

N° d'identification de l'application : **NF102**
Date d'édition : **10 mai 2017**
Date d'application : **1^{er} juin 2017**



Validation des méthodes alternatives d'analyse

Application à l'agroalimentaire

Protocole de validation des méthodes de détection et de quantification des résidus de médicaments vétérinaires dans les produits agroalimentaires

Exigences relatives aux études préliminaire et interlaboratoires menées par un Laboratoire expert

Révision No. 01 – Adoptée par AFNOR Certification le 1^{er} juin 2017
(suite à l'approbation du Bureau Technique concerné)

Objet

Ce document définit :

1. Les conditions expérimentales à appliquer par le Laboratoire expert pour la validation des méthodes de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques dans les aliments, en application des Règles de certification de la marque NF Validation (NF102).
2. Le modèle de rapport d'étude préliminaire et de rapport d'étude interlaboratoires auquel doit se conformer le Laboratoire expert.
3. Les modalités de traitements des modifications / extensions de validation en cas de demande du fabricant, et des reconductions de validation.

SOMMAIRE

OBJET	2
A. INTRODUCTION	6
B. DOMAINE D'APPLICATION.....	6
C. RESPECT DES PRESENTES EXIGENCES	6
D. DEFINITIONS.....	6
E. CADRE DE LA DEMANDE DE CERTIFICATION.....	9
F. CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	10
I. Organisation de l'étude.....	10
II. Préparation des solutions mères d'antibiotiques.....	10
III. Étude préliminaire.....	10
1. Caractérisation des performances de la méthode	10
1.1 Matrices blanches.....	10
1.1.1 Matrices liquides	10
1.1.2 Matrices solides	12
1.2 Méthodes qualitatives.....	12
1.2.1 Capacités de détection (CC β)	12
1.2.1.1 Choix des antibiotiques à valider	12
1.2.1.2 Choix des concentrations cibles	13
1.2.1.3 Nombre d'échantillons à analyser pour déterminer un CC β	16
1.2.1.4 Protocole de détermination du CC β	16
1.2.1.5 Exploitation et interprétation des résultats	17
1.2.1.6 Conclusions	18
1.2.2 Taux de faux positifs / Réactions croisées.....	18
1.2.2.1 Protocole de détermination du taux de faux-positifs	18
1.2.2.2 Protocole de détermination des réactions croisées.....	18
1.2.2.3 Exploitation et interprétation des résultats	19
1.2.3 Applicabilité	19
1.2.3.1 Prérequis	19
1.2.3.2 Première approche	20
1.2.3.3 Deuxième approche	21
1.2.3.4 Présentation des résultats	22
1.2.4 Robustesse	22
1.2.4.1 Objectifs de l'étude de robustesse.....	22
1.2.4.2 Choix des facteurs qui peuvent être testés (liste non exhaustive).....	22
1.2.4.3 Choix des tolérances à tester	24
1.2.4.4 Choix des substances à tester	24
1.2.4.5 Nombre d'échantillons à analyser.....	24

1.2.4.6	Protocole d'étude de la robustesse	24
1.2.4.7	Exploitation et interprétation des résultats	25
1.2.4.8	Conclusions	25
1.3	Méthodes quantitatives	26
1.3.1	Réactions croisées.....	26
1.3.2	Justesse et fidélité.....	26
1.3.2.1	Choix des substances à tester pour la justesse et la fidélité	26
1.3.2.2	Approche individuelle	26
1.3.2.3	Approche globale : Le profil d'exactitude	28
2.	Praticabilité du kit	28
3.	Conclusions sur les données de l'étude préliminaire	30
IV.	Etude interlaboratoires	31
1.	Organisation de l'étude interlaboratoires.....	31
1.1	Choix des laboratoires collaborateurs	31
1.2	Choix des matrices à tester	31
1.3	Choix des antibiotiques	31
1.4	Choix des concentrations	32
1.5	Nombre d'échantillons à envoyer à chaque laboratoire	32
1.6	Préparation et envoi des échantillons	32
1.6.1	Origine des matériaux.....	32
1.6.2	Préparation des matériaux.....	32
1.6.2.1	Préparation des échantillons, codification.....	33
1.6.2.2	Vérification des matériaux	33
1.6.3	Préparation de témoins négatifs et positifs	33
1.6.4	Intervenants extérieurs.....	34
1.6.5	Envoi des matériaux.....	34
1.6.6	Communication avec les participants	34
1.6.7	Analyses par les participants.....	34
2.	Calculs et interprétation des résultats de l'étude interlaboratoires	34
2.1	Cas d'exclusion des laboratoires.....	34
2.2	Analyse de l'étude interlaboratoires pour une méthode qualitative	35
2.2.1	Spécificité et sensibilité.....	35
2.2.2	Répétabilité.....	36
2.2.3	Reproductibilité interlaboratoires.....	36
2.3	Analyse de l'étude interlaboratoires pour une méthode quantitative.....	37
2.3.1	Spécificité et sensibilité.....	37
2.3.2	Répétabilité.....	37
2.3.3	Reproductibilité interlaboratoires.....	38
2.3.4	Justesse	39
2.3.5	Profil d'exactitude.....	39
G.	MODELE DE RAPPORTS D'ETUDE ET DE SYNTHESE	40

H.	TRAITEMENTS DES MODIFICATIONS/EXTENSIONS.....	41
I.	CAS DE LA RECONDUCTION.....	41
J.	REFERENCES	42
	Annexe 1. Liste des antibiotiques à valider en fonction du type de test et des antibiotiques ciblés par le test. ..	43
	Annexe 2. Tableau pour la préparation et la conservation des solutions mères d'antibiotiques (à 0.5 mg/mL)..	56
	Annexe 3. Sélection d'une à 2 molécules représentatives par famille d'antibiotiques.	58
	Annexe 4. Réalisation et interprétation d'un plan expérimental pour l'étude de robustesse.	60
	Annexe 5. Approche globale du profil d'exactitude.	62
	Annexe 6. Modèle de rapport pour l'étude préliminaire et pour l'étude interlaboratoires.	64

A. Introduction

Le présent document décrit les modalités de détermination des caractéristiques de performances qui doivent être vérifiées pour valider une méthode de dépistage (qualitative, quantitative).

L'objectif est de caractériser la méthode de dépistage, et de comparer ses performances à des critères de performances attendus pour déterminer la validité de la méthode.

Cette approche critères est issue de la décision européenne 2002/657 (2002) et du guide de validation Européen des méthodes de dépistage (Crl 2010).

B. Domaine d'application

Ce document établit le principe général ainsi que le protocole technique de validation des méthodes de dépistage dans le domaine de la détection et de la quantification des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires issues des animaux.

La validation d'une méthode porte simultanément sur le mode opératoire préconisé par le fabricant, sur les produits et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la méthode, et sur un domaine d'application précisé.

C. Respect des présentes exigences

Le Laboratoire expert doit présenter dans ses projets d'études tous les écarts éventuels par rapport au protocole du test de dépistage proposé à la validation par le fabricant et/ou par rapport aux exigences du présent document. Si aucun écart n'est mentionné, le respect de ces éléments est implicite et sous sa responsabilité.

D. Définitions

- **Analyte** : la substance qui doit être détectée, identifiée et/ou mesurée ou les dérivés produits pendant son analyse.
- **Applicabilité** : utilisation potentielle de la même méthode pour différentes matrices.
- **Capacité de détection (CC β)** : la plus petite teneur en substance qui peut être détectée, identifiée et/ou mesurée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur β .
- **Caractéristique de performance** : qualité fonctionnelle qui peut être attribuée à une méthode d'analyse. Il s'agit notamment de la spécificité, la capacité de détection et la fidélité.
- **Critère de performance** : exigences en matière de caractéristique de performances à partir desquelles il est possible de juger qu'une méthode d'analyse convient pour l'objectif poursuivi et donne des résultats fiables.
- **Concentration cible ou Niveau d'intérêt** : la concentration qui donnera un résultat positif (potentiellement non-conforme) avec le test de dépistage. Pour les substances autorisées, la concentration cible devrait être inférieure ou égale à la Limite Maximale de Résidus (LMR). Pour une substance interdite, elle devrait être inférieure ou égale à la Limite Minimale de Performance Requise (LMPR). Plus la concentration cible est inférieure à la limite réglementaire, moins il y a de risques

d'obtenir un résultat faux-conforme pour les échantillons contenant un résidu à la limite réglementaire.

- **Exactitude:** étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée (valeur du matériau de référence certifié ou valeur de supplémentation). Elle est déterminée par la combinaison de la justesse et la fidélité.
- **Faux-conforme :** échantillon qui contient une molécule ciblée par le test, à une concentration supérieure à la limite réglementaire choisie dans le critère de performance (LMR, LMPR) et qui donne un résultat négatif avec la méthode à valider.
- **Faux non-conforme :** échantillon blanc ou qui contient une molécule ciblée par le test à une concentration inférieure à la limite réglementaire choisie dans le critère de performance (LMR, LMPR) ou qui contient une molécule qui ne devrait pas être détectée par le test et qui donne un résultat positif avec la méthode à valider.
- **Faux négatif (FN) :** échantillon qui contient une molécule ciblée par le test, à une concentration supérieure au CC β et qui donne un résultat négatif avec la méthode à valider.
- **Faux positif (FP) :** échantillon blanc ou qui contient une molécule ciblée par le test à une concentration inférieure au CC β ou qui contient une molécule qui ne devrait pas être détectée par le test et qui donne un résultat positif avec la méthode à valider.
- **Fidélité :** Etroitesse de l'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité.
- **Justesse:** étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée.
- **Laboratoire indépendant :** Laboratoire différent de celui du fabricant et susceptible de fournir des données alimentant l'étude préliminaire et l'étude interlaboratoires.
- **Laboratoire expert :** Organisme d'essai indépendant du fabricant du test de dépistage à valider, qualifié par AFNOR Certification pour le domaine considéré, en application des règles de certification NF102 en vigueur. Choisi directement par le fabricant dans la liste des laboratoires qualifiés fournie par AFNOR Certification, il est chargé de mener et/ou superviser l'étude de validation dans le respect des exigences du présent document.
- **Limite autorisée :** Limite Maximale de Résidu (LMR) (par ex. en Europe, règlement No 470/2009EC (2009) ou autre tolérance maximale applicable aux substances et établies dans la législation de référence, telles que la Limite Minimale de Performance Requise (LMPR) (par ex., en Europe, décision 2002/657/EC (2002)).
- **Limite Maximale de Résidu (LMR) :** La LMR est la concentration maximale d'un résidu d'une substance pharmacologiquement active qui peut être autorisée dans les aliments d'origine animale. Pour protéger la santé publique, les limites maximales de résidus sont fixées, compte tenu des risques toxicologiques, de la contamination environnementale ainsi que des effets microbiologiques et pharmacologiques des résidus.
- **Limite Minimale de Performance Requise (LMPR) :** teneur minimale en analyte dans un échantillon qui doit être au moins détectée et confirmée. Les limites minimales de performances requises (LMPR) sont applicables aux méthodes d'analyse à utiliser pour les substances pour

lesquelles aucune limite autorisée n'a été définie et, en particulier, pour les substances dont l'utilisation n'est pas autorisée ou est spécifiquement interdite dans la Communauté Européenne. La LMPR est un paramètre de performance analytique, c'est-à-dire que toute méthode de dépistage dédiée à la détection de cet antibiotique interdit doit être capable systématiquement de détecter l'analyte à ce niveau et au-dessus.

- **Matrice** : tous les constituants de l'échantillon à tester, excepté l'analyte.
- **Méthode qualitative** : méthode analytique qui détecte une substance sur la base de ses propriétés chimiques, biologiques ou physiques.
- **Méthode quantitative** : méthode analytique qui détermine la quantité ou fraction de masse d'une substance de sorte à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique avec les unités appropriées.
- **Matériau supplémenté** : échantillon enrichi avec une quantité connue d'analyte à détecter.
- **Méthode de dépistage** : méthode servant à détecter la présence d'une substance ou d'une classe de substances aux niveaux considérés. Ces méthodes sont appliquées pour passer au crible de nombreux échantillons en vue de détecter des résultats non conformes potentiels.
- **Réactions croisées** : Réponse analytique de la méthode aux analogues de l'analyte cible, à ses métabolites, ou à d'autres composés qui peuvent être présents dans la matrice.
- **Répétabilité** : degré de concordance entre les résultats d'analyses indépendantes, utilisant la même méthode, avec une fraction à analyser identique et dans les mêmes conditions.
- **Reproductibilité** : degré de concordance entre les résultats d'analyses indépendantes, utilisant la même méthode, avec une fraction à analyser identique, mais dans des conditions différentes (laboratoires, opérateurs, équipements différents).
- **Réponse analytique** : Le phénomène observé à la fin du processus analytique, en relation avec des analytes présents ou non dans la matrice.
- **Robustesse** : sensibilité d'une méthode d'analyse aux variations des conditions expérimentales, qui peut s'exprimer par la liste des échantillons, des analytes, des conditions de stockage, des conditions d'environnement et/ou de préparation de l'échantillon pour lesquels la méthode peut être appliquée telle quelle ou moyennant certaines modifications mineures. Pour toutes les conditions expérimentales qui, dans la pratique, sont sujettes à des variations (par ex. stabilité des réactifs, composition de l'échantillon, pH, température), toutes les variations qui pourraient affecter le résultat analytique doivent être indiquées.
- **Spécificité** : capacité d'une méthode à distinguer l'analyte mesuré d'autres substances (par ex. isomères, métabolites, produits de dégradation, substances endogènes, constituants de matrice, etc.).
- **Test à large spectre** : il s'agit d'un test qui permet de détecter plusieurs familles d'antibiotiques, sans identification de la famille d'antibiotiques détectée.
- **Test à spectre d'action spécifique** : il s'agit d'un test avec identification de la famille d'antibiotiques ou d'un antibiotique spécifique.

E. Cadre de la demande de certification

Le dépôt de dossier de certification doit être réalisé par le demandeur auprès d'AFNOR Certification, dans les conditions et délais fixés par les règles de certification NF102 (cf. § 4.2).

La demande doit être précisément décrite par le demandeur. Les éléments d'information ci-après sont à fournir sur le test à valider pour préciser le domaine d'application soumis à la certification. Ils sont à faire figurer dans le projet d'étude préliminaire présenté par le Laboratoire expert, avant l'organisation de l'étude préliminaire.

- Principe du test, principe de lecture et d'interprétation du test
- Type de méthode (qualitative ou quantitative)
- Formats du test (s'il en existe plusieurs) (par ex. ampoules/microplaques)
- Matrices : espèces animales, types de lait (lait de mélange, individuel, grand mélange, lait cru, lait reconstitué, UHT, etc.), avec ou sans conservateur, etc.
- Spectre d'action du test : liste d'antibiotiques et limites de détection attendues, large spectre ou spécifique
- Protocole(s) détaillé(s) : si des modifications mineures doivent être apportées à la méthode en fonction de la matrice, elles doivent être annoncées dans le protocole (Notice du fournisseur de kit)
- Analyses en simple, en double ou autres répétitions. Si le protocole impose des analyses en double, le protocole doit préciser comment procéder en cas de résultats discordants.
- Robustesse : Fournir les paramètres influençant le protocole d'essai, ainsi que les limites de tolérance applicables sur ces paramètres.

Dans une même demande, il peut y avoir plusieurs formats du même produit et plusieurs matrices, à condition que le protocole soit précisément décrit pour chaque cas.

- Si les formats / matrices sont annoncés par le fabricant comme non équivalents en termes de capacités de détection, ils feront l'objet d'une étude de validation complète.
- Si les formats / matrices sont annoncés par le fabricant comme équivalents en termes de capacités de détection :
 - o Soit les caractéristiques de performance (CC β /spécificité) seront déterminées pour un mélange de formats/matrices.
 - o Soit un des formats / matrices sera validé intégralement, et une étude d'applicabilité sera réalisée sur les autres formats / matrices.
 - Si l'applicabilité est prouvée pour les autres formats / matrices, ils seront considérés comme équivalents.
 - Si les résultats montrent que les autres formats / matrices ne sont pas équivalents, alors il faudra faire une étude de validation complète des autres formats / matrices.

Note : Acceptation des résultats externes.

Il est possible d'accepter des résultats externes obtenus antérieurement dans le cadre d'une autre étude de validation par un laboratoire indépendant. Il revient au Bureau Technique de juger, sur la base des

éléments fournis par le Laboratoire expert, de la recevabilité des protocoles de validation utilisés et d'accepter tout ou partie des données.

F. Conditions expérimentales

I. Organisation de l'étude

L'étude de validation est conduite par un Laboratoire expert et comporte :

- Une étude préliminaire qui fournit la caractérisation de la méthode,
- Une étude interlaboratoires qui permet de déterminer la fidélité de la méthode dans des conditions de répétabilité et reproductibilité données,
- Une exploitation et une interprétation des résultats, par rapport aux critères de performance attendus.

L'instruction de l'étude de validation (projets et résultats) est réalisée par le Bureau Technique, selon les modalités définies dans les règles de certification NF102 (§ 4.3).

II. Préparation des solutions mères d'antibiotiques

Il faut calculer la teneur en principe actif contenue dans le standard, à partir du certificat d'analyse du standard (joint par le fournisseur), en tenant compte de différents paramètres (par ex. pureté, teneur en eau, sels, etc.).

Les solutions mères d'antibiotiques peuvent présenter des stabilités différentes en fonction des molécules d'antibiotiques, du mode de préparation (solvant) et du mode de stockage. Le Laboratoire expert devra se référer aux données du tableau en [annexe 2](#) pour préparer et conserver ses solutions mères. De plus, le Laboratoire expert pourra se référer à des études de stabilité en solution et dans la matrice (lait et muscle) réalisées par une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) (données publiées dans un journal scientifique international) (Gaugain et al. 2013). Les données de ce tableau ont été obtenues pour des solutions mères à 0,5 mg/mL, soit par exemple en pesant 25 mg de substance active dans une fiole de 50 mL.

III. Étude préliminaire

1. Caractérisation des performances de la méthode

1.1 Matrices blanches

1.1.1 Matrices liquides

Cas particulier du lait cru :

Cahier des charges pour le producteur de lait (pour la sélection d'un lait standard à utiliser dans l'étude de validation) :

- L'étude de validation devra se faire uniquement sur du lait cru frais (à utiliser dans les 36 heures après le prélèvement, à conserver au froid entre 0 et 6°C).
- Du lait de mélange d'au moins 10 animaux.

- Aucun traitement au moins 8 semaines avant la traite.
- Demander au producteur de lait son historique sur 2 mois pour la composition et la qualité et sur 6 mois pour les antibiotiques. Voir si les résultats du producteur sont stables et comparer aux fourchettes du tableau 1 (critères de sélection d'un lait standard). Les valeurs obtenues pour ce lait doivent rester dans les fourchettes acceptables.
- Demander au producteur d'alerter le Laboratoire expert en cas d'utilisation d'un traitement pendant la période où il fournit le lait pour l'étude de validation.
- Lait frais standard normal pour sa composition, selon le tableau 1 (cellules, bactéries, matières grasses (MG), matières protéiques (MP), pH).

Tableau 1. Critères de sélection d'un lait standard.

		Cellules	Germes	MG	MP	pH	Antibiotiques	Période de lactation
Vache	Valeur cible	< 200000	<30000	40	33	6,7-6,8	Absence	Entre 30 et 270 jours après vêlage
	Fourchette acceptable	< 400000	< 100000	35-45	30-36	6,6-6,9		
Chèvre	Valeur cible	< 2000000	<60000	38	34	6,7-6,8	Absence	Entre 20 et 150 jours après vêlage
	Fourchette acceptable			30-50	28-40	6,6-6,9		
Brebis	Valeur cible	< 2000000	<60000	70	55	6,7-6,8	Absence	Entre 20 et 150 jours après vêlage
	Fourchette acceptable			50-90	40-70	6,6-6,9		

Valeur cible : La valeur cible sert d'indication pour sélectionner le (ou les) producteur(s).

Fourchette acceptable : La fourchette acceptable est un intervalle en dehors duquel on invalidera les résultats obtenus avec ce lait.

Une analyse de la composition et de la qualité du lait (cellules, bactéries, matières grasses, matières protéiques, pH) sera réalisée en début d'étude et une autre en fin d'études pour contrôler le lait fourni par le (ou les) producteur(s).

Les supplémentations devront se faire au jour le jour, sur du lait frais.

Chaque jour de validation, un échantillon de lait (matrice blanche) doit être conservé et stocké à -25°C ± 5°C. En cas de résultats douteux pendant l'étude de validation (résultats faux-positifs, CC β plus bas que le CC β annoncé par le fabricant), le Laboratoire expert décongèlera l'échantillon pour une analyse de dépistage, voire une analyse de confirmation.

1.1.2 Matrices solides

Cahier des charges pour les matrices solides :

- Les matrices solides pourront être achetées dans le commerce (par ex. supermarchés, artisans, autres) ou chez un sous-traitant garantissant l'absence de résidus d'antibiotiques dans ces matrices, ou encore être issues d'animaux élevés au Laboratoire expert.
- L'étude de validation pourra se faire sur des matrices solides préalablement congelées pour des raisons de praticabilité des études de validation, sauf si le protocole du kit demande expressément d'analyser des matrices non congelées.
- Les supplémentations devront donc se faire au jour le jour.

Chaque jour de validation, un échantillon de chaque lot de matrice blanche utilisé doit être conservé et stocké à $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. En cas de résultats douteux pendant l'étude de validation (résultats faux-positifs, $\text{CC}\beta$ plus bas que le $\text{CC}\beta$ annoncé par le fabricant), le Laboratoire expert décongèlera l'échantillon pour une analyse de dépistage, voire une analyse de confirmation.

1.2 Méthodes qualitatives

Une méthode qualitative est caractérisée par sa (ou ses) capacité(s) de détection, sa spécificité, son applicabilité et sa robustesse.

1.2.1 Capacités de détection ($\text{CC}\beta$)

1.2.1.1 Choix des antibiotiques à valider

Deux cas se présentent :

1. Le test cible spécifiquement un ou plusieurs antibiotiques distinctement : La capacité de détection du kit sera déterminée uniquement pour le ou les antibiotique(s) spécifiquement ciblés.
2. Le test cible une ou plusieurs familles d'antibiotiques de manière différenciée (test à spectre d'action spécifique) ou non (test à large spectre) : La capacité de détection sera alors déterminée en se référant, chaque fois que pertinent, aux tableaux en [annexe 1](#) qui donnent les listes des antibiotiques à utiliser a minima en fonction des matrices d'intérêt, du type de test et de la famille de molécules.

Note :

- *Ces listes devront être remises à jour régulièrement par le Bureau Technique (par ex. pour tenir compte de changements dans l'usage des médicaments vétérinaires).*
- *Le Laboratoire expert devra utiliser, pour l'étude de validation, a minima les antibiotiques des listes de l'[annexe 1](#) et éventuellement proposer des antibiotiques supplémentaires en fonction de la demande du fabricant.*
- Pour les denrées alimentaires pour lesquelles aucune liste n'est disponible en [annexe 1](#), le Bureau Technique étudiera au cas par cas les propositions de molécules à valider par le Laboratoire expert.

1.2.1.2 Choix des concentrations cibles

Chaque antibiotique choisi sera testé à au moins une concentration cible pour chaque matrice, en vue de déterminer le CC β . Le choix de la concentration cible sera basé sur la limite autorisée de l'antibiotique concerné dans la matrice d'intérêt, sur la (ou les) capacité (s) de détection annoncée(s) par le fournisseur de kits et/ou sur des études précédentes réalisées dans d'autres laboratoires si elles existent.

Le choix de la concentration cible doit permettre de s'approcher au plus près des performances réelles de la méthode de dépistage.

La concentration cible sera déterminée de la manière suivante :

3. Si le fabricant annonce un CC β , alors la concentration cible à tester sera égale au CC β annoncé par le fournisseur. Pour un CC β annoncé supérieur à plus de 20 % de la LMR, il faudra tester uniquement le CC β annoncé par le fournisseur (schéma 1).
4. Si le fabricant n'annonce pas de CC β pour l'antibiotique d'intérêt, il faudra réaliser des essais préliminaires d'évaluation (**schéma 2**). Alors la concentration cible à tester sera égale à la limite autorisée et sera à tester 5 fois. Si le CC β s'avère supérieur à la limite autorisée, il faudra évaluer le CC β jusqu'à 5 fois la limite autorisée seulement, sauf si le fournisseur demande d'évaluer le CC β précisément, même au-dessus de 5 fois la limite autorisée.

Dans les 2 cas, si pour la concentration cible testée, le pourcentage de résultats positifs obtenu est supérieur à 95 %, le CC β est au moins égal à cette concentration. Cela signifie qu'on peut tester une concentration plus basse afin de s'approcher au plus près du CC β réel.

Inversement, un pourcentage de résultats positifs inférieur à 95 % obtenu à cette concentration signifie qu'on doit tester une concentration plus élevée.

Les 2 démarches sont expliquées pas à pas dans chacun des schémas 1 et 2 présentés ci-après.

Schémas récapitulatifs de la démarche.

Schéma 1. Cas où le CC β est annoncé par le fabricant.

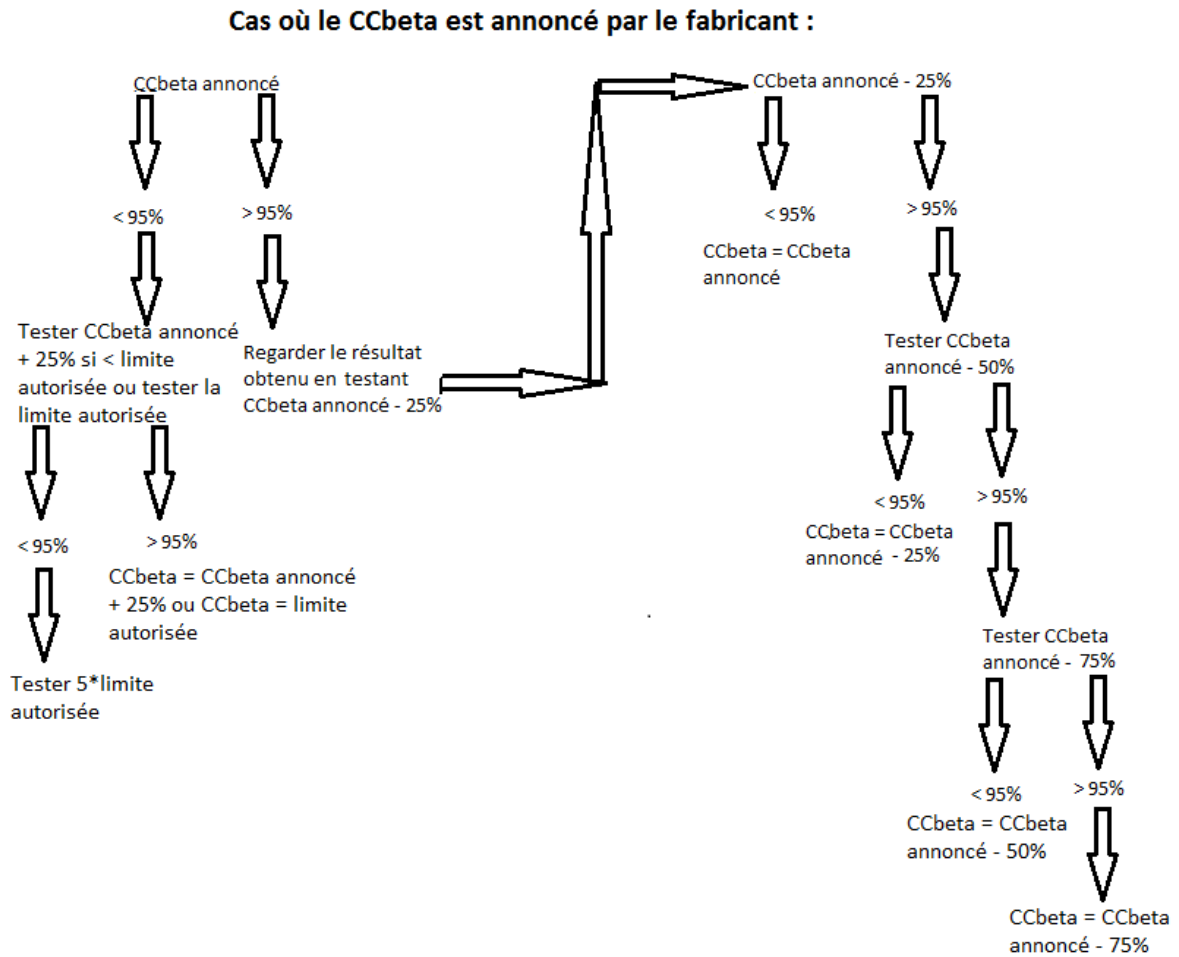
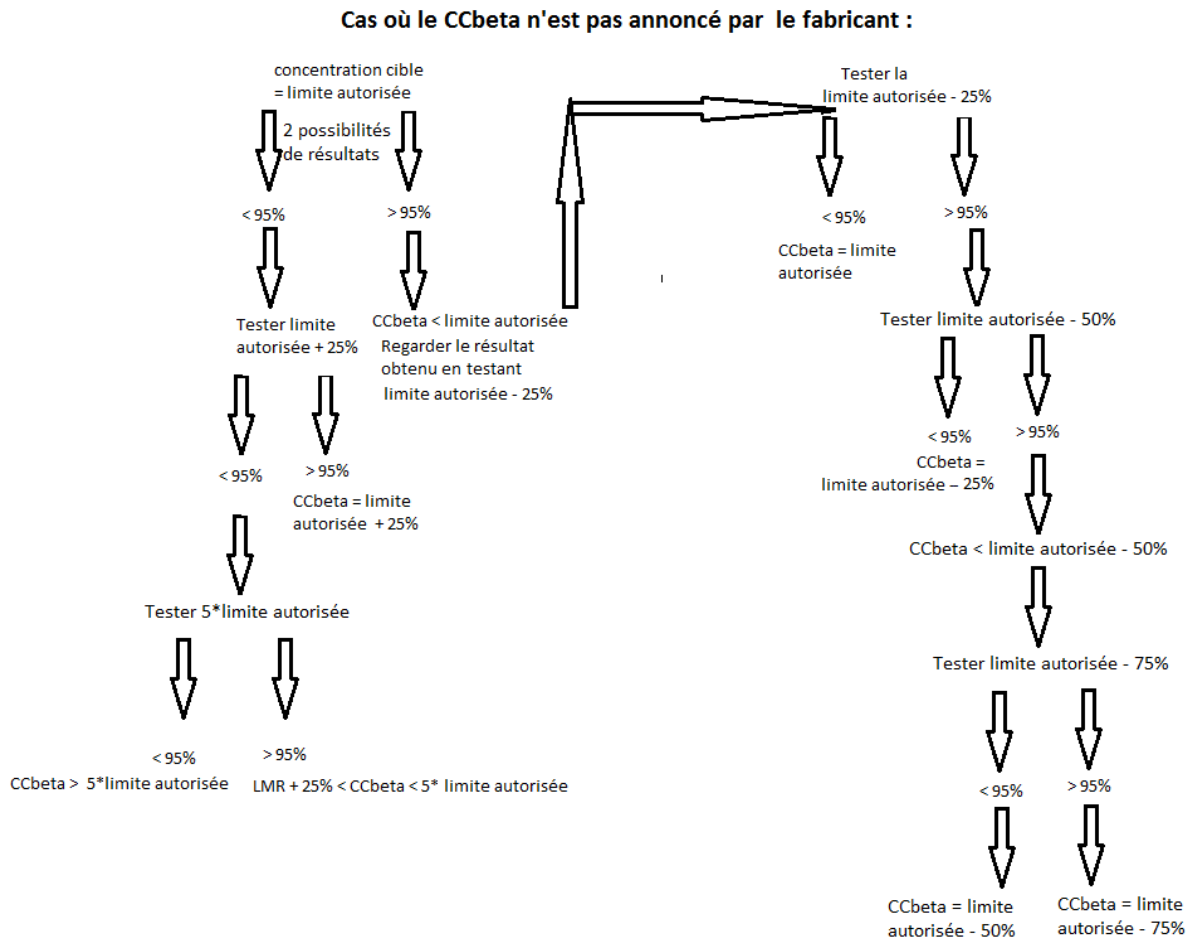


Schéma 2. Cas où le CCβ n'est pas annoncé par le fabricant.



1.2.1.3 Nombre d'échantillons à analyser pour déterminer un CCB

Selon la décision CE/2002/657 (2002), au moins 20 tests doivent être effectués pour au moins un niveau de concentration en vue d'obtenir une base fiable pour cette détermination. Dans ce cas, la capacité de détection de la méthode est égale au niveau de concentration où il ne reste que 5 % ou moins de résultats négatifs, soit au maximum 1 négatif sur 20 échantillons chargés.

Le nombre d'échantillons pour l'étude de validation pour chaque substance dépend du degré de confiance statistique requis dans le résultat, et de la relation entre la concentration cible de dépistage et la limite réglementaire. Plus la concentration cible est basse par rapport à la limite autorisée, plus le nombre d'échantillons à analyser peut être réduit. En effet la même confiance statistique que le test va pouvoir détecter le résidu à la limite autorisée sera obtenu avec moins d'échantillons. Les différents cas sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Nombre d'échantillons à tester pour l'étude validation, en fonction des cas.

Valeur de la concentration cible	Nombre d'échantillons à tester	Critère de performance Nombre de résultats négatifs autorisés au maximum
> Limite autorisée	20	1
Proche de la limite autorisée (10 % en dessous de la limite autorisée)	60	3
Entre 50 % et 90 % de la limite autorisée	40	2
≤ Moitié de la limite autorisée	20	1

Parmi les n échantillons à analyser, il s'agit soit de n échantillons de la même matrice, soit de n échantillons constitués d'un mélange de différentes matrices (cf. 2^{ème} approche de l'applicabilité).

Ces études peuvent être entreprises par étapes séquentielles : les 10 premiers échantillons supplémentés sont testés, et si plus d'un échantillon supplémenté donne un résultat négatif, la validation peut être abandonnée pour cette concentration. Alors la concentration cible de dépistage doit être augmentée et l'exercice répété.

1.2.1.4 Protocole de détermination du CCB

Il est obligatoire d'utiliser au moins 3 lots de réactifs lors du test de la capacité de détection, si possible dont un utilisé peu de temps après la production et un juste avant la date d'expiration. Dans ce cas, il n'y a plus besoin de tests supplémentaires pour évaluer les différences entre lots et l'âge des lots au chapitre robustesse.

La capacité de détection doit être déterminée à partir de l'analyse de matériaux dopés (artificiellement ou non) aux concentrations cibles avec au moins une molécule à activité antibiotique. Le mélange de plusieurs molécules n'est valable que pour des tests spécifiques et que si la spécificité a été préalablement démontrée.

- Pour les matrices liquides (lait, etc.), la supplémentation de la matrice avec des solutions d'antibiotiques est bien adaptée. La supplémentation de la matrice doit se faire avec des solutions d'antibiotiques, avec au final un maximum de 10 % de la solution de travail dans la matrice.
- Pour les matrices solides (viande, etc.), 2 cas sont à envisager en fonction du type de kit :
 - Si le mode de préparation de l'échantillon avant analyse nécessite un broyage et une homogénéisation de l'échantillon, la même procédure de supplémentation que pour les matrices liquides est applicable.
 - Si l'échantillon est analysé sans préparation (matrice brute), la supplémentation n'est pas adaptée. Dans ce cas la production ou la récolte d'échantillons naturellement chargés doit alors être envisagée. Toutefois, dans un premier temps une étude basée sur des solutions aqueuses d'antibiotiques peut être prévue pour balayer un large spectre d'antibiotiques afin de déterminer la sensibilité et la spécificité du kit. Ensuite l'étude de matériaux naturellement chargés viendrait confirmer ou infirmer les résultats de cette première étude. Des dérogations à ce protocole pourront être accordées par la Bureau Technique si elles sont justifiées par le Laboratoire expert. Par exemple, il est possible dans certains cas d'utiliser des viandes broyées puis supplémentées en antibiotiques.
- La concentration cible d'antibiotique sera préparée **au minimum en 20 exemplaires avec au moins 3 origines différentes pour le lait correspondant, soit à 3 journées différentes, 3 groupes d'animaux différents ou 3 élevages différents**).
- Les échantillons doivent être codifiés aléatoirement pour réaliser toutes les analyses **en aveugle**, par une personne différente de celle qui fera l'analyse. Chaque échantillon est analysé par la méthode de dépistage, en suivant le protocole du fournisseur.

Par exemple, les échantillons peuvent être codifiés de 1 à 20. Plusieurs antibiotiques seront testés au Jour 1, ainsi que des échantillons blancs.

Le tableau suivant représente un tableau de codification pour des analyses en aveugle le Jour 1.

Codification	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Contenu	AB3	B	AB1	AB2	AB3	AB2	AB2	AB1	AB3	AB2
Codification	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Contenu	AB1	AB3	AB2	AB3	AB2	AB1	B	AB3	AB1	AB1

B : blanc ; AB1 : antibiotique 1 ; AB2 : antibiotique 2 ; AB3 : antibiotique 3.

Les mêmes antibiotiques seront testés le Jour 2, mais avec une codification différente. Il faudra préparer autant de tableaux de codification que nécessaires, pour obtenir le nombre d'échantillons nécessaires à la détermination des CC β et de la spécificité (taux de faux-positifs).

1.2.1.5 Exploitation et interprétation des résultats

Après l'analyse des n échantillons supplémentés (ou naturellement chargés), **la plus petite concentration cible pour laquelle il reste moins de 5 % de résultats négatifs est égale à la capacité de détection CC β de la méthode.**

Un tableau (cf. exemple ci-après) récapitulera pour l'ensemble des antibiotiques validés :

- La famille d'antibiotiques à laquelle il appartient,
- Le nom de l'antibiotique,
- La limite autorisée dans la matrice d'intérêt,
- Le nombre de résultats positifs obtenus sur le nombre total d'échantillons testés pour la concentration correspondant au $CC\beta$ (ou le pourcentage de positifs et le nombre total d'échantillons testés),
- le $CC\beta$,
- la comparaison à la limite réglementaire (critères de performances).

Tableau 3. Récapitulatif des résultats obtenus à intégrer dans le rapport d'étude de validation.

Famille	Antibiotique	LMR	Nombre de résultats positifs sur le nombre total d'échantillons testés	$CC\beta$	\leq ou \geq limite autorisée

1.2.1.6 Conclusions

Si le $CC\beta$ obtenu est différent du $CC\beta$ annoncé par le fabricant dans la notice technique, alors la notice technique devra être modifiée.

1.2.2 Taux de faux positifs / Réactions croisées

Le taux de faux positifs reflète la capacité de la méthode à garantir que des échantillons négatifs sont vraiment négatifs. Cette détermination concerne tous les types de test (spécifiques et à large spectre). L'analyse sert à mettre en évidence des interférences de la matrice (substances endogènes, constituants de la matrice, etc.). Le Laboratoire expert doit vérifier les interférences potentielles.

1.2.2.1 Protocole de détermination du taux de faux-positifs

Au minimum 20 échantillons de matrice blanche (cf. § 1.1, chapitre III), **si possible de différentes origines** (dépourvue de résidus d'antibiotiques ou autres substances à activité antibactérienne) seront analysés selon **le protocole du fabricant** avec la méthode de dépistage à valider.

1.2.2.2 Protocole de détermination des réactions croisées

Pour les tests à spectre d'action spécifique uniquement, le Laboratoire expert étudiera les réactions croisées du test avec des antibiotiques de la même famille ou d'autres familles. Cela permettra de connaître le pouvoir de discrimination entre l'analyte et des substances proches (isomères, métabolites, produits de dégradation, etc.).

Pour cela, des matrices 'blanches contenant des substances à activité antibiotique (au minimum un par grande famille d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, tétracyclines, macrolides, aminosides, sulfamides, quinolones et divers)) seront analysées. Il faudra tester des substances chimiquement proches (par ex. métabolites) quand c'est pertinent. D'autres substances susceptibles de se trouver en présence du composé d'intérêt dans les échantillons et susceptibles d'interférer avec la détection du composé d'intérêt (par ex. conservateurs) pourront aussi être testées.

Dans ce cas :

- 3 échantillons blancs seront supplémentés à 100 fois la limite autorisée avec ces substances sur un type de lait, viande, etc.
- Chaque échantillon sera analysé.

1.2.2.3 Exploitation et interprétation des résultats

Pour les échantillons de matrices blanches ([§ 1.2.2.1](#), chapitre III) puis pour les échantillons supplémentés ([§ 1.2.2.2](#), chapitre III), le taux de faux-positifs est déterminé comme suit : Taux de faux-positifs = nombre de résultats positifs / nombre d'échantillons analysés x 100.

1.2.3 Applicabilité

Les matrices peuvent avoir un impact sur les résultats d'un essai. La plupart des méthodes sont conçues pour une matrice principale. En raison du grand nombre de combinaisons analyte/matrice possibles, il est nécessaire de définir la portée de la méthode en termes de matrices. L'étude de validation est effectuée pour un couple « matrice/analyte » défini.

De manière générale, les paramètres à tester lors de l'applicabilité peuvent être :

- Matrices : Les matrices peuvent être des tissus différents (muscle, rein, foie, etc.), d'origine animale différente (œufs, miel, crevettes, etc.) ou venant de différentes espèces animales (bovin, ovine, volaille, lapins, etc.). Pour le lait, on différencie aussi le lait de mélange, le lait individuel, lait en poudre, etc.
- Format du test,
- Conservateurs ou pas.

1.2.3.1 Prérequis

L'étendue de l'applicabilité de la méthode devra être définie par le demandeur dans sa demande initiale de certification, avant de rédiger le projet d'étude préliminaire (cf. [E. Cadre de la demande de certification](#)). Les différents critères à tester en applicabilité seront choisis en fonction de cette demande.

Les essais d'applicabilité ne s'entendent que si le protocole utilisé pour les deux matrices est identique. Si le protocole utilisé est différent, il faut faire une étude de validation complète.

Deux approches sont possibles décrites ci-après.

1.2.3.2 Première approche

Une 1^{ère} approche consiste à déterminer le taux de faux-positifs et le $CC\beta$ pour la nouvelle matrice, puis à comparer le nouveau $CC\beta$ avec le $CC\beta$ de la validation initiale. **Cette approche devra être obligatoirement appliquée pour le lait et les produits laitiers.**

En général, les limites autorisées ne diffèrent pas dans le même type de matrice (par ex. du lait) entre les espèces. Néanmoins, si le $CC\beta$ a été déterminé pour une matrice (par ex. du lait de vache) lors de la validation initiale et si le test doit être appliqué à la même matrice issue d'une autre espèce (par ex. le lait de brebis), un effet matrice (interférences) doit être étudié. On ne peut présupposer que le même $CC\beta$ s'appliquera à cette nouvelle matrice. **Par conséquent**, le $CC\beta$ dans cette nouvelle matrice devra être déterminé pour la substance cible du test (test ciblé) ou, à tout le moins sur un certain nombre de substances représentatives (quand la méthode a un spectre large de détection).

➤ **Protocole expérimental :**

Pour chaque nouvelle matrice (si possible au moins des matrices de 3 origines différentes pour le lait, soit journées différentes, groupes d'animaux différents ou élevages différents),

- Pour déterminer le taux de faux-positifs, il faudra analyser au moins 10 matériaux blancs différents.
- Pour déterminer la (ou les) capacité(s) de détection ($CC\beta$), il faudra analyser au moins 10 matériaux différents supplémentés au niveau d'intérêt, pour 1 à 2 molécules représentatives par famille d'antibiotique selon les tableaux en [annexe 3](#).

Toutes ces analyses devront être réalisées en aveugle (échantillons inconnus codifiés), à différents jours avec différents opérateurs qualifiés, si possible.

Seront testés :

- 10 échantillons de lait cru blanc différents avec une composition, qualité et pH normaux,
- 10 échantillons de lait cru blanc différents supplémentés avec une substance pour la famille concernée (maximum 4 familles), en choisissant la substance la plus pertinente pour la matrice testée. La supplémentation est fixée au niveau ou juste au-dessus de la capacité de détection ($CC\beta$) (maximum + 20 %).
- Pour la famille des bêta-lactamines, tester au moins une pénicilline et une céphalosporine, pour les matrices lait et muscle.

➤ **Interprétation des résultats :**

- Aucun critère n'est fixé sur le taux de faux-positifs, par rapport à la validation initiale. Si le taux de faux-positifs est plus élevé que lors de la validation initiale, la différence sera notifiée clairement dans le rapport d'étude.
- Concernant la capacité de détection :
 - Si les 10 échantillons supplémentés sont tous détectés positifs, la méthode est applicable aux nouvelles matrices (ou espèces), avec le même $CC\beta$ que la matrice d'origine.
 - Si 1 seul échantillon supplémenté est trouvé négatif, il faudra tester de nouveau 10 échantillons supplémentés :

- Dans le cas où aucun résultat négatif n'est retrouvé dans les 10 échantillons suivants, la méthode est applicable avec le même CC β .
- Dans le cas où au moins 1 résultat négatif de nouveau est retrouvé, il faut en déduire que le CC β pour cette nouvelle matrice est supérieur à celui estimé pour la matrice d'origine. Donc la méthode n'est pas applicable avec le même CC β . Dans un tel cas, la méthode de dépistage doit être entièrement revalidée pour la nouvelle matrice (la concentration cible doit être augmentée).

➤ **Exemple d'application :**

Si le fabricant souhaite que son test soit validé pour le lait cru de vache, mais aussi pour le lait de vache UHT, il faudra valider complètement le lait cru de vache et tester en applicabilité le lait de vache UHT. Chaque nouveau type de lait devra être testé par rapport au lait cru, à chaque fois.

Exemples de laits différents (liste non fermée selon la demande du fabricant) :

- Lait UHT,
- Lait pasteurisé,
- Lait décongelé,
- Poudre de lait reconstituée,
- Laits autres espèces que vache.

1.2.3.3 Deuxième approche

La 2^{ème} approche consiste à valider (spécificité, détermination du CC β) en combinant plusieurs espèces ou plusieurs matrices (hors lait ou produits laitiers).

Exemple : Si le fabricant souhaite que son test soit validé pour le muscle de bovin, mais aussi pour le muscle de porc, d'ovin et de volaille, il faudra valider en combinant toutes ces espèces. La même matrice (exemple : muscle), provenant de quatre espèces animales différentes, sera utilisée.

Le taux de faux-positifs sera déterminé par l'analyse d'au moins 20 échantillons blancs (5 échantillons par espèce). Le taux de faux-positifs ainsi déterminé sera le taux de faux-positifs global, toutes espèces confondues.

Le CC β sera déterminé par l'analyse des mêmes 20 échantillons blancs supplémentés à la concentration cible de dépistage (5 échantillons par espèce animale).

- Si les 20 échantillons supplémentés sont tous détectés positifs ou s'il y a un maximum de 1 résultat négatif, la méthode est applicable à toutes les matrices (ou espèces), avec un même CC β .
- Si 2 ou plus de 2 échantillons supplémentés sont détectés négatifs, le CC β pour cette combinaison de matrices est supérieur à celui attendu. Dans un tel cas, la concentration cible doit être augmentée pour déterminer le CC β commun.

Quelle que soit l'approche choisie, si la méthode n'est pas applicable, elle doit être validée en suivant le protocole complet pour la nouvelle matrice.

1.2.3.4 Présentation des résultats

Les résultats de l'étude d'applicabilité se présentent, soit sous la forme d'un tableau comparatif entre les CC β de la première matrice validée et les CC β pour les mêmes antibiotiques de la nouvelle matrice validée pour l'approche n°1 (cf. tableau 4), soit sous la forme du tableau 3 des CC β présenté en § 1.2.1.5 du chapitre III pour l'approche n°2.

Tableau 4. Approche n°1 : Exemple de tableau récapitulatif des résultats obtenus à intégrer dans le rapport de d'étude de validation.

Famille	Antibiotique	LMR	1 ^{ère} matrice		n ^{ème} matrice	
			CC β	\leq ou \geq LMR	Nombre de résultats positifs sur le nombre total d'échantillons testés	Applicabilité (Oui / Non)

1.2.4 Robustesse

1.2.4.1 Objectifs de l'étude de robustesse

Les objectifs de l'étude de robustesse sont d'observer les conséquences de l'introduction délibérée de variations raisonnables mineures par le laboratoire. Les variations mineures sont de l'ordre de grandeur de variations qu'on peut couramment rencontrer en routine dans un laboratoire (10 à 20 % de variation).

La première étape est de choisir des facteurs du pré-traitement de l'échantillon et de l'analyse, qui pourraient influencer les résultats de mesure. De tels facteurs peuvent inclure l'analyste, la source et l'âge des réactifs, les solvants, les standards et les extraits d'échantillon, la température, le pH, etc.

1.2.4.2 Choix des facteurs qui peuvent être testés (liste non exhaustive)

Sur la base des informations fournies par le fabricant et en fonction du type de test, le Laboratoire expert déterminera les facteurs pertinents à vérifier. Les facteurs qui doivent obligatoirement être testés sont ceux qui constituent des étapes critiques de la méthode en fonction des conditions d'utilisation prévues. Si des facteurs critiques (identifiés par le Laboratoire expert) ne sont pas documentés par le fabricant, ils seront obligatoirement vérifiés par le Laboratoire expert dans le cadre de l'étude.

- **Influences du protocole d'essai :**

- La température d'incubation: la température requise (= référence) par rapport à une température plus faible et une température plus élevée.
- Remarque: si un test est effectué à température ambiante (sans incubateur), l'essai sera effectué à 20°C (= référence) et à des températures extrêmes à définir.
- La durée d'incubation (pour chaque étape d'incubation): la durée requise d'incubation (= référence) par rapport à une durée plus longue et une durée plus courte.

Remarque : pour un test à plusieurs étapes d'incubation, tester chaque étape indépendamment.

Remarque : pour un test à plusieurs étapes d'incubation, on peut aussi tester plusieurs combinaisons (plus court-plus long, plus long – plus court, etc.).

- Avance ou retard de la lecture : lecture comme recommandé dans le protocole (= référence) par rapport à une lecture avancée ou retardée (par ex. 30 sec., 1 min, 5 min, 15 min).
 - Volume de prise d'essai : volume correct indiqué dans le protocole (= référence) par rapport plus petit (-10 %) et un volume plus grand (+ 10 %).
 - Temps de contact matrice/réactif avant de démarrer l'incubation. A déterminer en fonction du test par le Laboratoire expert.
- **Influence de l'âge des lots de tests** : Si cela n'a pas déjà été testé lors de la détermination de la capacité de détection, il faudra tester l'effet de l'âge des lots :
 - L'essai est effectué sur les mêmes échantillons de lait, le même jour, avec deux lots, un utilisé peu de temps après la production et un juste avant la date d'expiration.
 - **Qualité de la matrice / Influences de la composition** :
 - Valeur du pH : Contre une valeur de pH extrême haut et bas.
 - Facteurs qui s'appliquent au lait uniquement :
 - Un comptage de cellules somatiques élevé : Lait avec composition / qualité normales (= référence) *contre* lait avec un comptage $> 10^6$ par mL.
 - Comptage de la flore totale élevé : Lait avec composition / qualité normales (= référence) *contre* lait avec comptage $> 5 \times 10^5$ par mL.
 - Taux de matières grasses faible : Lait avec composition / qualité normales (= référence) *contre* lait avec un taux de matières grasses faible (par ex. MG < 2 g par 100 g).
 - Taux de matières grasses élevé : Lait avec composition / qualité normales (= référence) *contre* lait avec un taux de matières grasses élevé (par ex. MG > 6 g par 100 g).
 - Taux de protéines bas : Lait avec composition / qualité normales (= référence) *contre* lait avec un taux de protéines bas (par ex. MP < 2.5 g par 100 g)
 - Taux de protéines élevé : Lait avec composition / qualité normales (= référence) *contre* lait avec Taux de protéines élevé (par ex. MP > 4 g par 100 g).
 - Lait congelé ou pas, température de stockage, température de l'échantillon avant analyse.
- Les valeurs seuils fixées (basses et hautes) pour les taux de matières grasses et de protéines pourront être basées sur un intervalle de 50 % autour d'échantillons de lait courants rencontrés localement.
- pH bas: Lait avec "composition / qualité normales" (= référence) *contre* lait avec $6,0 < \text{pH} < 6,3$.
 - pH élevé : Lait avec "composition / qualité normales" (= référence) *contre* lait avec $7,10 < \text{pH} < 7,50$.
 - Lait congelé/lait non congelé.
 - Température du lait : Lait froid (3 ± 2 °C) (= référence) contre lait à 20 ± 2 °C.

1.2.4.3 Choix des tolérances à tester

- 1) Quand les intervalles sont spécifiés par le fabricant, on testera les tolérances annoncées.
- 2) Quand les intervalles ne sont pas spécifiés par le fabricant, les facteurs à tester devront être modifiés dans un ordre de grandeur qui correspond à des déviations usuelles.

1.2.4.4 Choix des substances à tester

Les substances pour supplémentation sont choisies pour être représentatives de la série d'analytes considérés.

- Pour un test à spectre d'action spécifique d'un analyte ou d'une famille d'analytes, seule une substance (A) est intégrée dans le test de robustesse (cf. [annexe 3](#)).
- Pour un test à large spectre, deux substances A et B de deux familles différentes parmi les plus représentatives (selon l'avis du Laboratoire expert) seront intégrées dans le test de robustesse (par ex. pour un test β -lactamines : une pénicilline et une céphalosporine) (cf. [annexe 3](#)).

1.2.4.5 Nombre d'échantillons à analyser

➤ Approche classique à un paramètre :

- 3 échantillons différents de matrice blanche,
- 3 échantillons différents de matrice blanche supplémentés avec une substance (A) au niveau ou juste au-dessus de la capacité de détection ($CC\beta$) (maximum + 20 %).
- 3 échantillons différents de matrice blanche supplémentés avec une substance (B) au niveau ou juste au-dessus de la capacité de détection ($CC\beta$) (maximum + 20 %).

➤ Approche par plan expérimental :

- 10 échantillons différents de matrice blanche,
- 10 échantillons différents de matrice blanche supplémentés avec une substance (A) au niveau ou juste au-dessus de la capacité de détection ($CC\beta$) (maximum + 20 %).
- 10 échantillons différents de matrice blanche supplémentés avec une substance (B) au niveau ou juste au-dessus de la capacité de détection ($CC\beta$) (maximum + 20 %).

Note : 10 échantillons (10 blancs + 10 substance A + 10 substance B) sont nécessaires dans cette approche pour pouvoir calculer un taux de faux négatifs et un taux de faux positifs statiquement valide, ce qui n'est pas le cas avec 3 échantillons seulement. Toutefois, le nombre total d'analyses total diminue car au moins 4 facteurs peuvent être testés simultanément par un plan expérimental.

1.2.4.6 Protocole d'étude de la robustesse

On recommande de réaliser l'étude de robustesse sur différents jours, avec différents opérateurs qualifiés. Une étude de robustesse peut se mener de deux façons.

➤ Approche classique à un paramètre :

Il faut faire varier chaque paramètre individuellement et tester pour chacun des paramètres et chacune des valeurs cibles du paramètre (basse, référence et haute) le nombre d'échantillons recommandés ci-dessus. L'exploitation de ce type d'étude est simple, mais l'étude requiert plus de travail analytique.

➤ Approche par plan expérimental :

Il faut utiliser des plans d'expérience à plusieurs facteurs, ce qui permet de réduire la charge analytique. Toutefois, il faut noter que l'exploitation des plans expérimentaux est plus complexe. Leur utilisation demande des bases statistiques solides (Goupy 2001, 2005).

Les plans expérimentaux et leur interprétation sont présentés succinctement en [annexe 4](#).

Si le Laboratoire expert choisit cette approche, il devra décrire dans le projet d'étude préliminaire les plans d'expérience mis en œuvre, les calculs à réaliser et comment interpréter les résultats.

1.2.4.7 Exploitation et interprétation des résultats

➤ Approche classique à un paramètre :

L'analyse sera faite facteur par facteur. Un facteur aura un impact sur le résultat si sa variation engendre 1 ou plusieurs résultats faux positifs (pour 3 échantillons de matrice blanche) ou 1 ou plusieurs résultats faux négatifs (pour 3 échantillons supplémentés pour l'une et/ou l'autre des substances testées).

L'impact des variations de chaque facteur (en plus ou en moins) sera déterminé, par rapport aux résultats de la valeur de référence (matrice standard). Les résultats seront présentés sous la forme d'un tableau (cf. ci-après).

Tableau 5. Résultats de l'étude de robustesse.

	Impact sur les échantillons blancs (oui / non)	Impact sur les échantillons supplémentés (oui / non)	Conclusion
Facteur 1	N	N	Robuste
Facteur 2	N	N	Robuste
Facteur 3	N	N	Robuste
Facteur 4	N	O	Non robuste
Facteur 5	O	N	Non robuste

Les résultats bruts seront à présenter en annexe du rapport d'étude du Laboratoire expert.

➤ Approche par plan expérimental :

L'analyse des plans expérimentaux est décrite par exemple dans « (Goupy 2001, 2005) ».

1.2.4.8 Conclusions

Une méthode analytique est robuste si les résultats ne sont pas sensibles aux variations des conditions expérimentales.

Si la méthode n'est pas robuste pour un facteur dans la fourchette testée, la fourchette testée va être réduite. Les analyses vont être refaites avec cette fourchette réduite (2^{ème} étude de robustesse).

L'étude de robustesse sert à mettre en avant les points critiques. Ces points critiques une fois identifiés devront être mis en avant dans la notice technique du fabricant et dans le rapport de l'étude préliminaire.

Si une limite de tolérance annoncée n'est pas retrouvée, il faudra modifier la notice technique du fabricant en incluant la nouvelle limite de tolérance.

1.3 Méthodes quantitatives

Les paramètres à déterminer pour les méthodes quantitatives sont les mêmes que pour une méthode qualitative, plus les paramètres décrits ci-après.

1.3.1 Réactions croisées

Le pourcentage de réactions croisées entre le composé d'intérêt et des substances interférentes (de la même famille ou d'autres familles) devra être déterminé. Les résultats des réactions croisées seront à présenter dans un tableau (ex. ci-dessous).

Tableau 6. Exemples de tableau de résultats de réactions croisées.

	Pourcentages de réactions croisées (%)*
Composé d'intérêt	100
Substance interférente 1	10
Substance interférente 2	52
Substance interférente 3	34
Substance interférente 4	17

*Valeurs données à titre d'exemple.

1.3.2 Justesse et fidélité

La justesse et la fidélité (et/ou l'exactitude) doivent être déterminées pour une méthode quantitative. Justesse, fidélité et exactitude sont définies et décrites dans la décision Européenne CE/2002/657 (2002). La fidélité peut être déterminée dans les conditions de répétabilité, ou de reproductibilité. Dans le cadre de l'étude préliminaire (intra-laboratoire), seule la répétabilité (inter-jours, même méthode, fraction à analyser identique et dans les mêmes conditions) sera déterminée.

1.3.2.1 Choix des substances à tester pour la justesse et la fidélité

Le principe du choix des substances à tester (nombre de molécules à tester en fonction du type de test) est le même que pour l'étude de robustesse (cf. § 1.2.4.4, chapitre III).

Deux approches sont proposées dans ce référentiel pour déterminer la justesse et la fidélité, une **approche individuelle** (caractéristique par caractéristique) et une **approche globale** (combinaison de plusieurs caractéristiques en une seule : profil d'exactitude). Le choix de l'approche sera fait par le Laboratoire expert.

1.3.2.2 Approche individuelle

➤ **Choix des concentrations à tester :**

Justesse :

Un échantillon de matrice blanche sera supplémenté à un seul niveau, la concentration d'intérêt. La concentration d'intérêt est le plus souvent la limite autorisée.

Répétabilité :

Des échantillons de matrices identiques seront supplémentés avec la substance à tester à 3 niveaux, de manière à obtenir des concentrations équivalant à 1, 1,5 et 2 fois la limite réglementaire pour les substances interdites ou 0,5, 1 et 1,5 fois la limite autorisée.

Note : *Les résultats bruts de la répétabilité, si la limite autorisée a été choisie comme la concentration d'intérêt, peuvent être utilisés pour déterminer la justesse.*

➤ **Protocoles pour déterminer la justesse et la fidélité :**Justesse :

La procédure est décrite en détail dans la norme ISO 5725-2 (5725-2 1994).

Il faut analyser, conformément au protocole du fournisseur, six réplicats de l'échantillon supplémenté.

Répétabilité :

- À chaque niveau de concentration, l'analyse doit être réalisée avec six réplicats.
- Analyser chaque réplicat en triple.

➤ **Exploitation et interprétation des résultats :**Justesse :

- la concentration de l'analyte présent dans chaque réplicat est déterminée,
- la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (%) sont calculés pour ces valeurs de concentration,
- la justesse est calculée en divisant la concentration moyenne détectée par la concentration d'intérêt et multiplier par 100 pour exprimer le résultat en pourcentage.

$$\text{Justesse (\%)} = \text{concentration moyenne détectée} \times 100 / \text{concentration d'intérêt.}$$

La décision européenne CE/2002/657 (2002) fixe les critères à atteindre pour la justesse des méthodes quantitatives. L'écart entre la concentration moyenne déterminée expérimentalement et la valeur de supplémentation doit se situer dans les limites suivantes.

Justesse minimale des méthodes quantitatives

Fraction pondérale	Plage
≤ 1 µg/kg	- 50 % à + 20 %
> 1 µg/kg à 10 µg/kg	- 30 % à + 10 %
≥ 10 µg/kg	- 20 % à + 10 %

Répétabilité :

- la concentration détectée dans chaque échantillon est calculée.
- la concentration moyenne, l'écart-type de répétabilité s et le coefficient de variation (CV) (%) des échantillons supplémentés sont calculés pour chaque niveau.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

avec : x_i : i^{ème} valeur, obtenue sur une série de n mesures d'un échantillon

\bar{x} : valeur moyenne, sur la série de n mesures

n : nombre de mesures

et $CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$

Plus l'écart-type est petit, plus la fidélité de la méthode est bonne.

Le tableau suivant présente les critères de répétabilité à respecter pour que la répétabilité de la méthode soit satisfaisante, en fonction de la concentration de supplémentation.

Tableau 7. Critères de répétabilité.

Concentration de supplémentation ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV répétabilité (%)
1	$\leq 20 \%$
10	$\leq 20 \%$
100	$\leq 15 \%$
1000	$\leq 12 \%$

1.3.2.3 Approche globale : Le profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est une approche globale, qui peut se substituer à l'approche individuelle proposée ci-dessus pour déterminer individuellement la justesse et la fidélité.

L'exactitude est une combinaison de la justesse (erreur systématique) et de la fidélité (erreurs aléatoires). Elle peut être déterminée grâce à l'approche du profil d'exactitude.

En utilisant les mesures de répétabilité et de fidélité intermédiaire, le profil d'exactitude permet de calculer un intervalle où sera situé une proportion connue de mesures. Lorsque cet intervalle est comparé à un intervalle d'acceptabilité défini par l'utilisateur ou réglementairement, il est possible de décider simplement si une méthode est valide ou non (Feinberg 2007).

Le protocole expérimental, ainsi que l'interprétation des résultats du profil d'exactitude, sont présentés en [annexe 5](#). De plus, la mise en œuvre et l'interprétation des profils d'exactitude sont bien décrits dans les articles de M. Feinberg (Feinberg 2010a, b).

2. Praticabilité du kit

La praticabilité de la méthode n'est pas un critère de performance, mais apporte des informations importantes pour un futur utilisateur, tels que la rapidité de l'analyse par exemple.

La praticabilité est le test de la facilité d'utilisation associée avec le matériel nécessaire, les réactifs, instruments et les conditions environnementales. L'objectif sera de vérifier si la méthodologie est appropriée ou non pour les analyses de routine

La praticabilité et l'adaptabilité revêtent plusieurs aspects. Ceux-ci ont été répertoriés en 12 critères. Pour chacun de ces critères a été défini le mode de communication de ce critère auprès de l'utilisateur et le mode de contrôle de ce critère.

En effet certains critères nécessitent une communication sur l'emballage ou la notice alors que d'autres nécessitent une communication sur le certificat NF VALIDATION.

Les critères de praticabilité sont présentés dans le tableau qui suit.

Tableau 8. Critères de praticabilité de la méthode alternative.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère à l'utilisateur	Méthode de contrôle du critère
1	Mode de conditionnement des réactifs	Emballage ou notice	Vérification par le Laboratoire expert
2	Volume des réactifs	Emballage ou notice	Vérification par le Laboratoire expert
3	Conditions de stockage des réactifs (+ date de péremption des produits non ouverts)	Emballage ou notice	Vérification par le Laboratoire expert que les conditions existent
4	Mode d'utilisation après la 1 ^{ère} utilisation (en particulier existence de dates limites)	Emballage ou notice	Vérification par le Laboratoire expert que les modalités existent
5	Equipement ou locaux spécifiques nécessaires	Notice	Vérification par le Laboratoire expert
6	Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (dans ce cas existence d'un mode opératoire)	Emballage ou notice	Vérification par le Laboratoire expert de la véracité des écrits
7	Temps de formation de l'opérateur non initié à la méthode	Rapport	Mesurée par le Laboratoire expert (possibilité de se servir des durées mises en œuvre par les laboratoires collaborateurs) et réparti dans un des 3 catégories suivantes : moins d'un jour, entre 1 jour et 1 semaine, plus d'1 semaine
8	Temps réel de manipulation/ Flexibilité de la technique en fonction du nombre d'échantillons à analyser, etc.	Rapport	Temps de manipulation mesuré pour l'analyse / temps pour obtenir un résultat vérifié par le Laboratoire expert
9	Délai d'obtention des résultats	Rapport	Vérification par le Laboratoire expert
10	Type de qualification de l'opérateur	Rapport	Précisé par le Laboratoire expert par rapport aux compétences à minima nécessaire pour la mise en œuvre du test
11	Si prévu par la méthode, modalités de traçabilité des résultats	Notice	Exemple : lecture visuelle ou optique Vérification par le Laboratoire expert
12	Maintenance par le laboratoire	Rapport	Durée et fréquence vérifié par le Laboratoire expert

Les données résultant de cette étude de praticabilité seront intégrées :

- dans le rapport d'étude préliminaire pour les critères 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12,
- dans le rapport d'étude interlaboratoires pour les critères 7 et 10.

3. Conclusions sur les données de l'étude préliminaire

Aucun taux maximal de faux-positifs n'est fixé dans la réglementation car les échantillons déclarés positifs (dont les résultats faux-positifs) doivent être confirmés par une méthode physico-chimique pour identification et quantification, dans le cadre du contrôle officiel. Une méthode de dépistage devrait avoir un taux de faux-positifs le plus bas possible.

Une méthode de dépistage (qualitative ou quantitative) valide devrait avoir une capacité de détection (CC β) égale ou inférieure au niveau d'intérêt (limite autorisée, limite réglementaire) ou aussi basse que possible quand aucune limite n'est fixée.

- Quand une méthode a un large spectre de détection (substances avec une limite autorisée définie), pour chaque analyte détecté (correspondant à une liste minimum de substances), la capacité de détection CC β , ainsi que son écart par rapport à la LMR devront être définis.
- Pour les substances interdites, la méthode doit être très spécifique de l'analyte d'intérêt. De plus, les composants de la matrice ne doivent avoir aucune influence sur les résultats de l'essai.

L'applicabilité de la méthode à différentes matrices doit également être prouvée.

Enfin, la robustesse de la méthode doit être prouvée.

Tableau 9. Récapitulatif des résultats de l'étude préliminaire.

Caractéristiques de performance		Conclusions de l'étude de validation
	Taux de faux-positifs (%)	
	Réactions croisées (%)	
Capacité de détection	CC β AB1 (μ g/kg)	
 (μ g/kg)	
 (μ g/kg)	
	CC β ABn (μ g/kg)	
Applicabilité	Liste des matrices	
Robustesse	Facteurs critiques identifiés	
Exactitude	Justesse	
	Fidélité	

Note :

- *Le tableau ci-dessus devra être repris dans le certificat NF VALIDATION.*
- *En parallèle, le fabricant devra afficher les performances de la méthode alternative dans la notice technique de la méthode :*
 - *Le taux de faux-positifs,*
 - *Tous les CC β déterminés,*
 - *Liste des matrices applicables,*
 - *Facteurs critiques issus de l'étude de robustesse,*
 - *Pour les méthodes quantitatives, justesse et fidélité.*

IV. Etude interlaboratoires

L'objectif de l'étude interlaboratoires est de déterminer la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires utilisant des échantillons identiques (répétabilité, reproductibilité).

1. Organisation de l'étude interlaboratoires

1.1 Choix des laboratoires collaborateurs

Le choix des laboratoires collaborateurs est fait de façon concertée entre le fabricant et le Laboratoire expert. Néanmoins, la proposition et le suivi des laboratoires collaborateurs sont de la responsabilité du Laboratoire expert.

Le Laboratoire expert doit proposer au Bureau technique, lors de la présentation du projet d'étude interlaboratoires, une liste de laboratoires d'essais compétents, français et/ou étrangers, publics ou privés, qui n'ont pas participé au développement de la méthode et indépendants du fabricant. Le Bureau Technique valide la liste des participants.

Ces laboratoires sont au minimum au nombre de 10, de façon à obtenir au minimum 8 séries de résultats interprétables. Le Laboratoire expert participe à l'essai mais ses résultats ne sont pas intégrés à l'analyse globale des données.

Le Laboratoire expert transmet aux participants le protocole d'analyse à mettre en œuvre pour la méthode de dépistage. Le fabricant doit équiper les laboratoires avec tout le matériel et la documentation nécessaires à la mise en œuvre de la méthode alternative. Une formation préalable des collaborateurs par le fabricant est recommandée.

1.2 Choix des matrices à tester

Si l'étude préliminaire a été réalisée sur plusieurs matrices, l'étude interlaboratoires pourra aussi porter sur ces matrices, en fonction de l'expertise du Laboratoire expert et de l'avis du Bureau Technique. Le Laboratoire expert s'appuiera sur les données issues de l'étude préliminaire.

1.3 Choix des antibiotiques

Pour le choix des antibiotiques, 3 cas se présentent :

- Le spectre d'action du kit est limité à un antibiotique : l'étude interlaboratoires portera sur cet antibiotique uniquement.
- Le spectre d'action du kit est limité à une famille d'antibiotiques : l'étude interlaboratoires portera sur 4 antibiotiques au minimum de cette famille, s'il y en a au moins 4 dans les tableaux de [l'annexe 1](#). Pour les bêta-lactamines, au moins 2 pénicillines et 2 céphalosporines devront être étudiées.
- Le spectre d'action du kit est large : l'étude interlaboratoires portera sur une variété plus large d'antibiotiques : au minimum un antibiotique par grande famille (2 bêta-lactamines + 4 autres grandes familles) (6 antibiotiques). **Note** : *A condition que le fabricant ait demandé que le test soit validé pour ces familles d'antibiotiques.*

On peut aussi tenir compte pour le choix des antibiotiques de leur fréquence d'utilisation en médecine vétérinaire ou de survenue sous la forme de résidus dans la matrice concernée, si ces données sont connues.

1.4 Choix des concentrations

Quatre niveaux de concentration différents doivent être utilisés. Ces 4 niveaux seront définis dans le projet d'étude interlaboratoires.

Le 1^{er} matériau L₀ est un matériau blanc (dépourvu de substances à activité antibiotique), le 1^{er} niveau de concentration L₁ correspond à une concentration conduisant potentiellement à un résultat négatif (concentration inférieure au CC β déterminé lors de l'étude préliminaire = 1/2 CC β), le 2^e niveau L₂ à une concentration légèrement supérieure au CC β (CC β + 20 %), et enfin le 3^e niveau L₃ à une concentration conduisant à un résultat positif (CC β + 50 %). La concentration L₁ pourra donner un certain pourcentage de résultats positifs chez certains participants, car la concentration est proche de la limite de détection.

1.5 Nombre d'échantillons à envoyer à chaque laboratoire

3 cas se présentent :

- le spectre d'action du kit est limité à un antibiotique : un antibiotique * 4 niveaux (1 blanc + 3 concentrations) en double aveugle, soit un total de 8 échantillons,
- le spectre d'action du kit est limité à une famille d'antibiotiques : 4 antibiotiques minimum * 4 niveaux (1 blanc + 3 concentrations) en double aveugle, (soit un total de 32 échantillons minimum),
- le spectre d'action du kit est large : 6 antibiotiques minimum * 4 niveaux (1 blanc + 3 concentrations) en double aveugle, (soit un total de 48 échantillons minimum).

1.6 Préparation et envoi des échantillons

1.6.1 Origine des matériaux

Les matériaux sont préparés à partir de matrice blanche (exempte de résidus d'antibiotiques). Les caractéristiques des matrices blanches pour l'étude interlaboratoires sont identiques à celles décrites au § 1.1 du chapitre III.

Dès l'arrivée de la matrice blanche au Laboratoire expert, une fraction aliquote sera testée avec un test antibiotiques adapté. Si le résultat est positif, la matrice blanche sera jetée, et l'essai reporté dès que possible. Dans le cas contraire, on passera à l'étape suivante.

1.6.2 Préparation des matériaux

Le Laboratoire expert prépare les échantillons pour les laboratoires collaborateurs.

Dans la plupart des cas, les matériaux préparés seront supplémentés avec des antibiotiques, aux concentrations d'intérêt. Quand cela est possible, la préparation de matériaux naturellement chargés, issus d'animaux traités, sera réalisée.

Lors de la préparation, toutes les précautions seront prises pour éviter les contaminations croisées entre les différents matériaux :

- ☞ identification claire de la verrerie,
- ☞ le premier matériau traité sera le matériau blanc,
- ☞ les matériaux contaminés seront traités les uns après les autres. Aucun matériau ne sera préparé et conditionné tant que la manipulation du matériau précédent ne sera pas terminée,
- ☞ pour les matrices liquides, une agitation magnétique (vitesse moyenne) pendant au moins 10 minutes, devrait garantir une bonne homogénéité des matériaux. Cette agitation magnétique devra être maintenue durant toute la phase d'aliquotage,
- ☞ chaque matériau contaminé sera homogénéisé dans un contenant en une seule fois, le contenant sera différent pour chaque matériau.

1.6.2.1 Préparation des échantillons, codification

Les matériaux seront répartis dans des pots préalablement étiquetés (codes).

Chaque matériau est préparé, codifié et envoyé en double aveugle.

Les conditions de stockage des matériaux au Laboratoire expert sont fonction de la matrice, de la stabilité des antibiotiques et des résultats de la robustesse.

1.6.2.2 Vérification des matériaux

Chaque matériau sera contrôlé avant le départ des colis, afin de vérifier l'adéquation des résultats obtenus avec les résultats visés. Ces essais peuvent être réalisés en même temps que les essais d'homogénéité ou au point 0 de stabilité. Des échantillons surnuméraires sont préparés afin de vérifier la stabilité et l'homogénéité.

Le Laboratoire expert doit vérifier la stabilité et l'homogénéité des matériaux avant leur départ. Pour les analyses d'homogénéité, 10 échantillons avec 2 prises d'essai chacun doivent être prélevés et analysés, pour chaque antibiotique à la concentration L_3 (cf. § 1.4, chapitre IV). Pour les analyses de stabilité, 3 échantillons doivent être analysés, à 3 intervalles de temps (au moment de la préparation des matériaux, un point intermédiaire et le dernier point après la date d'analyse par les participants), pour chaque antibiotique à la concentration L_3 , par la méthode qui fait l'objet de l'étude de validation. L'analyse d'homogénéité peut remplacer le point 0 de la stabilité.

1.6.3 Préparation de témoins négatifs et positifs

Les témoins sont des échantillons dont la qualité est connue par le participant et qui servent uniquement à valider l'essai (ou non). Leurs résultats ne sont pas intégrés dans l'analyse des données.

Un témoin positif est une matrice blanche supplémentée à la concentration L_3 .

Des témoins négatifs et des témoins positifs (supplémentés en antibiotiques) sont envoyés aux laboratoires participants, avec les matériaux codifiés.

- Si un témoin négatif est fourni par le fabricant, c'est ce témoin qui devra être utilisé dans le cadre du protocole par le participant et il pourra servir à exclure un laboratoire en cas de résultat positif.

- Si un témoin négatif n'est pas fourni par le fabricant, le Laboratoire expert enverra un témoin négatif (tous les participants auront le même) ; il pourra servir à exclure un laboratoire en cas de résultat positif.

1.6.4 Intervenants extérieurs

La fourniture des emballages adaptés pour le transport (dont la carboglace) et le transport des colis seront assurés par un intervenant extérieur.

Le fournisseur de matrice blanche (par ex. lait de vache (lait cru provenant de tank, exempt de résidus d'antibiotique)) pourra être un intervenant extérieur.

1.6.5 Envoi des matériaux

Les conditions de transport (délais, température, etc.) et de stockage des matériaux (avant départ et à l'arrivée) sont fonction de la matrice, de la stabilité des antibiotiques et des résultats de la robustesse. Il est recommandé d'ajouter au colis un outil de suivi de température (par ex. thermobouton).

1.6.6 Communication avec les participants

Chaque participant sera identifié par un code qui ne sera connu que de lui-même et du Laboratoire expert. Le Laboratoire expert envoie les instructions aux participants. Egalement, il fixe une date d'analyse à respecter pour tous les participants (c'est une condition d'exclusion). Le Laboratoire expert doit en particulier fixer et communiquer de façon très claire pour les laboratoires collaborateurs, les conditions d'élimination des résultats d'un laboratoire, au moment de l'envoi des échantillons. Ceci permet d'avoir des règles claires et non discutables d'élimination des résultats, et de plus permet d'éviter à un laboratoire collaborateur de faire des essais inutiles (cf. [§ 2.1](#) cas d'exclusion des laboratoires ci-après).

1.6.7 Analyses par les participants

Les laboratoires collaborateurs, ainsi que le Laboratoire expert réaliseront les analyses avec la méthode de dépistage, en appliquant strictement le protocole qui a été envoyé pour l'essai par le Laboratoire expert.

Toutes les analyses seront effectuées **en double** (2 séries d'analyse distinctes) et **en aveugle** dans chacun des laboratoires collaborateurs et à la date stipulée.

2. Calculs et interprétation des résultats de l'étude interlaboratoires

2.1 Cas d'exclusion des laboratoires

Les résultats des laboratoires exclus ne seront pas intégrés à l'analyse globale des résultats. Les cas cités ci-dessous sont des cas d'exclusion :

- Si les témoins négatifs donnent un résultat positif.
- Si les témoins positifs donnent un résultat négatif.

- Stockage et transport : Si la température et la durée de transport des échantillons ne correspondent pas aux limites fixées par le Laboratoire expert.
- Si la date d'analyse n'est pas conforme par rapport à la date fixée par le Laboratoire expert.

Le Bureau Technique pourra revenir sur une exclusion déclarée par le Laboratoire expert, s'il ne la trouve pas justifiée. De même, le Bureau Technique pourra demander d'autres exclusions, pour des raisons qu'il justifiera.

Une recherche des causes doit être faite chez le laboratoire qui a obtenu des résultats aberrants. Le Laboratoire expert devra indiquer dans le rapport pourquoi tel laboratoire a été éliminé et pourquoi il a obtenu des résultats aberrants.

2.2 Analyse de l'étude interlaboratoires pour une méthode qualitative

2.2.1 Spécificité et sensibilité

Les résultats positifs obtenus par la méthode de dépistage pour chaque antibiotique doivent être présentés sous la forme du tableau qui suit.

Tableau 10. Nombre de résultats positifs de la méthode de dépistage par niveau de contamination.

Laboratoires	Niveau de contamination			
	L ₀	L ₁	L ₂	L ₃
Laboratoire 1	/4	/4	/4	/4
Laboratoire 2	/4	/4	/4	/4
Laboratoire 3	/4	/4	/4	/4
Etc.	/4	/4	/4	/4
Nombre de résultats +				

Ensuite, le Laboratoire expert doit calculer :

- le % de spécificité SP pour le niveau L₀ à l'aide de l'équation suivante :

$$SP = (1 - (P_0/N_0)) * 100 \%$$

Où : N₀ : nombre total de résultats au niveau L₀

P₀ : nombre de positifs au niveau L₀.

- le % de résultats positifs au niveau L₁ : $P_1/N_1 * 100 \%$

Où : N₁ : nombre total de résultats au niveau L₁

P₁ : nombre de positifs au niveau L₁.

- le % de sensibilité SE pour chaque niveau de contamination positif (L₂ et L₃) à l'aide de l'équation suivante :

$$SE = (P/N+) * 100 \%$$

Où : N : nombre total des résultats L₂ (N₂₊) ou L₃ (N₃₊) respectivement

P₂ : nombre de positifs au niveau L₂

P₃ : nombre de positifs au niveau L₃

P : nombre de vrais positifs au niveau L₂ (P₂) ou au niveau L₃ (P₃).

- le % de sensibilité **SE global** (L_2+L_3) à l'aide de l'équation suivante :

$$SE = (P/N+) * 100 \%$$

Où : N_{global} : nombre total des résultats $L_2 + L_3$ ($N_{2+} + N_{3+}$)

P_{global} : nombre de positifs au niveau L_2 et au niveau L_3

P : nombre de vrais positifs au niveau $L_2 + L_3$ (P_2+P_3).

2.2.2 Répétabilité

La répétabilité dans chaque laboratoire est estimée en comparant :

- Les résultats des 2 analyses effectuées sur chaque échantillon (2 séries d'analyses différentes), sachant que la connaissance du premier résultat peut influencer la lecture lors de la seconde analyse.
- Les résultats obtenus avec les 2 échantillons de chaque paire.

La répétabilité, exprimée en pourcentage, est le rapport du nombre de résultats identiques par couples d'analyses sur le nombre total de couples.

Les résultats peuvent être présentés dans un tableau (cf. exemple ci-après), combinant les résultats de tous les échantillons testés (négatifs et supplémentés).

Tableau 11. Etude de répétabilité.

		(Nombre d'analyses identiques pour un même échantillon / N)*100 (%)	(Nombre d'analyses identiques pour 2 échantillons identiques (paire) / N)*100 (%)
Participants	1		
	2		
	...		
	i		
	Total		

N : nombre total d'échantillons

2.2.3 Reproductibilité interlaboratoires

L'étude interlaboratoires vise à comparer les performances (exactitude et fidélité) de la méthode, avec des critères de performance préétablis. Elle est effectuée par différents participants en utilisant des échantillons identiques examinés dans des conditions de reproductibilité.

La reproductibilité, exprimée sous forme de pourcentage, est le rapport du nombre de résultats identiques, du type le plus fréquent (par ex. résultats négatifs pour des échantillons exempts de molécules à activité antibiotique ou résultat positif pour des échantillons contaminés à une concentration supérieure à la limite de détection) sur le nombre total d'analyses.

Les résultats peuvent être présentés sous la forme du tableau suivant :

Tableau 12. Etude de reproductibilité interlaboratoires

Antibiotique (ou lait blanc)	Niveau de contamination	Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Reproductibilité (%)
Lait blanc	L ₀	/	
	L ₀	/	
	L ₀	/	
Antibiotique 1	L ₁		
	L ₂		
	L ₃		
Antibiotique 2	L ₁		
	L ₂		
	L ₃		
...
Antibiotique n	L ₁		
	L ₂		
	L ₃		
Total			

2.3 Analyse de l'étude interlaboratoires pour une méthode quantitative

2.3.1 Spécificité et sensibilité

Pour une méthode quantitative, il faut faire les mêmes calculs que pour une méthode qualitative.

2.3.2 Répétabilité

La répétabilité dans chaque laboratoire aux niveaux non quantifiables L₀ et L₁ est estimée comme pour une méthode qualitative, c'est-à-dire en prenant en considération les résultats positifs et/ou négatifs, et non les résultats quantitatifs. En effet, ces deux types de matériaux devront donner dans la majorité des cas des résultats négatifs.

La répétabilité dans chaque laboratoire aux niveaux quantifiables L₂ et L₃ est estimée en calculant pour chaque antibiotique et chaque niveau de concentration : la moyenne des 2 mesures (2 analyses/paire), l'écart-type et le coefficient de variation, ainsi que la moyenne des 4 mesures (2 paires en double aveugle, 2 analyses/paire), l'écart-type et le coefficient de variation.

Les résultats doivent se présenter sous la forme suivante, pour chaque antibiotique.

Tableau 13. Résultats de l'étude de répétabilité pour les niveaux L₂ et L₃ par antibiotique.

Participant n°		L2			L3		
		Moyenne	SD*	CV (%)	Moyenne	SD*	CV (%)
1	Paire 1 (n=2)						
	Paire 2 (n=2)						
	2 paires (n=4)						
2	Paire 1 (n=2)						
	Paire 2 (n=2)						
	2 paires (n=4)						
3	Paire 1 (n=2)						
	Paire 2 (n=2)						
	2 paires (n=4)						
...	Paire 1 (n=2)						
	Paire 2 (n=2)						
	2 paires (n=4)						
i	Paire 1 (n=2)						
	Paire 2 (n=2)						
	2 paires (n=4)						
Total des participants Interlaboratoires	Paire 1 (n=2)						
	Paire 2 (n=2)						
	2 paires (n=4)						

*SD = écart-type (standard deviation).

Des critères d'acceptabilité ont été fixés afin de déterminer si la méthode est répétable ou non.

Tableau 14. Critères d'acceptabilité pour la répétabilité.

Concentration de supplémentation (µg/kg)	CV répétabilité (%)	
1	≤ 20%	
10	≤ 20%	
100	≤ 15%	
1000	≤ 12%	

2.3.3 Reproductibilité interlaboratoires

La reproductibilité interlaboratoires aux niveaux non quantifiables L₀ et L₁ est estimée comme pour une méthode qualitative, c'est-à-dire en prenant en considération les résultats positifs et/ou négatifs, et non les résultats quantitatifs. En effet, ces deux types de matériaux devront donner dans la majorité des cas des résultats négatifs.

La reproductibilité interlaboratoires aux niveaux quantifiables L₂ et L₃ est estimée en calculant pour chaque antibiotique et chaque niveau de concentration : La reproductibilité dans chaque laboratoire est estimée en calculant pour chaque antibiotique et chaque niveau de concentration.

Les résultats doivent se présenter sous la forme suivante.

Tableau 15. Résultats de l'étude de reproductibilité pour les niveaux L₂ et L₃ par antibiotique.

Antibiotique (ou lait blanc)	Niveau de contamination	Moyenne	SD*	CV (%)
Antibiotique 1	L ₂			
	L ₃			
Antibiotique 2	L ₂			
	L ₃			
...	...			
Antibiotique n	L ₂			
	L ₃			
Total				

Des critères d'acceptabilité ont été fixés afin de déterminer si la méthode est reproductible ou non.

Tableau 16. Critères d'acceptabilité pour la reproductibilité interlaboratoires.

Concentration de supplémentation (µg/kg)	CV reproductibilité (%)
1	≤ 30 %
10	≤ 30 %
100	≤ 25 %
1000	≤ 20 %

2.3.4 Justesse

La justesse dans chaque laboratoire est estimée en calculant, pour chaque antibiotique et chaque niveau de concentration quantifiable L₂ et L₃, l'écart d'accord entre le résultat obtenu par le laboratoire sur les 4 mesures (moyenne des 4 mesures) et la valeur de supplémentation de l'échantillon :
Justesse (%) = concentration moyenne détectée × 100/valeur de supplémentation.

2.3.5 Profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est une approche globale, qui peut se substituer à l'approche individuelle proposée ci-dessus pour déterminer la justesse et la fidélité.

Le profil d'exactitude peut aussi être utilisé pour exploiter les résultats d'une étude interlaboratoires. Le protocole proposé ici est inspiré de la norme EN ISO 16140-2 (2016).

➤ Protocole de l'étude interlaboratoires :

- Au moins 3 niveaux de contamination, 2 paires par niveau et par antibiotique.
- Niveaux de contamination : inférieur L₁, intermédiaire L₂ et supérieur L₃ de la plage de quantification + un niveau de matrice blanche (L₀).
- Analyses en duplicat par chaque laboratoire.

➤ **Présentation des résultats :**

Participants (i)	Niveau (k)	Résultats	
		Duplicat 1	Duplicat 2
1	L ₀		
2	L ₀		
i	L ₀		
1	L ₁		
2	L ₁		
i	L ₁		
1	L ₂		
2	L ₂		
i	L ₂		
1	L ₃		
2	L ₃		
i	L ₃		

➤ **Calcul du profil d'exactitude et interprétation des résultats :**

Le manque de justesse est estimé en calculant le biais absolu, qui est égal à la différence entre la valeur moyenne pour chaque niveau de contamination i et la valeur « dite vraie » de supplémentation.

Les calculs sont les mêmes que ceux proposés dans la norme EN ISO 16140-2 (2016), de même que l'interprétation du profil d'exactitude, en dehors du calcul du biais (qui est basé sur la méthode de référence dans la norme EN ISO 16140-2). Les critères d'acceptabilité qui sont fixés pour la reproductibilité (§ 2.3.3, chapitre IV) sont ici applicables (cf. réglementation européenne).

G. Modèle de rapports d'étude et de synthèse

Les modèles (trames) de rapport de l'étude préliminaire et de l'étude interlaboratoires sont présentés en [annexe 6](#).

Dans un premier temps, le Laboratoire expert va rédiger un rapport d'étude préliminaire, puis dans un deuxième temps, un rapport d'étude interlaboratoires, lors de la première demande de validation.

Suite à la décision de certification initiale, de reconduction ou d'extension de validation d'une méthode, le Laboratoire expert doit ensuite établir un document de synthèse des études (préliminaire et interlaboratoires) sur la base des modèles de rapport d'études présentés en [annexe 6](#), avec les précisions ci-après :

- Il doit reprendre les éléments importants de ces études, et uniquement ceux validés.
- Il a pour objectif de pouvoir être diffusé à toute personne en faisant la demande. Aussi le fabricant doit en valider le contenu, quant à la confidentialité des éléments qui y figurent.
- Il doit être adressé par le Laboratoire expert à AFNOR Certification au plus tard 2 mois après le vote positif du Bureau Technique.

Les rapports de synthèse publiés sont mis à disposition du public, par AFNOR Certification, sur le site <http://nf-validation.afnor.org>.

H. Traitements des modifications/extensions

Les modalités générales de traitement des extensions/modifications sont définies au § 5.4 des règles de certification NF102. Les exemples qui y sont spécifiés ne s'appliquent pas aux méthodes alternatives pour le dépistage des résidus d'antibiotiques. C'est pourquoi des dispositions spécifiques ont été définies, reprises ci-après.

En cas de demande d'extension (par ex. nouvelle matrice), postérieure à la première étude de validation, présentée sur la base d'un protocole de test identique, une étude préliminaire complémentaire doit être conduite par le Laboratoire expert. Une étude d'applicabilité sera requise pour valider les extensions/modifications.

Des exemples de modifications sur la méthode alternative devant donner lieu à une étude complémentaire par un Laboratoire expert sont présentés ci-dessous :

- Lecture instrumentale à la place de lecture visuelle,
- Matrices,
- Format du test,
- Conservateurs ou pas.

Si l'applicabilité de la méthode alternative suite à cette modification est prouvée lors de cette étude complémentaire, la nécessité de refaire une étude interlaboratoires sera évaluée par le Bureau Technique.

Si les résultats de l'étude d'applicabilité lors de cette étude complémentaire ne sont pas satisfaisants (spécificité et/ou CC β différents de ceux obtenus lors de la validation initiale avec la première matrice), une étude de validation complète devra être réalisée. Donc une nouvelle demande de certification devra être déposée par le demandeur.

Dans le cas d'une nouvelle famille d'antibiotiques ajoutée au champ d'application (bandelettes...), il s'agit d'une nouvelle demande de certification (la méthode alternative ne peut être considérée comme le même produit initialement validé).

Le rapport de synthèse initial sera complété par la synthèse des compléments d'étude effectués.

I. Cas de la reconduction

Les modalités de traitement des études de reconduction sont définies au § 5.3 des règles de certification NF102.

Le rapport de synthèse sera constitué d'un rappel des principaux résultats obtenus lors de la première étude de validation et éventuellement lors des études d'extension, ainsi que de la synthèse des compléments d'étude de reconduction effectués.

J. Références

2002. Commission Decision (EC) N° 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off J Eur Comm. L221*: 8-36.

2009. Commission Regulation (EC) N° 470/2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin *Official Journal of the European Union L152*: 11-22.

NF EN FDIS 16140-2 *Microbiologie des aliments – Validation des méthodes – Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence. In 2016.*

5725-2 NI, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. In Partie 1: Principes généraux et définitions; ISO 5725-2 Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée; Partie 4: Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée., 1994.*

Bourdat-Deschamps M. 2010. *Validation de l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux de pluie par la méthode du profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra. 85-98.*

CRL. 2010. *Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Available from: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm>: Guideline_Validation_Screening_en.pdf. 1-18.*

Feinberg M. 2007. *Validation of analytical methods based on accuracy profiles. J. Chromatogr. A. 1158:174-183.*

Feinberg M. 2010a. *Interprétation du profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra. 45-60.*

Feinberg M. 2010b. *Mise en oeuvre du profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra. 27-44.*

Gaugain M, Chotard M-P, Verdon E. 2013. *Stability Study for 53 Antibiotics in Solution and in Fortified Biological Matrixes by LC/MS/MS. J. AOAC Int. 96:471-480.*

Goupy J, *Introduction aux plans d'expériences. 2001; p 293.*

Goupy J. 2005. *What kind of experimental design for finding and checking robustness of analytical methods? Analytica Chimica Acta Papers Presented at the 9th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry. 544:184-190.*

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E. 2008. *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal: Part IV. Examples of application. J. Pharm. Biomed. Anal. 48:760-771.*

Annexe 1. Liste des antibiotiques à valider en fonction du type de test et des antibiotiques ciblés par le test.

LAIT

Test à large spectre : 20 antibiotiques à valider dans le lait de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Pénicilline G	4
	Amoxicilline	4
	Cloxacilline	30
	Céfalexine	100
	Céfalonium	20
	Somme de céfapirine et de désacétylcéfapirine (métabolite)	60
	Cefquinome	20
	Somme de tous les résidus conservant la structure betalactam exprimée en tant que desfuroylceftiofur (métabolite)	100
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
MACROLIDES	Tylosine	50
	Erythromycine A	40
AMINOSIDES	Dihydrostreptomycine	200
	Néomycine B	1500
	Somme de gentamicine C1, gentamicine C1a, gentamicine C2 et gentamicine C2a	100
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacinine et de ciprofloxacine	100
LINCOSAMIDES	Lincomycine	150

Test spécifique bêta-lactamines : 8 antibiotiques à valider dans le lait de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Pénicilline G	4
	Amoxicilline	4
	Cefalexine	100
	Céfalonium	20
	Somme de céfapirine et de désacétylcéfapirine (métabolite)	60
	Cefquinome	20
	Somme de tous les résidus conservant la structure betalactam exprimée en tant que desfuroylceftiofur (métabolite)	100
	Cloxacilline	30

Test spécifique tétracyclines : 3 antibiotiques à valider dans le lait de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100

Test spécifique sulfamides : 6 antibiotiques à valider dans le lait de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
	Sulfadoxine	100
	Sulfadimidine (sulfamethazine)	100
	Sulfaméthoxazole	100
	Sulfachlorpyridazine	100

Test spécifique macrolides : 4 antibiotiques à valider dans le lait de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
MACROLIDES	Erythromycine A	40
	Tylosine	50
	Tilmicosine	50
	Somme de spiramycine et néospiramycine	200

Test spécifique aminosides : 4 antibiotiques à valider dans le lait de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AMINOSIDES	Dihydrostreptomycine	200
	Streptomycine	200
	Néomycine B	1500
	Somme de gentamicine C1, gentamicine C1a, gentamicine C2 et gentamicine C2a	100

Test spécifique quinolones : 4 antibiotiques à valider dans le lait de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacine	100
	Marbofloxacine	75
	Danofloxacine	30
	Fluméquine	50

MUSCLE**Test à large spectre : 15 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces.**

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Pénicilline G	50
	Amoxicilline	50
	Cloxacilline	300
	Céfalexine	200
	Somme de tous les résidus conservant la structure betalactam exprimée en tant que desfuroylceftiofur	1000
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Doxycycline	100
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
MACROLIDES	Erythromycine A	200
	Tylosine	100
AMINOSIDES	Dihydrostreptomycine	500
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacinine et de ciprofloxacine	100
LINCOSAMIDES	Lincomycine	100
POLYPEPTIDES	Somme des métabolites pouvant être hydrolysés en 8-a-hydroxymutiline	100 (porc, volaille, lapin)

Test spécifique bêta-lactamines : 6 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Pénicilline G	50
	Amoxicilline	50
	Cloxacilline	300
	Céfalexine	200
	Somme de tous les résidus conservant la structure betalactam exprimée en tant que desfuroylceftiofur	1000
	Cefquinome	50

Test spécifique tétracyclines : 7 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Doxycycline	100

Test spécifique sulfamides : 6 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
	Sulfadoxine	100
	Sulfadimidine (sufaméthazine)	100
	Sulfaméthoxazole	100
	Sulfachlorpyridazine	100

Test spécifique macrolides : 6 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
MACROLIDES	Erythromycine A	200
	Tylosine A	100
	Tilmicosine	50 (toutes espèces) / 75 (volaille)
	Somme de spiramycine et néospiramycine	200 (bovin, volaille)
	Spiramycine 1	250 (porc)
	Somme de tylvalosine et de 3-O-acétyltylosine et 3-O-acétyltylosin	50 (porc)

Test spécifique aminosides : 6 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AMINOSIDES	Dihydrostreptomycine	500
	Streptomycine	500
	Néomycine B	500
	Somme de gentamicine C1, gentamicine C1a, gentamicine C2 et gentamicine C2a	50 (bovin, porcin)
	Spectinomycine	300
	Paromomycine	500

Test spécifique quinolones : 6 antibiotiques à valider dans le muscle de différentes espèces.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacine	100
	Marbofloxacine	150
	Danofloxacine	200 (bovin, volaille) / 100 (porc)
	Difloxacine	400 / 300 (volaille)
	Fluméquine	50 / 400 (dinde)

PRODUITS D'AQUACULTURE

Test à large spectre : 11 à 18 antibiotiques à valider dans différents produits d'aquaculture.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	<i>Amoxicilline</i>	50
TETRACYCLINES	Oxytétracycline	100
	<i>Chlortétracycline</i> <i>Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)</i>	100
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
MACROLIDES	<i>Erythromycine A</i>	200
	Tylosine	100
AMINOSIDES	<i>Néomycine B</i>	500
	Spectinomycine	300
QUINOLONES	Somme d'enrofloxaciné et de ciprofloxacine	100
	Fluméquine	600
	Acide oxolinique	100
	<i>Sarafloxacine</i>	30
LINCOSAMIDES	Lincomycine	100
	Colistine	150
PHENICOLES	Somme du florfénicol et de ses métabolites mesurés comme florfénicolamine	1000
	Thiamphénicol	50
	Triméthoprime	50

En gras, les antibiotiques prioritaires en Europe.

En italique, antibiotiques d'intérêt en supplément.

Les autres antibiotiques ont une LMR mais présentent moins d'intérêt liés aux usages.

Référence : Joint FAO/WHO/OIE Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance (Seoul, South Korea, June 13-16, 2006). Towards a risk analysis of antimicrobial use in aquaculture

Victoria Alday, Benjamin Guichard, Peter Smith, Carl Umland.

Test spécifique bêta-lactamines : 6 antibiotiques à valider dans différents produits d'aquaculture.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Pénicilline G	50
	Amoxicilline	50
	Ampicilline	50
	Cloxacilline	300
	Dicloxacilline	300
	Oxacilline	300

Test spécifique tétracyclines : 7 antibiotiques à valider dans différents produits d'aquaculture.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Doxycycline	100

Test spécifique sulfamides : 6 antibiotiques à valider dans différents produits d'aquaculture.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
	Sulfadoxine	100
	Sulfadimidine (sufaméthazine)	100
	Sulfaméthoxazole	100
	Sulfachlorpyridazine	100

Test spécifique macrolides : 6 antibiotiques à valider dans différents produits d'aquaculture.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
MACROLIDES	Erythromycine A	200
	Tylosine A	100
	Tilmicosine	50
	Somme de spiramycine et néospiramycine	/
	Somme de tylvalosine et de 3-O-acétyltylosine et 3-O-acétyltylosin	/

Test spécifique aminosides : 6 antibiotiques à valider dans différents produits d'aquaculture.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AMINOSIDES	Néomycine B	500
	Spectinomycine	300
	Paromomycine	500
	Dihydrostreptomycine	/
	Streptomycine	/
	Somme de gentamicine C1, gentamicine C1a, gentamicine C2 et gentamicine C2a	/

Test spécifique quinolones : 7 antibiotiques à valider dans différents produits d'aquaculture.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacine	100
	Danofloxacine	100
	Difloxacine	300
	Fluméquine	600
	Acide oxolinique	100
	Sarafloxacine	30

OEUFS**Test à large spectre : 13 antibiotiques à valider dans les œufs.**

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Amoxicilline	/
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	200
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	200
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	200
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	/
	Sulfadiazine	/
MACROLIDES	Erythromycine A	150
	Tylosine A	200
AMINOSIDES	Néomycine B	500
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacine	/
LINCOSAMIDES	Lincomycine	50
POLYPEPTIDES	Colistine	300
DIVERS	Somme des métabolites pouvant être hydrolysés en 8-a-hydroxymutiline	1000

Test spécifique bêta-lactamines : 7 antibiotiques à valider dans les œufs.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Pénicilline G	/
	Amoxicilline	/
	Ampicilline	/
	Cloxacilline	/
	Dicloxacilline	/
	Oxacilline	/
	Somme de céfapirine et de désacétylcéfapirine (métabolite)	/

Test spécifique tétracyclines : 7 antibiotiques à valider dans les œufs.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	100
	Doxycycline	100

Test spécifique sulfamides : 6 antibiotiques à valider dans les œufs.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	/
	Sulfadiazine	/
	Sulfadoxine	/
	Sulfadimidine (sufaméthazine)	/
	Sulfaméthoxazole	/
	Sulfachlorpyridazine	/

Test spécifique macrolides : 6 antibiotiques à valider dans les œufs.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
MACROLIDES	Erythromycine A	150
	Tylosine A	200
	Tilmicosine	/
	Somme de spiramycine et néospiramycine I	/
	Josamycine	/

Test spécifique aminosides : 6 antibiotiques à valider dans les œufs.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AMINOSIDES	Néomycine B	500
	Spectinomycine	/
	Paromomycine	/
	Dihydrostreptomycine	/
	Streptomycine	/
	Somme de gentamicine C1, gentamicine C1a, gentamicine C2 et gentamicine C2a	/

Test spécifique quinolones : 6 antibiotiques à valider dans les œufs.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacin	/
	Danofloxacin	/
	Difloxacin	/
	Fluméquin	/
	Sarafloxacin	/

MIEL**Test à large spectre : 15 antibiotiques à valider dans différents types de miel.**

FAMILLE	Antibiotiques	CR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Amoxicilline	/
TETRACYCLINES	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	20
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	20
SULFAMIDES	Sulfadimidine (sufaméthazine)	50
	Sulfathiazol	50
	Sulfaméthoxazole	50
MACROLIDES	Erythromycine A	20
	Tylosine	20
AMINOSIDES	Streptomycine	40
	Dihydrostreptomycine	40
QUINOLONES	Somme d'enrofloxaciné et de ciprofloxacine	/
	Norfloxacine	/
LINCOSAMIDES	Lincomycine	/
	Triméthoprime	/

Pas de LMR dans le miel.

CR : Concentration Recommandée (document des LRUE 2007).

Test spécifique tétracyclines : 7 antibiotiques à valider dans différents types de miel.

FAMILLE	Antibiotiques	CR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
TETRACYCLINES	Chlortétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	20
	Oxytétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	20
	Tétracycline Somme de la substance mère et de ses épimères en 4 (métabolite)	20
	Doxycycline	20

Test spécifique sulfamides : 8 antibiotiques à valider dans différents types de miel.

FAMILLE	Antibiotiques	CR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	50
	Sulfadiazine	50
	Sulfathiazol	50
	Sulfadimidine (sufaméthazine)	50
	Sulfaméthoxazole	50
	Sulfachlorpyridazine	50
	Sulfapyridine	50
	Sulfaquinoxaline	50

Test spécifique macrolides : 6 antibiotiques à valider dans différents types de miel.

FAMILLE	Antibiotiques	CR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
MACROLIDES	Erythromycine A	20
	Tylosine A	20
	Tylosine B = desmycosine	20
	Tilmicosine	/
	Somme de spiramycine et néospiramycine	/
	Josamycine	/

Test spécifique aminosides : 6 antibiotiques à valider dans différents types de miel.

FAMILLE	Antibiotiques	CR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AMINOSIDES	Dihydrostreptomycine	40
	Streptomycine	40
	Néomycine B	/
	Somme de gentamicine C1, gentamicine C1a, gentamicine C2 et gentamicine C2a	/
	Spectinomycine	/
	Paromomycine	/

Test spécifique quinolones : 7 antibiotiques à valider dans différents types de miel.

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
QUINOLONNES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacin	/
	Ciprofloxacin	/
	Norfloxacin	/
	Marbofloxacin	/
	Danofloxacin	/
	Difloxacin	/
	Fluméquine	/

Annexe 2. Tableau pour la préparation et la conservation des solutions mères d'antibiotiques (à 0.5 mg/mL).

Famille	Antibiotique	Solvant (s) de dilution	Température de stockage (°C)	Durée de stockage maximale (jours)
PENICILLINES	Amoxicilline	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	>358
	Ampicilline	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	31
	Pénicilline G	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	218
	Pénicilline V	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	299
	Oxacilline	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	>358
	Cloxacilline	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	>358
	Nafcilline	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	74
	Dicloxacilline	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	74
CEPHALOSPORINES	Cephapirine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	>353
	Cafquinome	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	49
	Cafalonium	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	ND
	Cefazoline	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	>353
	Cefalexine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	>353
	Ceftiofur	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	219
	Cefoperazone	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	219
	SULFAMIDES	Sulfaguanidine	Méthanol	-18
Sulfadiazine		Méthanol	-18	>348
Sulfathiazole		Méthanol	-18	>348
Sulfadimerazine		Méthanol	-18	>348
Sulfamethoxyypyridazine		Méthanol	-18	>348
Sulfamonométoxine		Méthanol	-18	>348
Sulfadoxine		Méthanol	-18	>348
Sulfaquinoxaline		Méthanol	-18	>348
MACROLIDES	Sulfadiméthoxine	Méthanol	-18	>348
	Tulathromycine	Méthanol	-18	>350
	Néospiramycine	Méthanol	-18	168
	Spiramycine	Méthanol	-18	>350
	Tilmicosine	Méthanol	-18	>350
	Tylosine	Méthanol	-18	ND
	Tylvalosine	Méthanol	-18	72
	o-acetyltylvalosine	Méthanol	-18	>350
AMINOSIDES	Josamycine	Méthanol	-18	72
	Spectinomycine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	204
	Streptomycine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	204
	Dihydrostreptomycine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	204
	Kanamycine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	105
	Paromomycine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	ND
	Gentamicine C1	Eau-méthanol 50 :50, v/v	-18	36
	Néomycine	Eau-méthanol 50 :50, v/v	+4	105
Lincomycine	Méthanol	-18	204	

Famille	Antibiotique	Solvant (s) de dilution	Température de stockage (°C)	Durée de stockage maximale (jours)
TETRACYCLINES	Tétracycline	Méthanol	-18	203
	Doxycycline	Méthanol	-18	203
	Oxytétracycline	Méthanol	-18	203
QUINOLONES	Acide nalidixique	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	203
	Acide oxolinique	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	203
	Fluméquine	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	203
	Norfloxacin	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	203
	Ciprofloxacine	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	>349
	Danofloxacine	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	105
	Enrofloxacine	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	>349
	Marbofloxacine	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	>350
	Sarafloxacine	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	>351
	Difloxacine	Méthanol + 1 mL NaOH 1M	-18	203

ND : non déterminée

Annexe 3. Sélection d'une à 2 molécules représentatives par famille d'antibiotiques.

LAIT

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
PENICILLINES	Amoxicilline	4
	Cloxacilline	30
CEPHALOSPORINES	Cefalexine	100
TETRACYCLINES	Oxytétracycline	100
	Tétracycline	100
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
MACROLIDES	Tylosine A	
	Erythromycine A	
AMINOSIDES	Dihydrostreptomycine	
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacinine et de ciprofloxacine	
LINCOSAMIDES	Lincomycine	

MUSCLE

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
PENICILLINES	Amoxicilline	50
	Cloxacilline	300
CEPHALOSPORINES	Cefalexine	200
TETRACYCLINES	Chlortétracycline	100
	Oxytétracycline	100
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	100
	Sulfadiazine	100
MACROLIDES	Erythromycine A	200
	Tylosine A	100
AMINOSIDES	Dihydrostreptomycine	500
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacinine et de ciprofloxacine	100
LINCOSAMIDES	Lincomycine	100
POLYPEPTIDES	Somme des métabolites pouvant être hydrolysés en 8-a-hydroxymutiline	100 (porc, volaille, lapin)

PRODUITS D'AQUACULTURE

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Amoxicilline	50
TETRACYCLINES	Oxytetracycline	100
	Chlortetracycline	100
SULFAMIDES	Sulfadiazine	100
MACROLIDES	Erythromycine A	200
AMINOSIDES	Néomycine B	500
	Spectinomycine	300
QUINOLONES	Flumequine	600
	Acide oxolinique	100
LINCOSAMIDES	Lincomycine	100
PHENICOLES	Florfenicol	1000
	Trimethoprim	50

OEUFS

FAMILLE	Antibiotiques	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Amoxicilline	/
TETRACYCLINES	Chlortetracycline	200
SULFAMIDES	Sulfadiméthoxine	/
MACROLIDES	Erythromycine A	150
	Tylosine A	200
AMINOSIDES	Néomycine B	500
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacine	/
LINCOSAMIDES	Lincomycine	50
POLYPEPTIDES	Colistine	300
DIVERS	Somme des métabolites pouvant être hydrolysés en 8-a-hydroxymutiline	1000

MIEL

FAMILLE	Antibiotiques	CR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
BETA-LACTAMINES	Amoxicilline	/
TETRACYCLINES	Oxytetracycline	20
	Tetracycline	20
SULFAMIDES	Sulfathiazol	50
MACROLIDES	Tylosine A	20
AMINOSIDES	Streptomycine	40
QUINOLONES	Somme d'enrofloxacin et de ciprofloxacine	/
LINCOSAMIDES	Lincomycine	/

Annexe 4. Réalisation et interprétation d'un plan expérimental pour l'étude de robustesse.

Un exemple de matrice de plan expérimental est présenté dans le tableau A4.1 suivant.

Le concept de base n'est pas d'étudier une variation à la fois, mais d'introduire plusieurs variations simultanément. Par exemple, désignons par A, B, C, et D les 4 facteurs différents susceptibles d'influencer les résultats si leurs valeurs nominales sont légèrement modifiées. Les valeurs nominales de ces paramètres sont + (valeur haute) ou – (valeur basse) dans le tableau suivant. Cela donne 2^4 soit 32 combinaisons différentes potentielles.

Il est possible de sélectionner un sous-ensemble de huit de ces combinaisons présentant un équilibre entre + et –. Huit déterminations (par ex. 8 séries d'essais différents, 8 jours) utilisant une combinaison des facteurs retenus (A-D) doivent être effectuées. Les résultats des déterminations seront indiqués dans la dernière colonne du tableau. Le résultat observé et mesuré peut être par exemple un taux de résultats faux-négatifs ou faux-positifs, une durée d'incubation, etc.

Tableau A4.1. Exemple de matrice de plan expérimental.

Jour	Niveaux								Résultat observé
	I	A	B	C	D=ABC	AB+CD	AC+BD	BC+AD	
1	+	-	-	-	-	+	+	+	
2	+	+	-	-	+	-	-	+	
3	+	-	+	-	+	-	+	-	
4	+	+	+	-	-	+	-	-	
5	+	-	-	+	+	+	-	-	
6	+	+	-	+	-	-	+	-	
7	+	-	+	+	-	-	-	+	
8	+	+	+	+	+	+	+	+	

Deux niveaux de variation sont étudiés pour chaque facteur (ici 4 facteurs A, B, C et D) : un niveau minimal (-) et un niveau maximal (+). De plus, les interactions entre les différents facteurs peuvent aussi être étudiées.

Exploitation et interprétation des résultats :

Ci-dessous le tableau A4.2 résume les résultats obtenus après l'étude de robustesse. Dans cet exemple, 4 facteurs avaient été choisis et on les a fait varier d'une valeur minimale (-) à une valeur maximale (+), autour de la valeur de référence. On a observé l'impact sur la réponse (taux de faux négatifs, taux de faux-positifs) par rapport à la moyenne calculée pour chaque type de réponse (I). Ici, par exemple la moyenne du taux de faux-négatifs est de 0,63. Le facteur D qui montre une influence de -0,63 est donc un facteur qui influence le résultat, ici il diminue donc le taux de faux-négatifs, ce qui est favorable pour le test. Par contre, le facteur A qui a une influence de +0,63 augmente le taux de faux-négatifs. Le facteur A a donc un impact défavorable sur

le résultat du test. Ce facteur A pourrait remettre en cause la robustesse du test si son impact est très important.

Dans cet exemple, seul le facteur C n'a aucune influence sur les résultats en termes de taux de faux-positifs et de faux-négatifs.

Tableau A4.2. Exemple de résultats d'une étude de robustesse.

	Facteur			Interactions			Moyenne	
	A	B	C	D=ABC	E	F		G
Réponse	A	B	C	D=ABC	AB+CD	AC+BD	BC+AD	I
Taux faux + de	0,63	0,63	-0,05	-0,63	0,63	-0,63	-0,63	0,63
Taux faux - de	0,63	0,63	-0,05	-0,63	0,63	-0,63	-0,63	0,63

Annexe 5. Approche globale du profil d'exactitude.

Protocole expérimental :

Le choix des substances à tester sera le même que pour l'approche justesse et fidélité déterminées individuellement (§ 1.3.2.1 du chapitre III.).

Deux plans d'expérience doivent être construits :

- Un plan d'étalonnage (standards en solution et/ou en matrice), qui sert à estimer la fonction de réponse de la méthode.
- Un plan de validation (standards supplémentés dans la matrice), qui sert à déterminer les caractéristiques de validation.

Tableau A5.1. Construction des plans d'expérience (étalonnage et validation).

	Plan d'étalonnage	Plan de validation
Niveaux de concentration	k' niveaux, nombre k' ≥ 1	k niveaux, k ≥ 3
Nombre de séries	l séries réparties sur l jours, nombre l ≥ 3	l séries réparties sur l jours, nombre l ≥ 3
Nombre de répétitions	J' répétitions, nombre recommandé J' ≥ 2 , au choix pour chaque étalon et pour chaque série	J répétitions, nombre J ≥ 2 , constant pour chaque série
Nombre total d'essais	l*J'*k' essais	l*J*k essais

En résumé, les résultats bruts sont utilisés pour choisir le modèle d'étalonnage optimal et construire le profil d'exactitude.

Choix du modèle d'étalonnage :

A partir des résultats du plan d'étalonnage, il est possible de tester plusieurs modèles d'étalonnage et donc de construire plusieurs profils d'exactitude pour les mêmes données (Bourdat-Deschamps 2010). A partir des données du plan de validation dans la matrice, il faut calculer les concentrations retrouvées, pour chaque série l, à partir du modèle d'étalonnage correspondant. Pour cela, la fonction inverse du modèle d'étalonnage est utilisée.

Construction du profil d'exactitude :

Pour construire le profil d'exactitude, il faut tout d'abord fixer les objectifs de la méthode :

- Les limites de tolérance (%) sont liées à la proportion β . Cette proportion est fixée arbitrairement, généralement entre 80 et 95 %, en fonction du champ d'application de la méthode. Elle correspond au pourcentage de résultats qui seront compris en moyenne dans l'intervalle de tolérance calculé.
- Les limites d'acceptabilité ($\pm \lambda$) correspondent aux performances exigées pour la méthode. Elles sont fixées en fonction de l'utilisation prévue en routine (par ex. limites réglementaires (par ex. critères de justesse dans la décision 2002/657/CE (2002)), demande d'un client), parfois en fonction du niveau de concentration. Elles sont exprimées dans la même unité que la grandeur que l'on veut mesurer et encadrent la valeur de référence ; elles permettent de délimiter l'intervalle de dosage.

Ensuite, les calculs de justesse (biais ou recouvrement) et de fidélité sont réalisés, à partir des concentrations retrouvées z , par niveau de concentration k , pour chaque modèle d'étalonnage qui va être testé.

Interprétation du profil d'exactitude :

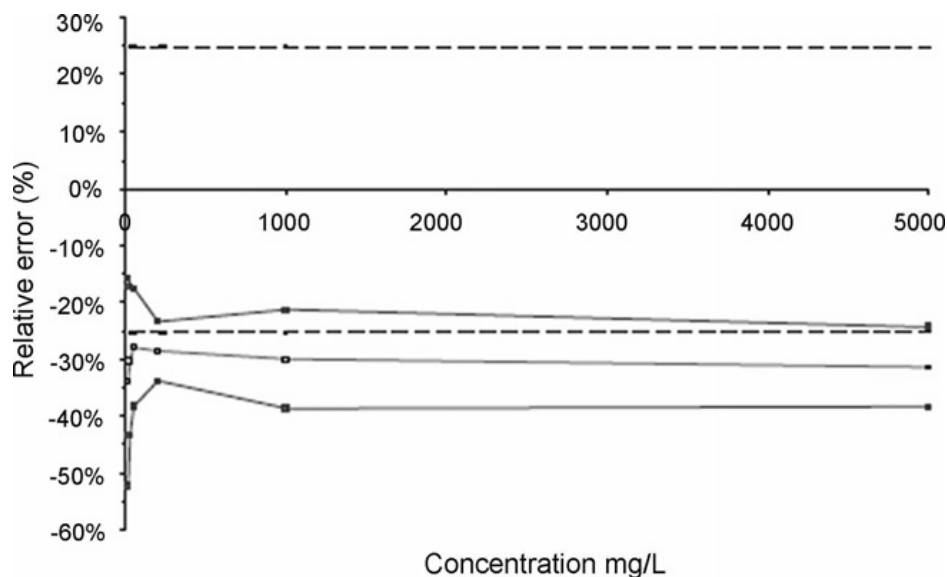
La représentation graphique du profil permet une interprétation visuelle dans un premier temps.

La validité de la méthode va être déterminée en fonction des limites de tolérance et des limites d'acceptabilité.

Pour conclure que la méthode est valide, la majeure partie des intervalles de tolérance doit être compris dans l'intervalle d'acceptabilité. Le domaine de validité de la méthode correspond au domaine dans lequel la proportion de résultats acceptables est au moins égale à β . La partie qui est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité correspond à l'intervalle de dosage. De plus, une limite de quantification (LOQ) basse et une limite de quantification haute vont pouvoir être dérivées du profil d'exactitude. La LOQ basse correspond à la borne inférieure du domaine de validité et la LOQ haute à la borne supérieure du domaine de validité.

Tableau A5.2. Profil d'exactitude extrait de la publication de Hubert *et al.* (Hubert *et al.* 2008).

Profil d'exactitude avec un biais.



Annexe 6. Modèle de rapport pour l'étude préliminaire et pour l'étude interlaboratoires.

I. RAPPORT D'ETUDE PRELIMINAIRE

Il doit contenir en introduction les éléments suivants :

- le nom du Laboratoire expert et de ses sous-traitants éventuels (avec dans ce cas la portée de la sous-traitance),
- le nom du demandeur,
- l'intitulé de la méthode de dépistage à l'étude, et du domaine d'application,
- la date de début et de fin d'étude,
- un résumé des résultats principaux,
- une analyse bibliographique succincte si possible et/ou si nécessaire.

Chacun des critères suivants doit être renseigné :

- le protocole de mesure, et en particulier :
 - mode de préparation des échantillons,
 - nombre et type d'échantillons testés (par ex. types de matrices, contaminations naturelles ou artificielles, etc.),
 - schéma de déroulement d'une analyse.
- L'expression des résultats : Les données brutes doivent être données en annexe.
- L'interprétation des résultats : Des tableaux récapitulatifs pourront résumer l'ensemble des résultats.

La conclusion générale de l'étude préliminaire doit faire apparaître :

- une conclusion pour chacune des caractéristiques étudiées en fonction des critères d'acceptabilité,
- Une conclusion générale (le Laboratoire expert ne doit pas formuler d'avis sur la suite à donner au dossier).

II. RAPPORT D'ETUDE INTERLABORATOIRES

En premier lieu, il doit contenir en introduction les éléments suivants :

- le nom du Laboratoire expert et de ses sous-traitants éventuels (avec dans ce cas la portée de la sous-traitance),
- le nom du demandeur,
- l'intitulé de la méthode de dépistage à l'étude, et du domaine d'application,
- le nombre de laboratoires ayant participé à l'étude, ainsi que les coordonnées de tous ces laboratoires (nom de l'entité, ville, pays),
- la date de début et de fin d'étude,
- un résumé des résultats principaux.

De plus chacun des critères suivants doit être renseigné :

- le protocole de mesure, et en particulier :
 - mode de préparation des échantillons, de stockage et d'envoi,
 - état des échantillons à l'arrivée dans les laboratoires collaborateurs (stabilité) (par ex. échantillons restés congelés jusqu'à l'arrivée),
 - nombre et type d'échantillons testés (par ex. matrices, contaminations naturelles ou artificielles, etc.),
 - choix des molécules et niveaux de concentration testés, nombre d'échantillons exempt de substances à activité antibiotique, etc.,
 - schéma de déroulement d'une analyse.
- L'expression des résultats : Les résultats du Laboratoire expert seront présentés. Les résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs avec la méthode de dépistage doivent être exprimés de façon **anonyme**. Un tableau général présentera les résultats individuels de chaque laboratoire collaborateur. Un 2^{ème} tableau résumera pour chaque matériau et pour la totalité des laboratoires les pourcentages de résultats positifs. L'expression des résultats doit se faire en conformité avec les normes applicables (ISO 5725 (5725-2 1994) pour les méthodes quantitatives). Les données brutes doivent être données en annexe.
- L'interprétation des résultats : Une interprétation doit être faite au vu des résultats bruts. Elle doit notamment rechercher les causes éventuelles de discordance entre les résultats attendus et les résultats obtenus et expliquer chaque cas d'élimination éventuelle de résultats et/ou de laboratoires.

La conclusion générale de l'étude interlaboratoires doit faire apparaître :

- Une conclusion pour chacune des caractéristiques étudiées en fonction des critères d'acceptabilité,
- Une conclusion générale (le Laboratoire expert ne doit pas formuler d'avis sur la suite à donner au dossier).