



**PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES
COMITÉ DU CODEX SUR LES POISSONS ET LES PRODUITS DE LA PÊCHE**

Trente-deuxième session

Bali, Indonésie

1^{er}-5 octobre 2012

**Avant-projet de Critères de performance pour les méthodes de référence et de confirmation des
biotoxines marines dans la Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus**

OBSERVATIONS À L'ÉTAPE 3

(Kenya, États-Unis d'Amérique)

KENYA

Nous appuyons l'intégration de ce document dans la section 1-8.6. Elle constitue une bonne orientation avec un ensemble de valeurs limites indiquant aux producteurs et aux autorités réglementaires ce qu'il convient d'analyser et elle facilite l'interprétation des résultats.

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Observation générale :

Les États-Unis désirent remercier les membres du Comité d'avoir l'occasion de présenter leurs observations sur ce document ainsi que pour le travail du Groupe de Travail électronique qui a préparé ce document soumis au Comité pour examen. Alors que nous sommes de manière générale d'accord sur le fait qu'il peut être souhaitable d'intégrer les critères de la méthode de référence dans la Norme au lieu des méthodes de référence spécifiques, nous restons préoccupés par le fait que les critères proposés ne garantissent pas que les méthodes de référence soient conformes à des critères uniformes. Les critères proposés semblent en outre exclure des méthodes reposant sur la fonctionnalité, notamment la méthode officielle de référence mondialement agréée pour la saxitoxine, le bio-essai sur souris.

La mesure d'importance pour la protection de la santé publique est la toxicité totale des bivalves, et non pas la composition des toxines. La méthode de référence idéale mesurerait directement la toxicité totale à partir de la fonction biologique. Les méthodes multi-analogues ne garantissent pas la détection de toutes les toxines qui contribuent à la toxicité et elles reposent toujours sur un bio-essai pour convertir teneur en toxines en toxicité. Pour le groupe des saxitoxines, le bio-essai sur souris et le test de fixation des récepteurs possèdent les caractéristiques nécessaires pour une méthode de référence applicable à l'échelle mondiale.

Les États-Unis utilisent tant la méthode HPLC (CLHP) multi analogue que le bio-essai sur souris à des fins réglementaires internes et ne désirent pas exclure les méthodes multi-analogues. Les changements des critères que nous suggérons faciliteront en fait l'utilisation des méthodes HPLC (CLHP) multi analogues qui seraient exclues par les critères de la proposition actuelle. Les méthodes de référence multi analogues permettent une identification précise de la composition de toxines si on analyse toutes les toxines potentielles, et si le laboratoire dispose du budget et du savoir faire nécessaire. Nous suggérons des changements dans les critères proposés pour tenir compte de la variabilité de performance des méthodes multi-analogues selon le profil de toxines, ainsi que pour tenir compte de la disponibilité limitée de normes de référence certifiées pour certaines toxines qui peuvent contribuer à la toxicité totale. De plus, nous recommandons l'inclusion de facteurs de conversion uniformes analogues de toxicité afin de permettre

l'utilisation de méthodes multi analogues comme méthodes de référence. Même si les États-Unis appuient l'utilisation appropriée de méthodes multi analogues, nous privilégions encore le bio-essai sur souris comme meilleure méthode de référence actuelle du Codex pour les saxitoxines, parce qu'elle mesure directement la toxicité directe, qu'elle assure une protection fiable dans différentes circonstances et qu'elle est réalisable dans tous les pays.

Nous suggérons de modifier les critères proposés pour garantir la conformité de la méthode selon des critères quantitatifs uniformes et permettre une plus grande souplesse dans le choix de la méthode. Les changements suggérés correspondent aux directives du *Manuel de procédure du Codex* et couvrent le bio-essai sur souris pour le groupe des saxitoxines. L'annexe 1 contient les critères de performance révisés intégrant les recommandations découlant de ces observations.

Observations spécifiques :

Titre de l'avant-projet : Modifier comme suit :

'Avant-projet de Critères de performance pour les méthodes de référence ~~et de confirmation~~ des biotoxines marines (pour inclusion dans la section I-8.6 de la Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus)'

Raison : *Les méthodes qui satisfont aux critères sont des méthodes de référence et pas nécessairement des méthodes de confirmation (p.ex. les méthodes HPLC (CLHP) multi analogues). Par ailleurs, les méthodes de confirmation ne sont pas nécessairement des méthodes de référence (par exemple l'analyse de propriétés physiques/chimiques).*

Ajouter le titre de la section actuelle de la Norme pour les bivalves avec la modification suivante :

'I-8.6 Détermination des biotoxines – **Critères de performance de la méthode**'

Raison : *Par souci de cohérence avec le titre et la numérotation de la section de la norme actuelle sur les bivalves, et pour signaler que les critères de performance de la méthode sont utilisés.*

Généralités : Sortir les généralités de la Norme sur les bivalves.

Raison : *On peut trouver les généralités sur les critères dans le Manuel de procédure du Codex, les rapports de sessions et les rapports de groupes de travail et elles ne sont pas nécessaires dans la Norme sur les bivalves.*

Généralités, 1^{er} paragraphe : Déplacer.

La finalité des critères de la méthode figure clairement dans le Manuel de procédure du Codex et, tout comme une liste de méthodes de référence, ne requiert aucune explication supplémentaire.

La déclaration selon laquelle ces méthodes peuvent 'être utilisées par les autorités compétentes pour choisir des méthodes appropriées pour la surveillance des biotoxines aux fins de réglementation' ne cadre pas avec la finalité centrale des méthodes de référence dans les normes (pour les cas de litiges) et peut tromper parce que toute méthode approuvée par l'autorité compétente, y compris les méthodes de dépistage, est adéquate à des fins réglementaires.

Généralités, 1^{er} paragraphe, 4^{ème} ligne, note de bas de page #1 – définition de la méthode de référence: Supprimer la note de bas de page.

Raison : *Les 'méthodes de référence' sont correctement définies dans les 'Principes pour l'élaboration de méthodes d'analyse du Codex' (Manuel de procédure du Codex) qui stipulent:*

'Méthodes de référence (Type II). Définition : une méthode du type II est celle que l'on désigne comme méthode de référence, lorsque les méthodes du type I ne sont pas applicables. On devrait la choisir parmi les méthodes du type III (définies ci-après). On devrait recommander son emploi dans les cas de litige et aux fins d'étalonnage.'

La note de bas de page est extraite des 'Directives concernant les bonnes pratiques de laboratoire en matière d'analyse de résidus de pesticides' (CAC/GL 40-1993) qui stipulent : 'Ces méthodes ont généralement fait l'objet d'études inter-laboratoires et s'appuient le plus souvent sur la spectrométrie moléculaire.' Le libellé de la note de bas de page proposée a été changé comme suit : 'Ces méthodes n'ont généralement pas fait l'objet d'études inter-laboratoires et s'appuient le plus souvent sur la spectrométrie moléculaire.'

Nous croyons que les méthodes de référence pour les biotoxines devraient généralement faire l'objet d'études inter-laboratoires et que la définition de pesticides n'est pas applicable aux biotoxines d'algues marines pour lesquelles on utilise généralement des méthodes de référence par bio-essai.

Généralités, 2^{ème} paragraphe : Déplacer.

Raison : Les méthodes reposant sur la fonctionnalité, telles que le bio-essai sur souris et le test de fixation des récepteurs ne requièrent pas d'informations sur le profil de toxine présent. Ces informations sont néanmoins critiques pour l'application de méthodes multi analogues et devraient être abordées avec des critères définitifs (plutôt que dans une section sur les généralités).

Généralités, 3^{ème} paragraphe : Déplacer.

Raison : Les orientations sur l'utilisation de méthodes de dépistage et l'évaluation de stratégies réglementaires devraient plutôt se trouver dans la section 7.2.2.3 'Surveillance des biotoxines marines' du Code d'usages pour les poissons et les produits de la pêche.

Principes/critères de performance généraux proposés : Supprimer cette section, ainsi que les dispositions (a) – (g) et remplacer par le libellé suivant :

'I-8.6.1 Critères généraux

(i) Les méthodes de référence seront choisies conformément à la section I-8.6.2 (Méthode de critères numériques) et la section I-8.6.3 (Application de la Méthode de critères numériques) et conformément aux 'Critères généraux régissant le choix des méthodes d'analyse' et aux 'Critères généraux de sélection des méthodes d'analyse validées par un laboratoire unique' du Manuel de procédure du Codex.

(ii) Le choix de la méthode à retenir devrait être guidé par des considérations de faisabilité et il conviendrait de donner priorité aux méthodes dont l'applicabilité convient à un usage régulier.

Raison : Les principes qualitatifs ne sont pas nécessaires dans la norme sur les bivalves et ils pourraient entraîner une application erronée des critères. Le choix de la méthode dans l'approche par critères est systématique et quasiment toutes les méthodes validées qui sont conformes aux critères numériques sont acceptables.

Le Manuel de procédure du Codex contient déjà des critères généraux adéquats et ils sont cités en I-8.6.1(i) ci-dessus. La plupart des critères proposés ne sont pas particuliers aux méthodes visant les biotoxines des algues marines et il n'est pas nécessaire de les répéter dans la Norme. Néanmoins, selon le Manuel de procédure, le critère général figurant en I-8.6.1 (ii) (ci-dessus) doit être inclus lorsqu'on utilise l'approche par critère.

De nombreux critères généraux proposés qui emploient l'expression 'la préférence devrait être donnée' couvrent les mêmes paramètres que les critères numériques proposés. Ces critères 'préférentiels' peuvent avoir pour conséquence que l'on écarte les critères numériques, ou que des arguments subjectifs soient avancés contre des méthodes qui répondent aux critères numériques.

Certains des critères généraux proposés visent des attributs spécifiques de méthodes multi analogues, semblant exclure des méthodes qui mesurent directement la toxicité totale. Les critères spécifiquement nécessaires pour les méthodes multi analogues devraient être repris séparément des dispositions générales.

Nous proposons d'ajouter une nouvelle section après le tableau des critères numériques pour reprendre les dispositions qui expliquent comment appliquer les critères de la toxicité totale aux méthodes multi analogues (voir observations pour la nouvelle section I-8.6.3 'Application de la méthode des critères numériques').

Tableau

Titre du tableau - 'Paramètres des méthodes de performance pour les méthodes de détermination des biotoxines marines' : À revoir comme suit :

'I-8.6.2 Méthode des critères numériques'

Raison : Cohérence avec l'expression 'critères numériques' figurant dans le Manuel de procédure du Codex et harmonisation avec la numérotation de la section dans la Norme sur les bivalves. (Voir l'observation précédente pour le titre de la nouvelle section 'I-8.6 Détermination des biotoxines – Critères de performance de la méthode').

Abréviations des toxines : Déplacer les abréviations dans la colonne avec les noms des toxines en utilisant des parenthèses.

Raison : Mettre les facteurs d'équivalence de toxicité dans la colonne vide (voir observation suivante).

Ajouter les facteurs d'équivalence de toxicité (FET). Par exemple :

Toxine	Facteur d'équivalence de toxicité

Raison : Les facteurs d'équivalence de toxicité devraient être spécifiés parmi les critères afin de permettre l'utilisation de méthodes multi analogues comme méthodes de référence Codex. Si différents FET sont utilisés dans différents pays les résultats ne seront pas comparables. (Voir les observations spécifiques au groupe de toxines pour les valeurs FET recommandées.)

Colonne 'Unités' et colonne 'Concentration maximale': Fusionner les colonnes et les réécrire comme suit :

		Concentration maximale / kg de chair de mollusque
Groupe des saxitoxines	Toxicité totale	≤ 0,8 milligrammes (2HCL) d'équivalent de saxitoxines
Groupe des acides okadaïques	Toxicité totale	≤ 0,16 milligrammes d'équivalent d'acide okadaïque
Groupe des acides domoïques	Acide domoïque	≤ 20 milligrammes d'acide domoïque
Groupe des brevétoxines	Toxicité totale	≤ 200 unités souris ou (0,8 milligrammes d'équivalent de BTX2)
Groupe des azaspiracides	Toxicité totale	≤ 0,16 milligrammes d'équivalent d'AZA1

Raison : Cohérence avec les unités et la terminologie utilisées en section I-5.2 de la Norme des bivalves (dispositions sur les biotoxines).

Limite de détection/Limite de quantification : Supprimer les colonnes et critères LD/LQ.

Raison : La section 1.2 des 'Recommandations relatives à l'établissement de valeurs numériques pour les critères méthodologiques et/ou à l'évaluation de la conformité des méthodes à ces 'critères' du Manuel de procédure du Codex (20^{ème} édition, page 76) indique clairement que les critères LD et LQ ne sont qu'une alternative pour les critères de la fourchette minimale applicable. Il est écrit : 'Pour établir une fourchette applicable maximale, on peut aussi prendre comme critères des valeurs numériques pour les limites de détection et de quantification.'

Les critères de fourchette applicable minimale ont été élaborés dans les critères proposés. Les critères ne devraient pas reprendre des dispositions doubles et contradictoires pour 'l'applicabilité' de la méthode.

Les critères de fourchette minimale applicable sont privilégiés parce que les critères LD/LQ calculés selon le Manuel de procédure du Codex limiteraient de manière injustifiée l'utilisation de méthodes de référence biologiques et instrumentatives largement répandues.

Précision à la LM : Revoir le titre de la colonne comme suit :

'Précision à la LM (RSD_R)'.

Raison : Indiquer que la valeur de précision utilisée est l'écart type relatif (RSD_R) inter-laboratoires, ainsi qu'il figure dans le Manuel de procédure du Codex. (Noter que le point marquant la décimale au début des données dans la colonne devrait être supprimé.)

Récupération : Revoir le titre de la colonne comme suit :

'Pourcentage de récupération'

Raison : Indiquer que les valeurs sont des pourcentages.

Justesse : Supprimer la colonne.

Raison : L'abréviation 'MRC' est répétée dans la colonne pour chaque toxine. Il est plus simple de l'indiquer avec une seule phrase. (Voir l'observation pour 'Toutes les méthodes (ii)' dans la proposition de nouvelle section 'I-8.6.3 application de la méthode des critères numériques')

Fourchette minimale, LD, LQ (critères spécifiques par analogue): Supprimer tous les critères numériques associés à des toxines analogues individuelles.

Raison : Les critères spécifiques par analogue ne permettent pas de garantir que les méthodes couvrent le critère requis de toxicité totale. Les critères spécifiques par analogue sont inutiles, irréalistes et trop restrictifs.

Les 'Recommandations relatives à l'établissement de valeurs numériques pour les critères méthodologiques et/ou à l'évaluation de la conformité des méthodes à ces 'critères' du Manuel de procédure du Codex stipulent que 'Seule la disposition concernant le produit considéré accompagnée de la limite maximale est nécessaire pour établir des valeurs numériques pour les critères méthodologiques.' Il n'y a pas de dispositions pour une limite maximale pour des analogues de toxines individuelles et il ne peut donc pas y avoir de critère individuel significatif. Tous les critères doivent être ramenés aux dispositions de la Norme sur les bivalves relatives aux limites maximales de toxicité totale.

Les critères spécifiques proposés pour les analogues ne garantissent pas la conformité de la méthode selon les critères essentiels de toxicité totale. Par exemple, la somme des fourchettes minimales spécifiques proposées pour les analogues peut dépasser la fourchette minimale de toxicité totale.

Les critères de la méthode multi analogues devrait comprendre une variabilité réaliste de la performance de la méthode pour des analogues de toxines individuelles tant que les critères globaux de toxicité totale sont remplis. Nous recommandons d'utiliser des 'critères relationnels' souples pour garantir que les méthodes multi-analogues remplissent les critères de toxicité totale. (Voir la proposition de nouvelle section 'I-8.6.3 Application de la méthode des critères numériques')

Ajouter une nouvelle section comme suit :

'I-8.6.3 Application de la méthode des critères numériques :'

Raison : Fournir des orientations sur la détermination de la conformité de la méthode par rapport aux critères numériques de toxicité totale. Ajouter des critères relationnels qui garantissent que les méthodes multi-analogues répondent aux critères minimum de fourchette, de précision et de récupération pour la toxicité totale, tout en prévoyant un certaine souplesse pour la performance de la méthode sur des analogues individuels.

Nouvelle section I-8.6.3 : Ajouter les critères suivants sous 'Toutes les méthodes'

'Toutes les méthodes

- i. Toutes les méthodes doivent être conformes aux critères de toxicité totale.**

Raison : Préciser qu'autant les méthodes biologiques qu'instrumentales multi-analogues doivent répondre aux critères reposant sur les limites maximales de toxicité totale de la Norme pour les bivalves.

- ii. On évalue la justesse en utilisant des produits de référence certifiés.'**

Raison : Retiré du tableau. Inutile de répéter 'MRC' pour chaque analogue de toxine du tableau.

Nouvelle section I-8.6.3 : Ajouter les critères suivants sous 'Méthodes multi-analogues'

'Méthodes multi-analogues

- i. Toutes les méthodes doivent être validées et utilisées pour détecter tous les analogues de toxines susceptibles de contribuer à la toxicité totale dans l'échantillon.**

Raison : Garantir que la méthode est applicable à tous les analogues susceptibles d'être présents. Permettre l'ajout ou l'exclusion d'analogues, selon qu'il convient.

- ii. Les méthodes doivent être utilisées avec des produits de référence certifiés pour chaque analyte.**

Raison : Garantir la précision d'identification et de quantification de l'analyte.

- iii. **Il faut utiliser les facteurs d'équivalence de toxicité (FET) repris en I-8.6.2 pour calculer la toxicité totale. Dans le cas de toxines pour lesquelles aucun FET n'est repris, il convient d'utiliser des FET reconnus internationalement.**

Raison : Des FET uniformes sont nécessaires pour permettre l'utilisation de méthodes multi analogues en guise de méthodes de référence.

- iv. **Pour déterminer la conformité de la méthode pour les critères de la 'fourchette minimale applicable de toxicité totale' : La somme des limites validées de quantification (en équivalents de toxicité) pour chaque analogue de toxine susceptible de contribuer à la toxicité totale dans l'échantillon ne doit pas dépasser la limite inférieure du critère de 'fourchette minimale applicable de toxicité totale'.**

Raison : Pour déterminer la conformité de la méthode pour les multi-analogues avec le critère de la fourchette minimale applicable de toxicité totale. Cette disposition admet des limites variables de quantification pour chaque analogue, mais empêche l'utilisation de la méthode quand plusieurs analogues de toxines situés en dessous de la limite de quantification pourraient entraîner une toxicité totale dépassant la limite de la 'fourchette minimale applicable'.

- v. **Déterminer la conformité de la méthode par rapport aux critères de 'précision de la toxicité totale'. On estime la précision de la toxicité totale (RSD_R) de la méthode, pour un échantillon à la limite maximale, avec les données de validation RSD_R pour les analogues individuels aux concentrations constatées dans l'échantillon.**

Exemple (en supposant que les variances des analogues sont indépendantes):

RSD_{R toxicité totale} estimé = sd{a+b+c...}/mg total d'équivalents/kg × 100

$$\text{sd}\{a+b+c+\dots\} = \sqrt{\text{sd}\{a\}^2 + \text{sd}\{b\}^2 + \text{sd}\{c\}^2 + \dots}$$

sd{a} = écart type inter-laboratoires pour la toxine {a} (calculée après conversion en équivalents de toxine) pour la concentration dans l'échantillon.

Note : sd{a} peut être estimé à partir de la RSD_{R{a}} de la validation à la concentration d'analyte la plus proche, c'est à dire. sd{a} = RSD_{R{a}} × mg d'équivalents{a}/kg ÷ 100

Raison : Déterminer la conformité de la méthode multi analogues par rapport aux critères de la 'précision de la toxicité totale'. La précision est différente pour chaque analogue de toxine et chaque valeur ; ainsi la précision de la toxicité totale devrait être estimée pour les profils de toxine mesurés.

- vi. **Déterminer la conformité de la méthode par rapport aux critères de la 'Récupération de la toxicité totale'. La récupération de la toxicité totale est la moyenne pondérée des récupérations des analogues individuels dans un échantillon, pondérés par valeurs d'équivalents de toxine dans l'échantillon.'**

Raison : Déterminer la conformité de la méthode multi analogues par rapport aux critères de la 'récupération de la toxicité totale'. La récupération est différente pour chaque analogue de toxine et la récupération de la toxicité totale devrait donc être calculée pour le profil de toxine mesuré.

Groupe des saxitoxines

Observation générale :

Conformément au constat de la Consultation d'experts ad hoc conjointe FAO, CIO/OMS sur les biotoxines dans les mollusques bivalves' (2004), les États-Unis appuient le bio-essai sur souris (MBA) et estiment qu'il est le meilleur choix de méthode de référence de type II pour le groupe des saxitoxines et convient qu'il reste des limites importantes pour l'utilisation des méthodes HLPC (CLHP) multi analogues. Le rapport des experts conclut que la limite inférieure (0,4 mg d'éq. STX/kg) pour le bio-essai sur souris est adéquate et stipule que le bio-essai sur souris est largement utilisé et protège bien la santé publique depuis plus de 60 ans.

Le bio-essai sur souris sert de référence formelle et de comparaison pour toutes les autres méthodes. Le bio-essai sur souris a servi pendant des études épidémiologiques pour établir une limite maximale sûre de 400 unités souris par 100 grammes de viande. Pour garantir la sécurité sanitaire de la population, les résultats des

autres méthodes doivent permettre une corrélation étroite avec le bio-essai sur souris. La limite maximale dans la Norme sur les bivalves (0,8 mg d'équivalent STX/kg) est une estimation de la limite d'unité souris établie en injectant des quantités connues de saxitoxine purifiée à des souris. Le bio-essai sur souris est également utilisé pour déterminer la toxicité relative des analogues de la saxitoxine afin d'autoriser l'utilisation de méthodes HPLC (CLHP) multi analogues à des fins réglementaires. Le bio-essai sur souris est une 'méthode critère' (Codex Type I) et constitue, selon la procédure Codex, la méthode de référence requise.

Les méthodes HPLC (CLHP) multi analogues ne sont pas des méthodes de confirmation et le bio-essai sur souris sert donc souvent à confirmer des résultats de toxicité totale HPLC (CLHP) tandis que la spectrométrie de masse est utilisée pour confirmer les composés spécifiques détectés.

La performance des méthodes HPLC (CLHP) pour les saxitoxines dépend du profil de toxine analysé. Les paramètres de performance sont différents pour chaque analogue et des erreurs intrinsèques de mesurage pour chaque analogue s'additionnent lorsqu'on calcule la toxicité totale. Lorsque de nombreux analogues à des niveaux faibles contribuent à une forte toxicité totale, la capacité des HPLC (CLHP) à répondre aux critères de performance peut être mise en cause.

Les méthodes multi analogues ne sont pas validées pour certains des analogues de toxines qui contribuent régulièrement à la toxicité des mollusques et il n'existe pas de normes de référence certifiées pour elles. L'Union Européenne a signalé pendant le GTe qu'une méthode HPLC (CLHP) avait sous estimé la toxicité totale d'échantillons du Portugal et de l'Espagne de moitié par rapport au bio-essai sur souris en raison de l'incapacité de la méthode à détecter la présence de GTX6 (B2). Il n'existe pas de normes de référence certifiées pour C3 et C4, dont la contribution à la toxicité totale de mollusques peut être mesurée, en particulier dans l'hémisphère sud.

Les pays en développement auront des difficultés à opérer des laboratoires HPLC multi analogues. L'entretien des équipements et la préparation des échantillons prend du temps et coûte cher. Il faudrait disposer d'experts formés et d'équipements de spectrométrie de masse à des fins de confirmation. Les résultats se font attendre longtemps quand des échantillons sont expédiés de zones de récolte lointaines à des laboratoires spécialisés. L'emploi de méthodes HPLC (CLHP) avec des ressources limitées peut entraîner moins d'analyses, des temps d'attente plus longs, des résultats moins fiables et un plus grand risque pour la santé publique. De nombreux pays ont fait part de leurs préoccupations au cours du GTe et pendant les sessions plénières quant au caractère irréalisable des méthodes HPLC (CLHP) et à la nécessité du bio-essai sur souris. Sans le bio-essai sur souris comme méthode de référence, ces pays peuvent subir des entraves commerciales indirectes.

Les États-Unis appuient l'utilisation de méthodes instrumentales dans la mesure du possible, mais s'opposent à des critères qui excluent le bio-essai sur souris et qui ne tiennent pas compte des limites des méthodes HPLC (CLHP) multi analogues.

Liste de toxines : Ajouter les toxines suivantes et la note correspondante :

N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-1 (C3)	
N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-4 (C4)	
Hydroxybenzoates (GC 1-6)	La contribution des hydroxybenzoates à la toxicité totale dans les bivalves doit être déterminée.

Raison : Il conviendrait de reprendre dans la liste tous les analogues qui peuvent contribuer à la toxicité totale. Les analogues pour lesquels il n'y a pas de méthode validée et/ou de norme de référence certifiée ne devraient pas être ignorés. Il n'est pas nécessaire de quantifier un analogue qui ne peut en aucun cas contribuer à la toxicité totale. (Voir observation pour la proposition de section I-8.6.3 (i) plus haut).

On sait que C3 et C4 contribuent de manière mesurable à la toxicité de bivalves dans l'hémisphère sud ainsi que dans une moindre mesure dans le nord-est Pacifique. Les hydroxybenzoates lipophiles sont un composant majeur dans les algues et leur importance pour la toxicité dans les espèces bivalves doit être déterminée.

Liste de toxines. Ajouter la mention suivante :

'Les méthodes multi analogues doivent directement quantifier ces analytes (ou, en l'absence de toxines N-sulfocarbamyle, ils doivent être quantifiés directement par hydrolyse) lorsque ces toxines peuvent être présentes et contribuer à la toxicité totale.

Raison : Expliquer l'utilisation de la liste. Admettre l'hydrolyse pour déterminer les toxines N-sulfocarbamyle en l'absence de produit de référence certifié.

Ajouter les facteurs d'équivalence de toxicité suivants :

Toxine	Facteurs d'équivalence de toxicité
Saxitoxine (STX)	1.000
Néosaxitoxine (NEO)	0.924
Décarbamyle-saxitoxine (dcSTX)	0.513
Décarbamyle-néosaxitoxine (dcNEO)	
Gonyautoxine-1 (GTX1)	0.994
Gonyautoxine-2 (GTX2)	0.359
Gonyautoxine-3 (GTX3)	0.638
Gonyautoxine-4 (GTX4)	0.726
Gonyautoxine-5 (B1)	0.064
Gonyautoxine-6 (B2)	
Décarbamyle-gonyautoxine-2 (dcGTX2)	0.154
Décarbamyle-gonyautoxine-3 (dcGTX3)	0.377
N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-1 (C3)	0.013
N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-2 (C1)	0.006
N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-3 (C2)	0.096
N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-4 (C4)	0.058
Hydroxybenzoates (GC1 - 6)	

Raison : Il faut des FET (voir observation plus haut). Les États-Unis recommandent d'utiliser les FET internationalement reconnus publiés par Oshima (1995). Aucun FET oral n'a encore été établi, mais les FET intra-péritonéens sur souris d'Oshima permettent de bien protéger la santé publique depuis plus de 15 ans.

Toxicité totale, fourchette minimale :

Remplacer la fourchette de '0,26 – 1, 34' par '**0,40 – 1,20**'.

Raison :

Corriger la valeur de la 'fourchette minimale applicable' conformément à la section 1.1 des 'Recommandations relatives à l'établissement de valeurs numériques pour les critères méthodologiques et/ou à l'évaluation de la conformité des méthodes à ces 'critères' du Manuel de procédure du Codex. La concentration appropriée pour le calcul de la 'fourchette minimale applicable' est de 10^{-6} (0,000 001), plutôt que de 10^{-7} (0,000 000 1), car cette valeur est la plus proche de la concentration dans l'analyte à la limite maximale. La concentration exacte est de 0,8 mg/1 000 000 mg ou 0,000 000 8 ce qui donne une 'fourchette minimale applicable' de 0,403 à 1,197.

Ce changement correspond aux observations faites par les Pays-Bas et la Norvège pendant le premier tour du groupe de travail biotoxines et correspond également au résultat du 'Tableur de calcul du Codex, Comité d'analyse alimentaire Nordique' cité par la Norvège.

Il convient de noter que l'équation Horwitz/Thompson sur laquelle repose ce calcul est une courbe continue empirique qui trace le rapport entre les RSD inter-laboratoires et la concentration dans l'analyte ; il est donc approprié d'utiliser la concentration la plus proche ou exacte.

Il convient de noter que cette correction permet d'utiliser l'AOAC 959.08 (bio-essai sur souris) qui donne satisfaction dans cette fourchette.

Toxicité totale, Précision à la LM : Remplacer le critère RSD_R ".44%" par "**33%**"

Raison : Lorsqu'on utilise la concentration exacte (0,000 000 8), le calcul de précision (Manuel de procédure du Codex, p. 53) donne un RSD_R maximum = 33,1% (Voir l'observation sur la concentration pour la 'fourchette minimale' ci-dessus.)

Groupe des acides domoïques

Acide épidoïmoïque : Supprimer cet analogue de la liste de toxines.

Raison : Seul l'acide domoïque a une limite maximale dans la Norme sur les bivalves. On ne peut pas inclure l'acide épidoïmoïque parmi les critères sans changer la disposition sur les LM de la Norme.

Par rapport à l'acide domoïque, l'acide épidoïmoïque n'existe dans la nature qu'à des concentrations très faibles ; l'acide domoïque dépasse la limite maximale avant que l'on ne puisse quantifier l'acide épidoïmoïque. Il n'existe pas de méthode validée ou de facteur d'équivalence de toxicité pour l'acide épidoïmoïque.

Groupe des acides okadaïques

Ajouter les facteurs d'équivalence de toxicité suivants :

Toxine	Facteurs d'équivalence de toxicité
AO	1
DTX1	1
DTX2	0.6
Esters de AO, DTX1 et DTX2 (Esters-FA)	FET porteur

Raison : Il faut des FET. Les FET proviennent de : 'L'opinion du Groupe scientifique sur les contaminants dans la chaîne alimentaire à la demande de la Commission Européenne sur les biotoxines marines dans les mollusques - acide okadaïque et analogues', *The EFSA Journal* (2008) Volume 589, 1-62.

Liste de toxines : AO, DTX1, DTX2 : Ajouter la mention suivante :

'Les méthodes multi-analogues doivent quantifier ces analytes'

Raison : Expliquer l'utilisation de la liste et être cohérent avec la note pour les Esters FA'.

Esters-FA, 'les méthodes devraient détecter cet analyte directement ou après hydrolyse': A revoir comme suit :

'Les méthodes **multi-analogues doivent détecter** quantifier cet analyte directement ou après hydrolyse.'

Raison : Si ces analogues peuvent contribuer à la toxicité totale ils doivent être quantifiés. Il n'est pas nécessaire de quantifier des toxines spécifiques pour les méthodes reposant sur l'activité biomoléculaire.

Groupe des azaspiracides

Ajouter les facteurs d'équivalence de toxicité suivants :

Toxine	Facteurs d'équivalence de toxicité
Azaspiracide-1 (AZA1)	1
Azaspiracide-2 (AZA2)	1.8
Azaspiracide-3 (AZA3)	1.4

Raison : Il faut des FET. Les FET proviennent de : 'L'opinion du Groupe scientifique sur les contaminants dans la chaîne alimentaire à la demande de la Commission Européenne sur les biotoxines marines dans les mollusques – azaspiracides', *The EFSA Journal* (2008), 723, 1-52.

Liste de toxines. Ajouter la disposition suivante :

'Les méthodes multi-analogues doivent quantifier ces analytes'

Raison : Expliquer l'utilisation de la liste.

Groupe des brévétoxines

Liste de toxines : Ajouter la note suivante à la liste de toxines :

‘Il faut encore déterminer les dérivés susceptibles de contribuer à la toxicité totale du groupe de brévétoxines dans les mollusques.’

Raison : Les brévétoxines 1 et 2 sont dérivées dans les mollusques bivalves et peuvent être insignifiantes. Les dérivés significatifs de brévétoxines dépendent de l'espèce de bivalve et doivent être déterminés.

Limite maximale : Indiquer de la manière suivante les limites maximales en unités souris (MU) avec les équivalents de BTX-2 entre parenthèses :

“74 – 326 MU (0.26 – 1.34 mg eq. BTX2)”

Raison : La limite maximale de brévétoxine dans la Norme sur les bivalves est exprimée en unités souris et doit figurer comme telle dans les critères. La 'American Public Health Association' utilise de manière prédominante le bio-essai sur souris et celui-ci est recommandé dans le Rapport d'experts FAO/CIO/OMS. Par cohérence terminologique, on utilise “BTX2” au lieu de “PbTx-2”.

Annexe 1: Révision du projet de Critères de performance

I-8.6 Détermination des biotoxines

I-8.6.1 Critères généraux

(i) Les méthodes de référence seront choisies conformément à la section I-8.6.2 (Méthode de critères numériques) et la section I-8.6.3 (Application de la Méthode de critères numériques) et conformément aux ‘Critères généraux régissant le choix des méthodes d’analyse’ et aux ‘Critères généraux de sélection des méthodes d’analyse validées par un laboratoire unique’ du *Manuel de procédure du Codex*.

(ii) Le choix de la méthode à retenir devrait être guidé par des considérations de faisabilité et il conviendrait de donner priorité à des méthodes dont l’applicabilité convient à un usage régulier.

I-8.6.2 Méthode des critères numériques

Groupe	Toxine	Facteurs d'équivalence de toxicité	Concentration maximale / kg de chair de mollusque	Fourchette minimale applicable	Précision (RSD _R) ¹ .	Pourcentage de récupération
Groupe des saxitoxines (STX)	Toxicité totale		≤ 0,8 milligrammes (2HCL) d'équivalent de saxitoxines	0,4 – 1,2	33%	70 – 120
	Saxitoxine (STX)	1.000	Les méthodes multi analogues doivent directement quantifier ces analytes (ou, en l'absence de toxines N-sulfocarbamyle, ils doivent être quantifiés directement par hydrolyse) lorsque ces toxines peuvent être présentes et contribuer à la toxicité totale.			
	Néosaxitoxine (NEO)	0.924				
	Décarbamyle-saxitoxine (dcSTX)	0.513				
	Décarbamyle-néosaxitoxine (dcNEO)					
	Gonyautoxine-1 (GTX1)	0.994				
	Gonyautoxine-2 (GTX2)	0.359				
	Gonyautoxine-3 (GTX3)	0.638				
	Gonyautoxine-4 (GTX4)	0.726				
	Gonyautoxine-5 (B1)	0.064				
	Gonyautoxine-6 (B2)					
	Décarbamyle-gonyautoxine-2 (dcGTX2)	0.154				
	Décarbamyle-gonyautoxine-3 (dcGTX3)	0.377				
	N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-1 (C3)	0.013				
	N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-2 (C1)	0.006				
	N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-3 (C2)	0.096				
N-sulfocarbamyle-gonyautoxine-4 (C4)	0.058					
Hydroxybenzoates (GC1 - 6)		La contribution des hydroxybenzoates à la toxicité totale dans les bivalves doit être déterminée.				
Groupe des acides okadaïques (AO)	Toxicité totale		≤ 0,16 milligrammes d'équivalent d'acide okadaïque	0,05 – 0,27	44%	70 - 120
	Acide okadaïque (AO)	1.0	Les méthodes multi-analogues doivent quantifier ces analytes			
	Dinophysistoxine-1 (DTX1)	1.0				

	Dinophysistoxine-2 (DTX2)	0.6				
	Esters de AO, DTX1 et DTX2 (Esters-FA)	FET porteur	Les méthodes multi-analogues doivent quantifier ces analytes directement ou après hydrolyse.			
Groupe des acides domoïques (AD)	Acide Domoïque (AD)		≤ 20 milligrammes d'acide domoïque	13,2 – 26,8	22%	85 - 110
Groupe des brévétotoxines (BTX)	Toxicité totale		≤ 200 unités souris ou (0,8 milligrammes d'équivalent de BTX2)	74 – 326 MU (0,26 – 1,34 mg d'eq. BTX2)	44%	70 - 120
	Brévétotoxine-1 (BTX1)		Il faut déterminer les dérivés susceptibles de contribuer à la toxicité totale du groupe de brévétotoxines dans les mollusques.			
	Brévétotoxine-1 (BTX1)					
	Dérivés de brévétotoxine-1 (devBTX1)					
	Dérivés de brévétotoxine-2 (devBTX2)					
Groupe des azaspiracides (AZP)	Toxicité totale		≤ 0,16 milligrammes d'équivalent d'AZA1	0.05 – 0.27	44%	70 - 120
	Azaspiracide-1 (AZA1)	1.0	Les méthodes multi-analogues doivent quantifier ces analytes.			
	Azaspiracide-2 (AZA2)	1.8				
	Azaspiracide-3 (AZA3)	1.4				

I-8.6.3 Application de la méthode des critères numériques :

Toutes les méthodes :

- i. Toutes les méthodes doivent être conformes aux critères numériques de 'toxicité totale'.
- ii. On évalue la 'justesse' en utilisant des produits de référence certifiés.

Méthodes multi-analogues :

- i. Les méthodes validées doivent être utilisées pour détecter tous les analogues de toxines susceptibles de contribuer à la toxicité totale dans l'échantillon.
- ii. Les méthodes doivent être utilisées avec des produits de référence certifiés pour chaque analyte.
- iii. Il faut utiliser les facteurs d'équivalence de toxicité (FET) repris en I-8.6.2 pour calculer la toxicité totale. Dans le cas de toxines pour lesquelles aucun FET n'est repris, il convient d'utiliser des FET reconnus internationalement.
- iv. Pour déterminer la conformité de la méthode pour les critères de la 'fourchette minimale applicable de toxicité totale' : La somme des limites validées de quantification (en équivalents de toxicité) pour chaque analogue de toxine susceptible de contribuer à la toxicité totale dans l'échantillon ne doit pas dépasser la limite inférieure du critère de la 'fourchette minimale applicable de toxicité totale'.
- v. Déterminer la conformité de la méthode par rapport aux critères de la 'précision de la toxicité totale'. On estime la précision de la toxicité totale (RSD_R) de la méthode pour un échantillon à la limite maximale avec les données de validation RSD_R pour les analogues individuels aux concentrations constatées dans l'échantillon.

Exemple (en supposant que les variances des analogues sont indépendantes):

$$RSD_{R \text{ toxicité totale}} \text{ estimé} = \text{sd}\{a+b+c\dots\} / \text{mg total d'équivalents/kg} \times 100$$

$$\text{sd}\{a+b+c\dots\} = \sqrt{\text{sd}\{a\}^2 + \text{sd}\{b\}^2 + \text{sd}\{c\}^2 + \dots}$$

$\text{sd}\{a\}$ = écart type inter-laboratoires pour la toxine {a} (calculée après conversion en équivalents de toxine) pour la concentration dans l'échantillon.

Note : $\text{sd}\{a\}$ peut être estimé à partir de la $RSD_{R\{a\}}$ à la concentration la plus proche, c'est-à-dire $\text{sd}\{a\} = RSD_{R\{a\}} \times \text{mg d'équivalents}\{a\} / \text{kg} \div 100$

- vi. Déterminer la conformité de la méthode par rapport aux critères de la 'Récupération de la toxicité totale'. La récupération de la toxicité totale est la moyenne pondérée des récupérations des analogues individuels dans un échantillon, pondérées par valeurs d'équivalents de toxine dans l'échantillon.'