères, tels les facteurs de récupération.

11. Le CCMAS considérera également l'inclusion des critères modifiés ou ajoutés (et des définitions proposées) à l'occasion de sa 24<sup>e</sup> session (CX/MAS 02/5), soit :

- précision (dérivant de données d'essais interlaboratoires)
- récupération
- sélectivité
- applicabilité
- limites de détection/détermination
- linéarité

12. Le CCMAS propose l'utilisation de ces critères pour la définition des méthodes en termes de caractéristiques de performance, de manière à permettre une comparaison utile entre les différentes approches méthodologiques. L'approche créerait en somme un environnement propice à l'acceptation de méthodes validées au sein d'un laboratoire unique.

13. La Consultation d'experts AOAC/FAO/IAEA/UICPA réunie à Miskolc pour l'examen des critères de validation interne d'une méthode d'analyse a pour sa part identifié les critères suivants :

- i. spécificité
- ii. amplitude analytique, y compris la récupération par l'entremise de l'extraction, du nettoyage, de la dérivatisation et du mesurage
- iii. fourchette d'étalonnage pour la détermination de l'analyte
- iv. limite de détection
- v. limite de dosage
- vi. limite de contrôle ou plus faible niveau calibré (LCL)
- vii. stabilité de l'analyte dans les échantillons prélevés
- viii. stabilité de l'analyte au cours de l'entreposage et de la transformation de l'échantillon
- ix. homogénéité de l'analyte dans les échantillons
- x. exactitude

- xi. justesse
- xii. précision
- xiii. sélectivité
- xiv. efficacité de l'extraction
- xv. pureté des réactifs et des matériaux

14. En outre, la Consultation d'experts a émis des directives précises concernant les expériences qui devraient être menées pour déterminer la conformité à ces critères dans les deux cas des résidus de pesticides et de médicaments vétérinaires dans les aliments.

15. Les critères élargis dont l'inclusion est recommandée dans le processus de validation concernent les questions qui seraient normalement résolues avant les essais collaboratifs ou interlaboratoires (stabilité de l'analyte, homogénéité de l'échantillon, spécifications relatives à la pureté des réactifs et des matériaux, etc.) et introduisent les considérations pratiques relatives aux spécifications de la fourchette d'étalonnage.

16. L'appui d'une LMR requiert une méthode quantitative performante au niveau du contrôle statistique en fonction de l'amplitude analytique qui délimite la LMR. Dans de telles circonstances, la performance de la méthode en fonction de l'amplitude analytique visée et l'intégration de points d'étalonnage (y compris du plus faible niveau de concentration ou LCL) peuvent s'avérer plus importantes que la caractérisation d'une limite de détection ou d'une limite de dosage.

17. La question de la sélectivité de la méthode (souvent appelée aussi « spécificité »), et plus particulièrement de la capacité d'une méthode à identifier l'analyte de manière univoque, est également perçue comme une activité nouvelle indispensable à l'établissement d'un nombre minimal de points d'identification qui assureront la fiabilité des résultats confirmatifs.

## **CATÉGORIES DES MÉTHODES CONSIDÉRÉES PAR LE CCRVDF**

18. Au volume 3 du Codex Alimentarius, *Résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments* (2<sup>e</sup> édition, 1994), trois catégories de méthodes d'analyse sont identifiées aux fins des programmes de contrôle des résidus et de la conformité avec les limites maximales de résidus du Codex (CAC/GL 16-1993 – III). Il s'agit des méthodes de niveau I, appelées à identifier et à quantifier l'analyte ; de niveau II, appelées à quantifier l'analyte, mais sans identification univoque ; et de niveau III, appelées à déterminer la présence ou l'absence d'une substance à un niveau considéré ou au-dessus de ce niveau. Les méthodes de niveau III sont généralement dites de dépistage ; celles de niveau II sont des méthodes de détermination, et celles de niveau I, des méthodes de confirmation. Ces niveaux I, II et III correspondent approximativement aux méthodes de type II, III et IV définies par le CCMAS.

19. Chaque catégorie exige la détermination de la conformité à un ensemble de critères de performance normalement élaborés par un essai interlaboratoires. Actuellement, le CCRVDF définit une méthode validée comme une méthode d'analyse ayant été soumise à une étude interlaboratoires pour en déterminer l'exactitude, la fiabilité, la reproductibilité et la robustesse (CAC/MISC 5 – 1993). En l'absence d'une telle information, il est actuellement admis qu'une validation interne menée selon les principes décrits ci-avant, sous évaluation collégiale appropriée, serait acceptable (Vienne 1998 ; Miskolc, 1999).

20. Un élément – la stabilité de l'échantillon dans des conditions normales d'entreposage – est commun à toutes les catégories de méthodes et doit être déterminé dans tous les cas. Cette propriété devrait être déterminée sur les échantillons prélevés, transportés et entreposés avant l'analyse sous conditions représentatives de la situation d'échantillons normalement traités par le laboratoire. Une fois cette information obtenue, il n'est pas nécessaire de répéter les expériences pour les différentes méthodes ou catégories de méthodes, sauf en cas de changement significatif des conditions associées à l'usage de la méthode.

## DÉFINITIONS

### Critères de validation minimum à considérer pour les méthodes de niveau III

21. Pour les méthodes de niveau III, dites de « dépistage », il faut démontrer la fiabilité statistique des performances de la méthode à la concentration considérée critique pour la détection de l'analyte (généralement une LMR). Les paramètres de performance à évaluer sont les suivants, pour chaque type de matériau échantillon (foie de bovins, muscle de bovins, muscle d'ovins, lait de bovins, etc.) à tester pour l'analyte cible :

- i. **Sélectivité**, définie dans CX/MAS 02/5 comme la « capacité d'une méthode à déterminer un ou des analyte(s) particulier(s) dans des mélanges ou des matrices sans interférences d'autres composants. La sélectivité est le terme recommandé en chimie analytique pour exprimer la capacité d'une méthode individuelle à déterminer le ou les analyte(s) en présence d'interférences d'autres composants. La sélectivité peut être graduée. L'utilisation du terme « spécificité » pour le même concept doit être découragée car elle crée souvent une confusion. »

Le programme AOAC Performance Tested Program™ pour kits d'essai exige la démonstration d'une sélectivité minimale de 90 % avec confiance de 95 % sur échantillon connu sans résidu testé pour l'analyte cible. Cette détermination se fait expérimentalement par l'essai d'un minimum de 30 matériaux échantillons sans résidu originaires d'au moins six sources différentes (soit au moins 5 réplicats pour chacune d'au moins 6 sources), dont tous devraient produire un résultat négatif. Trois résultats positifs ou plus sont signe d'échec de l'essai de sélectivité. Si un ou deux résultats sont positifs, il convient de répéter l'expérience. Deux résultats positifs seraient alors signe d'échec.

D'autres organismes et autorités ont défini d'autres exigences. Par exemple, l'OIE recommande 1.000 échantillons négatifs (voir [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00013.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00013.htm)), tandis que les méthodes de dépistage utilisées conformément à la directive UE 96/23/CE doivent être « validées et [avoir] un taux de faux conformes inférieur à 5 % (erreur  $\exists$ ) au niveau considéré » (voir la Décision de la Commission 2002/657/CE).

- ii. La **sensibilité** peut être définie, pour un essai de dépistage, comme la plus faible concentration à laquelle l'analyte cible peut être détecté avec fiabilité. Dans le programme AOAC Performance Tested Program™ pour kits d'essai, cette détermination se fait expérimentalement par l'essai d'un minimum de 30 matériaux échantillons sans résidu supplémentés de l'analyte à la concentration cible. Les matériaux échantillons doivent provenir d'au moins six sources différentes (soit un minimum de 5 réplicats de chacune d'au moins 6 sources), dont tous devraient produire un résultat positif sous supplémentation à la concentration cible. Trois résultats négatifs ou plus sont signe d'échec du test de sensibilité. Si un ou deux résultats sont négatifs, il convient de répéter l'expérience. Deux résultats négatifs seraient alors signe d'échec. Il convient, si possible, de répéter l'expérience sur un matériau porteur connu à la concentration cible.
- iii. La courbe **dose-réponse** de l'essai devrait être déterminée en conjonction avec le test de sensibilité. Elle requiert la sélection d'une plage de concentrations devant inclure la concentration cible pour la détection de non-conformité. Dans le programme AOAC Performance Tested Program™ pour kits d'essai, pour chaque concentration, un minimum de 30 matériaux échantillons sans résidu (six sources) sont supplémentés de l'analyte à la concentration requise et le pourcentage de résultats positifs est déterminé. La réponse à la concentration cible de contrôle de non-conformité et aux concentrations supérieures devrait être conforme au critère de sensibilité énoncé plus haut. Pour être exacte, une détermination de dose-réponse devrait inclure une supplémentation à un minimum de quatre concentrations uniformément espacées entre le « tout négatif » et le « tout positif », plus une concentration au moins 20 % supérieure à la concentration « tout positif », qui devrait être la concentration cible pour la détection de non-conformité.
- iv. La **robustesse** est définie dans le Manuel de procédure telle la « capacité d'un processus de mesure chimique de limiter les variations de résultats lorsqu'elle est soumise à de faibles variations liées à

l'environnement, aux procédures, aux laboratoires, au personnel, etc. » Un test de dépistage devrait être évalué par variation de facteurs appropriés, tels que quantité de réactif ajouté, durée ou température d'incubation et acuité visuelle du testeur à déterminer le point de virage, pour déterminer les points de contrôle critiques à identifier.

- v. Dans le cas des essais par kit, les **conditions d'entreposage** et la **durée de conservation** doivent être clairement indiquées.
  - vi. La **réactivité croisée**, définie comme la capacité de l'essai de produire une réponse positive avec des substances autres que l'analyte cible, y compris les métabolites ou d'autres substances éventuellement présentes dans les échantillons, doit être déterminée.
  - vii. Les **interférences** qui masquent, obscurcissent ou renforcent le signal des matériaux échantillons doivent être déterminées. Cette information peut être dérivée de l'analyse des matériaux échantillons blancs obtenus de six sources ou plus, utilisés dans les expériences de sélectivité et de sensibilité. Pour les essais relatifs à la détermination des résidus dans le lait, les interférences potentielles des bactéries types et cellules somatiques doivent être évaluées.
22. De plus, la stabilité de l'analyte, au niveau des étalons comme des échantillons, dans les conditions normales d'analyse requises par le test doit être évaluée.

### Critères de validation minimum à considérer pour les méthodes de niveau II

23. Pour les essais, de détermination, de niveau II, un ensemble plus vaste de paramètres relatifs à la fiabilité statistique du résultat quantitatif obtenu doit être évalué. Ces paramètres sont les suivants :

- i. L'**exactitude** (parfois appelée **justesse** ou **biais**) est définie dans le Manuel de procédure telle l'« étroitesse de l'accord entre le résultat obtenu et la valeur de référence acceptée ». [Le Manuel de procédure définit la **justesse** comme l'« étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée », et le **biais** comme la « différence entre l'espérance mathématique des résultats d'essai et la valeur de référence acceptée ». L'**exactitude** représente dès lors la capacité d'une méthode à produire un résultat conforme à la vraie concentration de l'analyte présent dans le matériau d'essai. L'exactitude d'une méthode peut être déterminée moyennant l'analyse d'un matériau de référence certifié, la comparaison des résultats avec ceux obtenus d'une autre méthode dont les paramètres de performance ont déjà été rigoureusement établis (soit une méthode de référence reconnue) ou, en l'absence de matériaux ou de méthodes de référence, par détermination de la récupération de l'analyte supplémenté dans un matériau échantillon à blanc connu.
- ii. La **récupération** est définie dans CX/MAS 02/5 comme la partie de la quantité d'analyte présente ou ajoutée au matériau d'essai extrait et présenté pour la mesure. Elle s'exprime généralement en tant que pourcentage de l'analyte expérimentalement déterminé après supplémentation du matériau échantillon à une concentration connue et devrait être évaluée aux concentrations couvrant l'amplitude analytique de la méthode.
- iii. La **courbe d'étalonnage** doit être déterminée pour évaluer la réponse du détecteur aux étalons. Les concentrations (au moins cinq, plus blanc) devraient couvrir la pleine amplitude d'analyse considérée et la courbe résultante devrait être exprimée statistiquement. Une réponse linéaire est généralement désirable et la courbe s'exprime statistiquement en termes de corrélation linéaire. Pour une méthode de détermination, le terme **sensibilité** associé est défini dans le Manuel de procédure telle la « variation de la réponse divisée par la variation correspondante de la concentration obtenue pour une courbe d'étalonnage, c'est-à-dire la pente,  $S_i$ , de la courbe d'étalonnage analytique ». Elle a aussi été qualifiée de « gradient de la fonction d'étalonnage<sup>3</sup> ».
- iv. La **fonction d'étalonnage** a trait à la réponse de l'analyte récupéré du matériau échantillon à différentes concentrations sur l'amplitude d'analyse considérée. Pour les analytes pour lesquels une LMR a été établie dans un matériau échantillon particulier (matrice), la réponse est généralement déterminée pour un matériau échantillon à blanc connu et pour un matériau échantillon à blanc supplémenté à chaque f de 0,5x, 1,0x et

2,0x la LMR (avec 6 sources différentes de matériaux à blanc). L'expérience de la fonction d'étalonnage peut être combinée à celle de récupération décrite plus haut. Elle revêt une importance particulière lorsque la présence de produits co-extraits de la matrice modifie la réponse de l'analyte par rapport aux étalons. Il est de plus en plus courant, dans les méthodes relatives aux résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments, de baser la détermination quantitative sur une courbe-étalon préparée par ajout d'étalon au matériau de matrice représentatif à blanc connu à une série de concentrations appropriées délimitant la valeur cible. L'usage d'une telle « courbe-étalon tissulaire » pour l'étalonnage incorpore une correction de récupération aux résultats obtenus.

- v. La **linéarité** est définie dans CX/MAS 02/4 comme « la capacité d'une méthode d'analyse, dans une certaine échelle, de donner une réponse ou des résultats proportionnels à la qualité de l'analyte à déterminer dans l'échantillon de laboratoire ». Cette proportionnalité est exprimée par une expression mathématique définie *a priori*. Les limites de linéarité sont les limites expérimentales de concentrations entre lesquelles un modèle de calibration linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu (généralement considéré comme égal à 1 %). Pour une méthode dans laquelle un matériau de matrice à blanc supplémenté sert au dosage, la linéarité est déterminée au départ des expériences de la fonction d'étalonnage décrites et représente l'expression statistique de la courbe obtenue pour l'analyse des matériaux échantillons supplémentés aux concentrations cibles qui délimitent la limite maximale de résidus. Elle est généralement déterminée par analyse de régression linéaire des données, pour autant qu'il y ait réponse linéaire.
- vi. La **limite de détection** (CX/MAS 02/4) est définie conventionnellement comme échantillon à blanc +3s, où s est l'écart type de l'indice de valeur de l'échantillon à blanc (définition UICPA). Elle est aussi définie comme « la plus petite quantité ou concentration d'analyte de l'échantillon d'essai susceptible de distinction fiable de zéro<sup>3</sup> ». Le signal moyen des échantillons à blanc et l'écart type se calculent généralement au départ d'au moins 20 déterminations. Cette approche peut produire une estimation optimiste de la limite de détection. Une autre approche consiste à calculer la limite de détection au départ de l'écart type  $s_{y/x}$  de l'analyse de régression linéaire de la courbe-étalon produite par l'expérience de la fonction d'étalonnage décrite plus haut<sup>4</sup>. La limite de détection se calcule ensuite au segment sur l'axe y de la courbe plus trois fois  $s_{y/x}$ . Cette approche produit une estimation plus prudente de la limite de détection.
- vii. La **limite de dosage**, telle que définie par l'UICPA, est la plus faible concentration d'analyte d'une matrice définie pouvant être déterminée avec la fidélité et l'exactitude requises<sup>5</sup>. Elle peut être exprimée comme 10 fois l'écart type de la valeur moyenne d'au moins 20 déterminations de la réponse de matériau de matrice en blanc connu. Pour les méthodes utilisées au soutien des limites maximales de résidus établies par la Commission du Codex Alimentarius, la limite de dosage devrait satisfaire aux critères de fidélité et d'exactitude (récupération) présentés au tableau 1. Étant donné toutefois que la limite de dosage d'une méthode peut être considérablement inférieure aux concentrations réelles surveillées pour la conformité à une limite maximale de résidus, la validation et l'application ultérieure de la méthode peuvent reposer sur le **plus faible niveau calibré** (LCL), soit généralement 0,5x la LMR. Dans le cadre d'un programme de réglementation, les limites de détection et de dosage représentent d'importants paramètres lorsque la méthode est destinée à l'estimation des expositions aux résidus et qu'il peut donc être utile de surveiller les résidus aux concentrations inférieures à la LMR. Aux fins de la surveillance de conformité aux LMR, il importe d'inclure un niveau LCL dans l'analyse pour démontrer adéquatement que la concentration de la LMR peut être déterminée avec fiabilité.
- viii. La **fidélité** est définie dans le Manuel de procédure telle l'« étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus sous les conditions stipulées ». Elle s'exprime en termes de **répétabilité** (intra-laboratoire) et de **reproductibilité** (inter-laboratoires). Pour une validation de méthode intra-laboratoire, la fidélité sous forme de répétabilité devrait être déterminées au moyen d'expériences menées sur plusieurs jours, à l'aide de différents lots de réactifs et, de préférence, par différents analystes. Une estimation initiale de la répétabilité peut être obtenue des données produites lors des essais de la

<sup>4</sup> Miller, J.C., & Miller, J.N. (1993) *Statistics for Analytical Chemistry, 3<sup>rd</sup> Edition*, Ellis Horwood Ltd., Chichester.

<sup>5</sup> *Pure & Appl. Chem.*, **68**: 1167-1193, 1996

fonction d'étalonnage décrits plus haut. D'autres données peuvent être obtenues des familiarisations de méthode ultérieures effectuées par d'autres analystes du laboratoire. La fidélité exprimée sous forme de reproductibilité requiert une approche interlaboratoires de la méthode. Le CCMAS a proposé que la fidélité soit dérivée des données d'essais collaboratifs plutôt que de considérations sur l'incertitude des mesures (CX/MAS 02/5).

- ix. La **spécificité** est définie dans le Manuel de procédure telle « la propriété d'une méthode de répondre exclusivement à la caractéristique ou l'analyte définis dans la norme du Codex. Le CCMAS avance toutefois (CX/MAS 02/5) que le terme **sélectivité**, défini tel « la capacité d'une méthode à déterminer un ou des analyte(s) particulier(s) dans des mélanges ou des matrices sans interférences d'autres composants » est « le terme recommandé en chimie analytique pour exprimer la capacité d'une méthode individuelle à déterminer le ou les analyte(s) en présence d'interférences d'autres composants ». Cette propriété devrait être déterminée par l'analyse de matériaux échantillons en blanc connus. Aucun interférent ne devrait être détecté lorsque la méthode est appliquée à des matériaux échantillons types représentatifs de ceux qui seraient soumis à l'analyse. La méthode devrait être capable de distinguer l'analyte en présence d'interférents potentiels (**sélectivité**), tels que d'autres médicaments dont on pourrait attendre la présence de résidus dans les échantillons types.
- x. Le Manuel de procédure définit la **robustesse** telle « la capacité d'un processus de mesure chimique de limiter les variations de résultats lorsqu'elle est soumise à de faibles variations liées à l'environnement, aux procédures, aux laboratoires, au personnel, etc. ».] Les essais de robustesse devraient être menés selon l'approche du plan factoriel pour déterminer les points de contrôle critiques éventuels<sup>6</sup>. Les facteurs types à inclure dans le plan seraient : variations de volumes ou concentrations de réactif, pH, temps et durée d'incubation ou de réaction, qualité des réactifs et lot ou source différente d'un réactif ou matériel chromatographique.
- xi. La **stabilité de l'analyte** des étalons et durant le traitement des échantillons devrait être évaluée. Cette stabilité dans les conditions types d'entreposage des échantillons avant l'analyse devrait aussi être déterminée, y compris toute période de retenue d'un échantillon dans l'attente d'une nouvelle analyse potentielle de confirmation.

**Tableau 1. Critères de performance actuels des méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (CAC/GL 16 – Codex Alimentarius, Volume 3)**

Concentration	CV(%) Répétabilité (intralaboratoire)	CV(%) Reproductibilité (interlaboratoires)	Fourchette acceptable d'exactitude, en % de récupération
≤1 µg/kg	#30	35	50–120
> 1 µg/kg ≤ 0,01 mg/kg	#30	30	60–120
> 0,01 mg/kg ≤ 0,1 mg/kg	#20	20	70–110
> 0,1 mg/kg	#15	15	80–110

24. Une version révisée de ces critères de performance est proposée dans le rapport de la Consultation de Miskolc<sup>2</sup>. Ces recommandations sont résumées au tableau 2.

<sup>6</sup> Youden, W.J., & Steiner, E.H. (1975) Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC International, Gaithersburg, VA.

**Tableau 2. Critères<sup>a</sup> de validation de méthode intralaboratoire pour l'analyse des résidus de pesticides et de médicaments vétérinaires dans les aliments, tels que recommandés par la Consultation Miskolc<sup>2</sup>**

Concentration	Répétabilité		Reproductibilité		Justesse <sup>b</sup> Plage de % récupération moyen
	CV <sub>A</sub> % <sup>c</sup>	CV <sub>L</sub> % <sup>d</sup>	CV <sub>A</sub> % <sup>c</sup>	CV <sub>L</sub> % <sup>d</sup>	
≤1 µg/kg	35	36	53	54	50–120
> 1 µg/kg ≤ 0,01 mg/kg	30	32	45	46	60–120
> 0,01 mg/kg ≤ 0,1 mg/kg	20	22	32	34	70–120
> 0,1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	15	18	23	25	70–110
> 1 mg/kg	10	14	16	19	70–110

- a) Pour les méthodes multi-résidus, les critères de performance quantitative de certains analytes ne peuvent pas nécessairement être strictement satisfaits. L'acceptabilité des données produites dans ces conditions dépendra de l'objectif des analyses. Pour le contrôle de conformité aux LMR, par exemple, les critères indiqués devraient être satisfaits dans la mesure autorisée par la technique, tandis que les données clairement inférieures à la LMR pourront être acceptables aux plus hauts niveaux d'incertitude.
- b) Ces plages de récupération conviennent aux méthodes multi-résidus. Des critères plus rigoureux peuvent être nécessaires dans certains cas (méthodes pour analytes simples ou résidus de médicaments vétérinaires, etc.) (Voir Tableau 1.)
- c) CV<sub>A</sub> : Coefficient de variation pour analyse sans traitement d'échantillon. Le paramètre peut être estimé au départ des essais effectués sur les matériaux de référence ou les portions d'analyse enrichies avant l'extraction. Un matériau de référence préparé au laboratoire peut être utilisé en l'absence de matériau de référence certifié.
- d) CV<sub>L</sub> : Coefficient de variation global d'un résultat de laboratoire, avec tolérance de 10 % de variabilité de traitement.

### Critères de validation minimum à considérer pour les méthodes de niveau I

25. Pour les méthodes de niveau I ou méthodes de confirmation, les critères de performance des méthodes de niveau II s'appliquent lorsque la méthode de niveau III est utilisée comme méthode de détermination. Il convient en outre de considérer les critères suivants dans l'établissement du rendement de la méthode pour l'identification de l'analyte :

- i. La **spécificité**, ou **sélectivité**, de la méthode doit être établie. Comme indiqué plus haut, bien que le *Manuel de procédure* et le *Volume 3 du Codex Alimentarius* fassent tous deux référence à la **spécificité** de la méthode, le CCMAS préconise l'emploi de **sélectivité** comme terme préféré en chimie analytique pour la désignation de cette propriété (CX/MAS 02/5). La méthode doit être capable de distinguer sans équivoque les blancs vrais des matériaux échantillons contenant l'analyte à des concentrations comprises dans l'amplitude d'analyse concernée. Pour les méthodes basées sur les déterminations spectrales, la propriété s'exprime généralement sous forme de présence d'un nombre minimum de traits caractéristiques dans les spectres obtenus pour un analyte dans un matériau échantillon par rapport au spectre d'un étalon authentique de l'analyte. Les méthodologies de confirmation les plus courantes au niveau de l'analyse de résidus organiques font appel à la spectrométrie de masse à faible résolution en combinaison avec la chromatographie en phase gazeuse ou la chromatographie liquide. Moins courantes, les autres techniques spectrales comprennent la spectrométrie infrarouge et la spectroscopie magnétique nucléaire. Un minimum de quatre points d'identification est généralement requis pour satisfaire aux critères de performance acceptés pour les méthodes réglementaires. Les méthodes faisant appel à la spectrométrie de masse haute résolution sont considérées produire une meilleure fiabilité par une mesure de masse plus précise que celle des techniques à faible résolution. Les critères de performance des méthodes de confirmation basées sur la

spectrométrie de masse CG/SM et CL/SM à faible résolution, tels que publiés récemment par la Commission européenne<sup>7</sup>, sont présentés au tableau 3.

**Tableau 3 : Exigences de performance pour les intensités ioniques relatives (échantillon par rapport à étalon) dans un ensemble de techniques de spectrométrie de masse<sup>7</sup>.**

Intensité relative (% du pic de base)	EI-CG-SM (relative)	CI-CG-SM, CG-SM/CL-SM, CL-SM (relative)
>50 %	∇10 %	∇ 20 %
> 20% à 50%	∇ 15 %	∇ 25 %
> 10% à 20%	∇ 20 %	∇ 30 %
< 10%	∇ 50 %	∇ 50 %

- ii. La **stabilité de l'analyte** en cours d'analyse doit être établie tant pour les étalons que pour l'analyte en présence de matériau échantillon, durant le traitement jusqu'à la conclusion de l'analyse. La stabilité de l'analyte dans les échantillons entreposés devrait être déterminée si les conditions d'entreposage étudiées pour les méthodes de détermination ou de dépistage n'incluent pas celles dans lesquelles les échantillons doivent être entreposés dans l'attente de l'analyse par la méthode de confirmation.
- iii. Un essai de **robustesse** peut être requis si la méthode diffère significativement de la méthode de détermination précédemment validée (si elle utilise des procédures d'extraction ou de dérivation distinctes de celles de la méthode de détermination).

26. Quelques exemples de techniques d'analyse aptes à satisfaire aux critères des méthodes de confirmation sont présentés sommairement au tableau 4.

**Tableau 4. Exemples de méthodes de détection convenant à l'analyse de confirmation des substances, telles que recommandées par la Consultation Miskolc<sup>2</sup>**

Méthode de détection	Critère
CL ou CG et spectrométrie de masse	si un nombre suffisant d'ions fragments est suivi
CL-DAD	si le spectre UV est caractéristique
CL - fluorescence	en combinaison avec d'autres techniques
2D CCM – (spectrophotométrie)	en combinaison avec d'autres techniques
CG-ECD, NPD, FPD	seulement si combiné avec au moins deux techniques de séparation <sup>a</sup>
Dérivation	s'il ne s'agit pas du premier choix de méthode
CL-immunogramme	en combinaison avec d'autres techniques
CL-UV/VIS (longueur d'onde unique)	en combinaison avec d'autres techniques

<sup>7</sup> Décision de la Commission 2002/657/CE, portant modalités d'application de la directive 96/23/CE en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats, *Journal officiel des Communautés européennes*, L221/8, 17 août 2002.

a) Autres systèmes chromatographiques (phases stationnaires et/ou mobiles de sélectivité différente) ou autres techniques.

### Considérations statistiques de la validation de méthode

27. La fiabilité d'une méthode à la concentration cible d'un matériau échantillon, surtout en cas d'essai de conformité à une limite maximale de résidus, est un aspect significatif de la validation de méthode et peut être exprimée statistiquement.

- a) L'**erreur alpha** ( $\forall$ ) exprime la probabilité que la vraie concentration d'analyte dans un matériau échantillon soit inférieure au seuil d'intervention défini (une limite maximale de résidus, par exemple) lorsque les résultats d'au moins une portion d'essai indiquent que la concentration excède cette valeur (faux positif). Les valeurs acceptées pour cette probabilité sont généralement de 1 à 5 %. La **limite de décision**,  $CC\forall$ , se définit comme la limite à laquelle la concentration de l'analyte véritablement présente dans un matériau échantillon excède cette concentration avec une probabilité d'erreur  $\forall$ , soit une certitude statistique de  $1-\forall$ . Pour la détermination de conformité à une LMR, la limite de décision serait généralement déterminée avec une certitude statistique de 95 %.
- b) L'**erreur bêta** ( $\exists$ ) exprime la probabilité que la vraie concentration d'analyte dans un matériau échantillon soit supérieure au seuil d'intervention lorsque les mesures effectuées sur au moins une portion d'essai indiquent que la concentration n'excède pas cette valeur (faux négatif). Les valeurs acceptées pour cette probabilité sont de 1 à 5 %. La **capacité de détection**,  $CC\exists$ , se définit comme la plus faible concentration vraie de l'analyte qui puisse être détectée, identifiée et quantifiée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur  $\exists$ , soit une certitude statistique de  $1-\exists$ . Pour la détermination de conformité à une LMR, la capacité de détection serait généralement déterminée avec une certitude statistique de 95 %.

### AUTRES CONSIDÉRATIONS

28. Lors de la sélection d'une méthode d'analyse destinée à un programme réglementaire d'assurance de conformité aux LMR établies par la Commission du Codex Alimentarius, les laboratoires doivent assurer que les performances des méthodes sélectionnées satisfont aux critères de performance énoncés au Tableau 1 et aux exigences de leurs clients. La norme ISO-17025 prévoit aussi que les laboratoires mettent à la disposition de leurs clients une information qui leur procure une estimation quant à l'imprécision de la mesure et le résultat estimé obtenu au moyen d'une méthode d'analyse. L'Union internationale de chimie pure et appliquée travaille à l'élaboration de directives internationales relatives à l'imprécision de la mesure. Dans l'attente du document final, toutefois, les expériences d'évaluation des critères décrits plus haut permettent aux laboratoires d'offrir à leurs clients une information statistique sur les performances des méthodes et la fiabilité des résultats.

29. Pour déterminer les exigences de validation de méthode intralaboratoire, on considérera les points suivants :
- Si une méthode sélectionnée pour mise en œuvre a été validée précédemment par une étude collaborative interlaboratoires, la pleine validation interne de la méthode n'est pas requise. Le laboratoire devra plutôt démontrer que les analystes appliquant la méthode peuvent satisfaire aux critères de performance définis par l'étude collaborative. Les données spécifiques absentes du rapport de l'étude collaborative, concernant la stabilité de l'échantillon et de l'analyte dans les conditions d'entreposage et d'analyse types du laboratoire et du programme réglementaire qu'il sert par exemple, peuvent exiger une expérimentation complémentaire. Les modifications, substitutions ou autres variances éventuelles par rapport à la méthode objet de l'étude collaborative devront être pleinement validées.
  - Les méthodes validées dans un ou plusieurs autres laboratoires avant le transfert à un nouveau laboratoire utilisateur ne requièrent pas de validation complémentaire si le nouvel utilisateur dispose d'un rapport de validation complet. Ici encore, comme dans le cas de la mise en œuvre d'une méthode ayant fait l'objet d'une étude collaborative, le laboratoire doit démontrer que ses analystes pourront satisfaire aux critères de performance établis par les utilisateurs originaux de la méthode, comme documenté dans le rapport de validation. Les données spécifiques absentes du rapport de validation,

concernant la stabilité de l'échantillon et de l'analyte dans les conditions d'entreposage et d'analyse types du laboratoire et du programme réglementaire qu'il sert par exemple, peuvent exiger une expérimentation complémentaire. De même, les modifications, substitutions ou autres variances éventuelles par rapport à la méthode originale validée devront être pleinement validées.

- iii. L'extension d'une méthode validée à d'autres matrices ou analytes doit être adéquatement validée, concernant, notamment, la stabilité de l'analyte dans la nouvelle matrice (ou la stabilité du nouvel analyte), l'absence d'interférences et la récupération, fidélité et linéarité de la réponse pour les méthodes de détermination.
- iv. Toutes les modifications et changements apportés à une méthode après sa validation initiale devront être validés et les résultats de cette validation devront être documentés.

30. La validation des méthodes marque un début ; il ne s'agit pas d'une fin en soi. Les laboratoires doivent disposer d'un système d'assurance de la qualité apte à démontrer que les méthodes et les analystes qui les utilisent continuent de satisfaire aux critères de performance établis durant le processus de validation. Leurs mesures d'assurance qualité internes en seront le témoin, y compris l'analyse répétée des échantillons, l'analyse d'échantillons de contrôle internes et la participation à des programmes d'aptitudes.

#### **RECOMMANDATIONS :**

31. Compte tenu des délibérations continues du CCMAS et du CCPR sur la validation intralaboratoire des méthodes, le groupe de travail ad hoc sur les Méthodes d'analyse et d'échantillonnage devrait considérer les recommandations suivantes :

- i. Que les nouvelles activités recommandées par la 13<sup>e</sup> session du CCRVDF concernant l'examen de CAC/GL 16-1993 et la préparation de l'avant-projet de directives révisées pour la mise en place d'un programme réglementaire pour le contrôle des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments, incluent l'examen et la révision de sa deuxième partie, Considérations générales sur les méthodes d'analyse pour le contrôle des résidus, concernant les critères de sélection de méthodes d'analyse susceptibles d'être intégrées à un programme réglementaire, pour qu'elle reflète l'approche de la validation interne. Cet amendement reposerait sur le contenu du présent document et des travaux en cours du CCMAS, du CCPR et de l'UICPA.
- ii. Que le Groupe de travail poursuive l'harmonisation des procédures pour l'identification de méthodes d'analyse utiles au soutien des LMR Codex avec celles élaborées par les CCMAS et CCPR.
- iii. Que le Groupe de travail recommande au Comité (CCRVDF) le principe élémentaire que tous détails complémentaires sur les directives associées aux méthodes d'analyse (tels qu'incorporés dans CAC/GL 16-1993 et dans toutes directives ultérieures) soient exprimés autant que possible sous forme de références aux normes et directives existantes élaborées sous les auspices d'organismes scientifiques internationaux tels que l'UICPA, Iso et AOAC International.
- iv. Au cas où il estimerait que des instructions plus détaillées doivent être fournies aux membres pour la mise en œuvre de procédures de validation de méthodes appropriées, le Comité est invité à considérer l'adoption d'un document de directives inspiré des recommandations de la Consultation d'experts FAO/IAEA de Miskolc concernant les critères et directives pratiques pour la validation de méthodes d'analyse applicables aux résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. (Un avant-projet a été mis à la disposition des membres à l'occasion de la 13<sup>e</sup> session. Les commentaires émis seront considérés par le Groupe de travail lors de sa rencontre antérieure à la 14<sup>e</sup> session. Ce document est le produit du groupe de rédaction (Australie, Canada, Costa Rica, Etats-Unis, France, Pays-Bas, COMISA) formé à la 12<sup>e</sup> session du CCRVDF. Il pourra être élaboré davantage et finalisé par le Groupe de travail si le Comité le juge nécessaire.)