



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

Trente-troisième session

Bergen, Norvège

17 – 21 février 2014

**PROJET DE CRITÈRES DE PERFORMANCE POUR LES MÉTHODES DE RÉFÉRENCE ET DE
CONFIRMATION DE BIOTOXINES MARINES (SECTION I-8.6 DÉTERMINATION DE
BIOTOXINES) POUR LA NORME POUR LES MOLLUSQUES BIVALVES VIVANTS ET CRUS
(à l'étape 6 de la procédure)**

Observations de l'Australie, la Norvège et la Nouvelle-Zélande

AUSTRALIE

L'Australie désierait remercier le Comité du Codex sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage (CCMAS) pour l'examen du projet de Critères de performance et pour les observations qu'il a formulées. Les éléments suivants sont particulièrement pertinents pour le débat:

1. L'avis émanant du CCMAS selon lequel le bio-essai sur souris est une méthode de type 1.
2. La reconnaissance par le CCMAS que les critères de la méthode doivent être adaptés pour les méthodes multi-analytes.
3. La décision du CCMAS que des facteurs d'équivalence de toxicité (FET) doivent être inclus dans l'Annexe VII.
4. La reconnaissance par le CCMAS que la liste ne comprend pas tous les analogues de toxines paralysantes des mollusques (TPM).
5. La requête par le CCMAS de l'inclusion d'une description du calcul de la toxicité totale.

Le bio-essai sur souris en tant que méthode de type 1

Le CCMAS a précisé que le bio-essai sur souris est une méthode de type 1 (REP 13/MAS *Paragraphe 23*). Après entretien avec la représentante australienne auprès du CCMAS, nous acceptons cette précision et comprenons que cette classification en tant que méthode de type 1 est liée à des aspects de cette méthode qui sont liés à la méthode en soi, et ne peuvent donc pas être reproduits par la chimie analytique. En d'autres mots, le bio-essai sur souris décrit la seule méthode pour établir *la teneur de biotoxines marines dans des unités-souris*, et non pas la seule méthode pour vérifier la présence de biotoxines marines.

L'Australie entend que cette précision signifie que le bio-essai sur souris ne devrait plus être examiné par le groupe de travail, car on peut lire en page 70 du Manuel de procédure de la CAC (20^{ème} éd.) que l'approche par critères méthodologiques est pertinente pour les méthodes Codex de type II et III.

Alors que le bio-essai sur souris pourrait, à l'avenir, être remplacé en tant que méthode de confirmation, nous notons que les pays qui en décident ainsi pourront encore utiliser le bio-essai sur souris en tant qu'outil réglementaire.

Reconnaissance par le CCMAS que les critères de la méthode doivent être adaptés pour les méthodes multi-analytes

Le CCMAS a noté que 'les critères dans le Manuel de procédure n'étaient applicables que pour des analytes singuliers' – ce qui a confronté le Comité du Codex sur les poissons et les produits de la pêche (CCFFP) à de nombreuses questions pour l'élaboration des critères de performance. Toutefois, alors que l'Australie se

félicite des déclarations du CCMAS aux paragraphes 25 et 47, selon lesquelles il examinera l'élaboration de critères à utiliser pour déterminer la toxicité totale pour les méthodes multi-analyses d'un point de vue général, nous estimons que l'attente des conclusions de cet examen entraînera un retard considérable pour l'élaboration des critères de performance. L'Australie préférerait donc que le travail sur les critères de performance se poursuive en parallèle avec le débat au sein du CCMAS.

L'inclusion de facteurs d'équivalence de toxicité (FET) dans l'Annexe VII

Le CCMAS a demandé des informations sur les FET pour tous les analogues de saxitoxines énumérés (REP 13/MAS Paragraphe 26). L'Australie reste toutefois de l'avis que l'évolution rapide dans ce domaine scientifique requiert une autre approche.

La fiabilité et la validité des connaissances existantes sur les FET de saxitoxines fait l'objet de nombreux débats et reste probablement le maillon le plus faible des capacités actuelles à déterminer la sécurité sanitaire de mollusques par identification chromatographique et par quantification de congénères connus. Un récent article de Munday et Reeve (2013) donne un aperçu de l'état actuel des connaissances et examine les hypothèses utilisées jusqu'à présent mais qui sont de plus en plus remises en cause par les travaux en cours dans ce domaine. En bref, il n'est pas possible de se prononcer sur la toxicité orale à partir d'examen intrapéritonéens. Récemment, Munday et al (2013) ont publié des toxicités aiguës pour certains analogues de saxitoxines et les travaux se poursuivent dans ce domaine.

D'autres débats sur les défis inhérents à l'adoption d'approches reposant sur les FET pour l'analyse de la sécurité sanitaire par des méthodes chimiques ont été repris par Botana et al (2010) et dans l'avis du groupe d'experts de l'EFSA sur les composés du groupe des saxitoxines (2009).

Une meilleure compréhension de la toxicité relative de différents analogues des saxitoxines est en train de se développer. La démarche repose au départ sur des modèles animaliers adéquats faisant appel à des points limites de toxicité appropriés et des tailles d'échantillon efficaces. Ces connaissances seront autant utiles pour la sécurité sanitaire de la population que pour l'industrie des produits de la mer ; il faudra néanmoins encore attendre un certain temps pour y parvenir.

Etant donné les travaux en cours dans ce domaine, la suggestion antérieure du CCFFP que la FAO rassemble ces informations sur un site internet plus facile à mettre à jour reste l'approche que l'Australie privilégie. L'Australie suggère d'ajouter une note à l'Annexe VII du REP 13/FFP pour admettre l'intégration de ces informations dans le document une fois qu'une réponse scientifique aura été apportée à cette question. Le libellé proposé figure dans les observations spécifiques ci-dessous.

Analogues de toxines paralysantes des mollusques

Le CCMAS a noté que la méthode AOAC 2005.06 ne couvrait que 12 des 16 analogues de saxitoxines énumérées au tableau 2 (REP 13/MAS, Paragraphe 21). L'Australie note qu'il existe effectivement nettement plus que 16 toxines paralysantes des mollusques ; l'avis scientifique de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) stipule qu'il y en a plus de 30, alors que Weise et al déclaraient en 2010 qu'il y a 57 analogues. Lawrence et al (2011) suggèrent qu'il faudrait considérer que les analogues présents à moins de 5 pour cent de la quantité totale de toxines sont insignifiants.

L'Australie note que le tableau 2 de l'Annexe VII de REP 13/FFP porte le titre 'Analogues de toxines à prendre en compte', et comprend une liste de toxines communément observées. L'Australie entend que cette liste n'est pas censée être exhaustive. Chaque autorité compétente devrait plutôt évaluer les congénères de STX dans leur zone et veiller à ce qu'ils soient évalués de manière appropriée, ainsi que l'indiquent les observations de la méthode. Pour préciser cela, l'Australie propose d'ajouter un libellé supplémentaire pour orienter des mesures appropriées dans le cas où d'autres congénères sont recensés au moment de l'analyse (voir observations spécifiques ci-dessous).

Le calcul de la toxicité totale à partir d'analogues individuels

Le CCMAS a demandé au CCFFP de fournir des informations sur les FET et sur l'application des critères LD et LQ pour les toxines les plus toxiques du groupe des STX (REP 13/MAS Paragraphe 22). L'Australie suggère que, bien que le seuil réglementaire maximal soit lié à la toxicité totale observée dans la chair, le critère de performance ne devrait renvoyer qu'à l'analyte analysé et pas à la toxicité totale. Le Manuel de procédures permet l'élaboration de critères à partir d'une méthode spécifiée (ainsi que l'ont fait les Norvégiens) et admet la détermination de critères pour les LD, LQ, limites de précision et de récupération

pour chaque analyte individuellement. La toxicité totale est ensuite déterminée en appliquant la FET correspondante pour chaque analogue et en additionnant le total.

Le CCMAS note également la difficulté pour obtenir des matériaux de référence pour certains analogues. L'Australie note que chaque pays doit examiner cette question en fonction du profil de toxines détecté dans son programme de surveillance. Un libellé supplémentaire est suggéré ci-dessous pour apporter une réponse à cette question.

La marche à suivre

Option 1

L'Australie désirerait également saluer le travail réalisé par la Norvège et estime que cette proposition contribue considérablement à une éventuelle solution. L'Australie note toutefois que la question de l'application de la toxicité totale à une méthode multi-analogue subsiste dans le tableau proposé par la Norvège. L'Australie suggère donc qu'une solution pourrait être trouvée en suivant l'approche proposée par la Norvège mais en supprimant complètement l'évaluation de la toxicité totale des critères de performance : c'est-à-dire que les critères de performance ne devraient renvoyer qu'à l'analyte analysé et pas à la toxicité totale. L'Australie note qu'il est encore nécessaire de veiller à ce que les critères de performance satisfassent à la limite maximale ; toutefois, une fois qu'elle a été déterminée, il n'est plus nécessaire que le critère de performance de la toxicité totale apparaisse dans le tableau.

L'Australie suggère donc de remplacer le Tableau 1 du projet de document sur le Critère de performance par un tableau similaire à celui créé par la Norvège, mais sans les références à la toxicité totale (voir observations spécifiques ci-dessous).

L'Australie estime que les observations soumises par la Norvège montrent que les critères de performance recensés pour la limite minimale acceptable conduisent à une méthode acceptable pour déterminer la limite maximale de la toxicité totale; des informations supplémentaires sont toutefois nécessaires pour déterminer si la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) permettent d'y parvenir également. En particulier, l'Australie recommande d'indiquer les LD, LQ, précision et récupération pour tous les analogues de saxitoxines (STX).

Option 2

Si les pays ne parviennent pas à un accord sur la progression de cette norme avec la méthode actuelle, il peut être nécessaire d'essayer une autre approche. Il est évident que le débat actuel gravite autour de la mesure des toxines paralysantes des mollusques, en particulier autour des FET (un domaine en évolution rapide et qui trouvera à terme une solution scientifique), et l'utilisation du bio-essai sur souris comme essai de confirmation (sur lesquels les pays pourraient ne jamais parvenir à un accord).

Etant donné que les méthodes pour le groupe des acides okadaïques, l'acide domoïque et le groupe des acides azaspiracides ne sont pas mis en cause, le CCFFP devrait envisager de recenser ces méthodes en tant que méthodes de référence, et de garder la méthode pour les toxines paralysantes des mollusques parmi les méthodes non résolues jusqu'à ce que la science fournisse une réponse et que des FET soient disponibles.

Si cette approche est retenue, il serait nécessaire d'inclure un paragraphe dans la norme sur les bivalves pour évoquer l'utilisation d'autres méthodes parmi les outils réglementaires appropriés de tout programme de gestion des biotoxines. Par exemple : *'Outre les méthodes référencées, l'autorité compétente peut autoriser l'utilisation de méthodes de dépistage ou de confirmation validées de manière appropriée, pour la gestion des biotoxines.'*

Observations particulières

I-8.6 Détermination des biotoxines

Les méthodes de type II et de type III seront choisies 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 procédures du Codex*.

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.

Les méthodes devront satisfaire aux critères numériques figurant dans le Tableau 1 et peuvent requérir soit la fourchette minimale applicable soit les critères LD et LQ.

~~Les critères de toxicité totale d'une méthode multi-analogues sont établis pour les profils de toxines en utilisant des données d'une étude de validation.~~

Justification : Ces informations sont comprises dans le second paragraphe sous le tableau.

I-8.6.1 Valeurs de critères numériques pour biotoxines dans des mollusques bivalves

Tableau 1

Groupe de toxines	Toxine	Fourchette minimale applicable (mg/kg)	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	Précision (RSD _R)'	Pourcentage de récupération
Groupe des STX	Saxitoxine (STX)	0,05	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	(NEO)	0,05	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	(dcSTX)	0,05	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	GTX1	0,05	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	GTX2	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	GTX3	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	GTX4	0,05	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	GTX5	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	GTX6	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	dcGTX2	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	dcGTX3	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	C1	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	C2	0,1	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	C3	0,5	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
	C4	0,5	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>	<inscrire valeur>
Groupe AO	AO	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	DTX1	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	DTX2	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
Acide domoïque	AD	13,9	1,4	2,8	<=20%	85-110%
Groupe AZA	AZA1	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	AZA2	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	AZA3	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%

On estime que la toxicité totale est la somme des concentrations molaires des analogues détectés multipliée par les facteurs d'équivalence de toxicité (FET) spécifiques équivalents. Il convient d'utiliser des FET avec une validation scientifique internationale pour calculer la toxicité totale pour des méthodes qui ne mesurent pas directement la toxicité totale. **Les connaissances scientifiques sous-jacentes aux FET évoluent rapidement. On peut trouver des FET actuellement validés sur le plan international sur le site de la FAO. Des informations sur les FET seront intégrées dans la présente norme à l'avenir.**

Justification; le CCMAS a requis l'ajout d'informations sur la démarche pour estimer la toxicité totale. Le CCFFP a amplement débattu de la question des FET et en dépit de l'avis du CCMAS, l'Australie estime que ce sujet va continuer d'évoluer rapidement et ne devrait pas faire l'objet de prescriptions dans cette norme. Voir la réponse faite au CCMAS, supra.

Les méthodes qui ne mesurent pas la toxicité totale directement devraient être validées et utilisées pour les analogues de toxines susceptibles de contribuer à la toxicité totale. Les analogues de toxines actuellement connus à prendre en compte sont repris dans le Tableau 1.

Pour des analogues de toxines ne figurant pas dans le Tableau 1 et détectés à plus de 5 pour cent de la concentration molaire totale de toxines, l'autorité compétente doit évaluer la contribution de ces analogues à la toxicité totale, soit en utilisant des FET connus, soit en suivant une approche de précaution par l'attribution d'un FET provisoire tout en effectuant des recherches plus approfondies.

L'autorité compétente doit relever la question de matériaux de référence appropriés pour tous les analogues préoccupants relevés dans les profils de toxines locaux.

Justification : Répondre aux observations du CCMAS et fournir des orientations pour les analogues de saxitoxines qui ne figurent pas dans le Tableau 2, et sur l'utilisation de matériaux de référence appropriés. Lawrence et al (2011) suggèrent qu'il convient d'estimer que les analogues présents à moins de 5 pour cent de la quantité totale de toxines sont insignifiants. Les composés dépassant cette valeur devraient être examinés.

RÉFÉRENCES

Munday, R and Reeve, J. Risk assessment of shellfish toxins. Toxins 2013. 5 p2109-2137

Munday, R Thomas, K Gibbs, R Murphy, C Quilliam, M. Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&# to mice by various routes of administration. Toxicon 2013, 76,77-83

Botana, L.M., et al. The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection. Trends Analyt Chem 2010, 29(11): p. 1316-1325.

European Food Safety Authority, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – saxitoxin group. 2009, EFSA: Parma, Italy. p. 76pp.

Weis, M D'Agostino, P Mihali, T Moffitt, M Neilan, B. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. Marine Drugs 2010, 8, 2185-2211

Lawrence, J Loreal, H Toyofuku, H Hess, P Iddya, K Ababouch, L. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 551, Assessment and Management of biotoxin risks in bivalve molluscs; Food and Agricultural Organisation of the United Nations: Rome, Italy, 2011

NORVÈGE

La 32ème session du CCFFP a envoyé l'avant-projet de critères de performance pour les méthodes de référence et de confirmation de biotoxines marines pour la *Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus* à la CAC pour adoption à l'étape 5 et au CCMAS pour aval.

La 36ème session de la CAC a adopté le projet à l'étape 5 et l'a fait progresser à l'étape 6 pour examen par la 33ème session du CCFFP. La 34^{ème} session du CCMAS n'a pas avalisé les critères de la méthode pour les biotoxines et a invité le CCFFP à fournir des informations sur les facteurs d'équivalence de toxicité pour toutes les biotoxines recensées dans la norme, et à appliquer les critères pour la LD et la LQ pour les plus toxiques des toxines du groupe des saxitoxines. Certaines délégations du CCMAS estimaient que les critères figurant dans le Manuel de procédures étaient adéquats pour les méthodes chimiques mais ne s'appliquaient pas aux méthodes biologiques telles que le bio-essai sur souris. Il a été précisé que le bio-essai sur souris avait été proposé comme méthode de type 1 pour les biotoxines et que les critères n'étaient donc pas

applicables. Il a également été noté qu'il n'est pas possible d'avaliser à la fois des méthodes de type I et de type II pour la même disposition. Le CCMAS est convenu que l'élaboration de critères pour la toxicité totale devrait être envisagée d'un point de vue plus général et envisagera l'élaboration de critères pour des méthodes multi-composants à l'occasion de sa prochaine session en 2014.

Le travail sur l'élaboration de méthodes analytiques pour la détermination de biotoxines évolue et on espère qu'il mènera à l'élaboration de plusieurs méthodes chimiques analytiques qui remplaceront les bio-essais à l'avenir. La disponibilité de critères de performance pour les méthodes donnerait plus de souplesse quant au choix de la méthode à appliquer. La description des critères actuels du Codex pour les méthodes repose sur des méthodes chimiques de détermination de composants individuels. Le Manuel de procédures décrit également la conversion de méthodes recommandées en critères.

Pour les biotoxines, on estime que la toxicité totale est la somme des concentrations des composants individuels (analogues) de groupes de toxines multipliée par les facteurs d'équivalence de toxicité (FET) spécifiques équivalents. Afin de déterminer la toxicité totale, toute méthode analytique chimique appropriée doit permettre la détermination des analogues avec une performance satisfaisante. Étant donné que les exigences pour les performances des analogues seraient les mêmes que pour d'autres composants individuels, les critères de performance établis pour les méthodes du Manuel de procédures pourraient très bien être appliqués. Les déterminations des analogues sont indépendantes des FET, puisque les concentrations de composants sont déterminés séparément, et de ce fait les méthodes ne sont pas dans la catégorie correspondant aux méthodes de type I.

Critères de méthodes et FET

Les Instructions de travail pour l'application de la démarche critères dans le Codex (Manuel de procédure p. 71) stipulent que dans certains cas, un Comité peut trouver plus facile de recommander une méthode spécifique et de "convertir" cette méthode en un critère approprié. Ce document propose de convertir des méthodes spécifiques d'analyse de biotoxines en des critères méthode. Les méthodes dont la conversion en critères est recommandée sont des méthodes interlaboratoires validées d'AOAC International, du NMKL (Comité Nordique pour l'analyse alimentaire), du Comité européen de normalisation et du Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour les biotoxines marines. Les conclusions des études interlaboratoires sur les méthodes sont examinées en particulier par rapport aux niveaux validés les plus bas avec une précision satisfaisante.

De manière générale, les FET présentent un degré d'incertitude supérieur aux mesures analytiques (pour de plus amples indications, voir les références 1-4). Il est acquis que les FET sont révisés au fur et à mesure de la disponibilité de nouvelles données toxicologiques. Les valeurs FET pour le groupe des saxitoxines figurent en Annexe 1. Pour établir des critères pour les méthodes et prendre en compte l'incertitude des valeurs des FET, les valeurs de FET suggérées à cette fin figurent dans une colonne à part avec un seul chiffre significatif.

Toutes les méthodes doivent permettre de détecter et de déterminer les analogues d'un groupe particulier de toxines avec une sensibilité qui protège le consommateur. En conséquence, les FET devraient influencer la limite de quantification (LQ) de la méthode pour les analogues de toxines. Par exemple, la sensibilité devrait être environ 10 fois inférieure pour des analogues environ 10 fois plus toxiques que d'autres. Ceci a été pris en compte dans l'annexe 2. L'annexe 2 comprend également les seuils validés les plus bas avec une précision satisfaisante pour les analogues des groupes de toxines obtenus dans les études interlaboratoires des méthodes spécifiques. Les résultats des études ainsi que les LQ calculées reposant sur des FET servent de base pour les critères proposés (Annexe 2). Les critères proposés ainsi que les méthodes qui satisfont les critères figurent au Tableau 1 du présent document.

La limite maximale LM est donnée pour la toxicité totale d'un groupe particulier, qui est constitué de plusieurs analogues. Étant donné que le critère Codex de précision pour la méthode repose sur l'équation Horwitz/Thompson, valable uniquement pour des composants chimiques individuels, elle ne peut pas être appliquée à des méthodes multi-composants. L'explication est brièvement illustrée en Annexe 3, 'Pourquoi l'équation Horwitz/Thompson n'est pas valable pour des méthodes multi-composants.'

Les méthodes pour lesquelles les composés individuels ne sont pas déterminés, par exemple les bio-essais/ les essais sur souris, devraient être validées par rapport à l'une des méthodes satisfaisant les critères de performance de la méthode. Si une étude interlaboratoire permet de démontrer qu'une méthode particulière

(étude de performance de méthode ou dispositif d'analyse d'aptitude) donne des résultats équivalents, on pourrait estimer que cette méthode est appropriée.

Conclusions

La Norvège recommande que la 33^{ème} session du CCFFP examine ce qui suit:

- Les facteurs d'équivalence de la toxicité (FET) figurant dans l'Annexe 1 (la proposition de la Norvège est la colonne 'Aux fins du Codex' à droite) pour les intoxications paralysantes par les mollusques (IPM) et dans le tableau 1 de ce document pour les groupes de l'AO et des AZP.
- Les critères pour les méthodes proposés au Tableau 1 du présent document reposant sur les observations formulées en Annexe 2. Recommander des valeurs numériques pour la performance de la méthode (LD, LQ, limite minimum applicable (mAL), et précision (RSD/HorRat)) relative aux analogues pour les groupes de toxines et découlant des FET. Signaler que le critère Codex actuel pour la précision n'est pas applicable pour la somme des toxines (selon l'Annexe 3).
- Inclure et examiner d'autres méthodes appropriées satisfaisant les critères et également comparer les résultats provenant de bio-essais par rapport à des méthodes chimiques. La Norvège demande aux fournisseurs d'essais d'aptitude (EA) de fournir les résultats de programmes d'EA si différentes méthodes d'analyse de biotoxines ont été utilisées. Si les résultats examinés sont satisfaisants, la session pourrait accepter les méthodes par bio-essai et elles pourraient être incluses parmi les méthodes susceptibles d'être appropriées.

Tableau 1: Critères de performance pour les méthodes de dépistage de biotoxines marines dans les mollusques bivalves

Produit	Disposition	Limite maximale : LM	Critères de performance pour la méthode	Méthodes appropriées
Mollusques bivalves	Toxicité totale du groupe des saxitoxines (STX) Voir Annexe 1 pour les analogues et ses FET	0,8 mg/kg d'éq. STX diHCl	Critères découlant de l'AOAC 2011.02 (voir Annexe 2 A) Pour les analogues individuels, avec FET ≥ 1 Seuil minimum applicable $\leq 0,05$ mg/kg LD $\leq 0,01$ mg/kg LQ $\leq 0,02$ mg/kg Précision : RSD $\leq 44\%$ 0,1 < FET < 1 Seuil minimum applicable $\leq 0,1$ mg/kg LD $\leq 0,03$ mg/kg LQ $\leq 0,05$ mg/kg Précision : HorRat ≤ 2 FET $\leq 0,1$ Seuil minimum applicable : $\leq 0,5$ mg/kg LD $\leq 0,1$ mg/kg LQ $\leq 0,2$ mg/kg Précision : HorRat ≤ 2 Récupération : 50 - 130%	AOAC 2011.02 NMKL 197 (2013) CLHP-fluorescence AOAC 2005.06 EN 14526:2004 NMKL 182 (2005) CLHP-fluorescence AOAC 2011.27 Test souris de fixation des récepteurs (épruvé d'après AOAC 2005.06, Voir Annexe 4) [AOAC 959.08 Bioessai sur souris - voir Annexe 4 épruvé d'après AOAC 2005.06 – besoin de plus de données?]

Produit	Disposition	Limite maximale : LM	Critères de performance pour la méthode	Méthodes appropriées
Mollusques bivalves	Toxicité totale du groupe des acides okadaïques (AO) FET du Groupe AO : AO : 1.0 DTX1: 1.0 DTX2: 0.5	0,16 mg/kg éq. AO	Selon les procédures SOP – UE ¹ (Voir annexe 2B) Pour les analogues individuels, avec FET ≥ 1 mAL ≤ 0,04 mg/kg LD ≤ 0,01 mg/kg LQ ≤ 0,03 mg/kg Précision : RSD ≤ 44% FET ≤ 0,5 mAL ≤ 0,1 mg/kg LD ≤ 0,03 mg/kg LQ ≤ 0,05 mg/kg Précision : HorRat ≤ 2 Récupération : 60 -115%	“Procédure UE harmonisée pour la détermination de biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par LC-MS/MS ¹ Procédure UE harmonisée pour la détermination de toxines du groupe des AO par LC-MS/MS ² EN 16204:2012 LC-MS/MS
Mollusques bivalves	Acide domoïque	20 mg/kg	Selon le Manuel de procédure Seuil minimum applicable : 14 mg/kg LD : 2 mg/kg LQ : 4 mg/kg Précision: HorRat ≤ 2 Récupération 85-110% (selon la méthode de validation)	EN14176 :2003 CLHP Procédure UE-RL-MB harmonisée pour la détermination d'acide domoïque ³ (toxines ASP dans les mollusques par UPLC-MS Procédure UE harmonisée; CLHP UV ⁴ AOAC 2006.02 ELISA [AOAC 991.26 CLHP 20 mg/kg]
Mollusques bivalves	Groupe des azaspiracides (AZP) FET du Groupe AZP : AZA-1: 1.0 AZA-2: 1.8 AZA-3: 1.4	0,16 mg/kg d'éq AZA	Selon la procédure UE ¹ (Voir Annexe 2B) Pour les analogues individuels, avec FET ≥ 1 Seuil minimum applicable ≤ 0,03 mg/kg LD ≤ 0,01 mg/kg LQ ≤ 0,02 mg/kg Précision : RSD ≤ 44% Récupération : 40 -120%	Étude de validation de la “Procédure UE harmonisée pour la détermination de biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par LC-MS/MS ¹ EN 16204:2012 LC-MS/MS

1) Lien vers l'étude de validation interlaboratoires de la ‘Procédure UE harmonisée pour la détermination de biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par LC-MS/MS’

http://www.aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/ayuda_cientifica/report_inter.pdf

2) La méthode est disponible sous : <http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/procedimientos/EU-Harmonised-SOP-LCMS-OA-Version1.pdf>

3) La méthode est disponible sous :

http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EURLMB_SOP_Domoic_acid_UPLC-MS.pdf

4) La méthode est disponible sous : http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/procedimientos/EU-Harmonised-SOP-ASP-HPLC-UV_Version1.pdf

Références :

1. Aune, T.; Larsen, S.; Aasen, J. A. B.; Rehmann, N.; Satake, M.; Hess, P., Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice *Toxicol* 2007, 49, 1–7.
2. Huhn, J.; Jeffrey, P. D.; Larsen, K.; Rundberget, T.; Rise, F.; Cox, N. R.; Arcus, V.; Shi, Y.; Miles, C. O., A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2. *Chem. Res. Toxicol.* 2009, 22, 1782,1786.
3. Garibo, D.; de la Iglesia, P.; Diogène, J.; Campàs, M., Inhibition equivalency factors for dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 in protein phosphatase assays: applicability to the analysis of shellfish samples and comparison with LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 2572,2579.
4. McCarron, P.; Kilcoyne, J.; Miles, C. O.; Hess, P., Formation of azaspiracids-3, -4, -6, and -9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 160–169.

Annexe 1 Facteurs d'équivalence de toxicité (FET) pour les toxines IPM*Tableau A1 FET pour les toxines IPM*

TOXINE IPM	FET Oshima 2004	FET EFSA 2009	FET selon Bio-essai sur souris Munday <i>et al.</i> 2013	DL ₅₀ relative par injection i.p. Munday <i>et al.</i> 2013	DL ₅₀ par alimentation Munday <i>et al.</i> 2013	Aux fins du Codex
STX	1.000	1.0	1.00	1.00	1.00	1
GTX1	0.994	1.0	--	--	--	1
GTX2	0.359	0.4	--	--	--	0.4
GTX3	0.638	0.6	--	--	--	0.6
GTX4	0.726	0.7	--	--	--	0.7
GTX1,4 (80, 20%)	--	--	1.02	1.90	0.93	1*
GTX2,3 (68, 31%)	--	--	0.60	0.76	0.57	0.6*
GTX5 (B1)	0.064	0.1	--	--	--	0.1
GTX6 (B2)	0.064	0.1	--	--	--	0.1
dcGTX2	0.154	0.2	--	--	--	0.2
dcGTX3	0.377	0.4	--	--	--	0.4
C1 (epi-GTX8)	0.006	--	--	--	--	0.006
C2 (GTX 8)	0.096	0.1	--	--	--	0.1
C3	0.013	--	--	--	--	0.01
C4	0.058	0.1	--	--	--	0.1
NEO	0.924	1.0	1.16	3.12	2.54	1
dcSTX	0.513	1.0	0.64	0.79	0.37	0.6
dcNEO (GTX 7)	--	0.4	--	--	--	0.4
11-hydroxy-STX	0.319	0.3	--	--	--	0.3

B. Ben-Gigirey et al. (publication sous presse 2014)

(reçu de Dr. Ana Gago-Martínez, Laboratoire UE de référence pour les biotoxines marines)

total

*Les FET de GTX1, 4 et GTX3, 4 sont exclus du total car les FET individuels de GTX1, GTX2, GTX3 et GTX4 sont inclus.

7*

Annexe 2: Critères basés sur la conversion des méthodes et le calcul de LQ dérivés de FET

A) Critères pour les toxines d'intoxication paralysante par les mollusques, IPM

Afin d'établir des critères, les résultats des méthodes suivantes ont été utilisés:

- AOAC 2011.02 / NMKL 197: Paralytic Shellfish Toxins in Mussels, Clams, Oysters, and Scallops. Post-Column Oxidation (PCOX) Method

Pour les analogues, les seuils validés les plus bas avec une précision satisfaisante des études interlaboratoires, selon l'équation Horwitz/Thompson, figurent au Tableau A2.1.

Il a été suggéré de baser les critères sur la limite de quantification, LQ, pour chaque analogue de toxine en tenant compte du facteur FET. Lorsqu'un analogue est 10 fois plus toxique qu'un autre analogue, la LQ devrait être environ 10 fois inférieure. Et s'il y a de nombreux analogues de toxines dans un groupe de toxines cela devrait également avoir un impact sur la LQ (par exemple s'il y avait 10 analogues à FET = 1, la LQ devrait être soumise à un facteur de $1/10^{\text{ème}}$ de la limite maximale, LM, pour garantir la sécurité sanitaire des aliments.)

Au Codex, le critère pour la LQ de la méthode = $1/5$ LM pour des niveaux supérieurs à 0,1 mg/kg et $2/5$ LM pour des niveaux inférieurs à 0,1 mg/kg. Selon un calcul mathématique, la LQ requise pour un analogue X dans un groupe de toxines Y pourrait être exprimée en relation avec un analogue Z apparenté (dont le FET = 1) ;

$$LOQ(Z) = \frac{ML \cdot \frac{1}{5} \cdot 1}{\sum TEF(Y)} \quad (1)$$

$$LOQ(X) = \frac{LOQ(Z)}{TEF(X)} \quad (2)$$

Pour des analogues de la toxine IPM, en utilisant les 'FET recommandés par le Codex', la somme de FET, $\sum FET(Y)$ serait ég.7 (figurant en Annexe A) et la LM = ég 0,8 mg/kg. Selon les équations 1 et 2, cela donne ;

$$LQ(Z) = \text{ég } 0,8 \text{ mg/kg} \cdot 1/5 \cdot \text{ég } 1 / \text{ég } 7 = \text{ég } 0,02 \text{ mg/kg}$$

Pour FET=1, la LQ serait alors: ég 0,02 mg/kg/ég 1 = 0,02 mg/kg

Selon les critères Codex, la limite de détection, LD, est $1/2$ de la LQ. On peut aisément obtenir les valeurs numériques pour la limite minimale applicable, mAL, pour chaque analogue en utilisant les critères Codex, qui sont disponibles sur le site NMKL www.nmkl.org sous "Excel Spreadsheet for downloading", "How to get method criteria based on ML".

Le tableau ci-dessous montre les résultats de l'étude interlaboratoires, les critères basés sur la LQ calculée à partir des valeurs FET et finalement les critères proposés sur la base d'une combinaison des deux. Il indique que les résultats de l'étude interlaboratoires sont satisfaisants et que la méthode permet de déterminer des limites basses pour tous les analogues. Etant donné que les analogues avec de très faibles FET contribuent moins à la toxicité totale que les analogues avec un FET proche de 1, les seuils validés les plus bas avec une précision satisfaisante ne doivent pas être aussi bas que selon la méthode de validation. Ainsi le calcul de la LQ en tant que critère doit être également pris en compte. Toutefois, les critères basés sur le calcul de la LQ peuvent être trop imprécis, puisque la somme des mAL dérivées des calculs de LQ et multipliées par les facteurs FET respectifs peut dépasser la LM. Ainsi, une combinaison de la conversion de la méthode en critères et de critères basés sur les calculs de LQ a été envisagée. Pour la récupération, les validations ont démontré que les critères figurant dans le Manuel de procédures du Codex sont trop stricts pour ces analytes et matrices et la récupération a été validée à 50-130%.

Tableau A2.1 Analogues du groupe des saxitoxines, seuil inférieur validé avec précision satisfaisante obtenu par l'étude interlaboratoires AOAC 2011.02/NMKL 197, FET, critères calculés basés sur les FET, et critères proposés selon les résultats de l'étude et les critères calculés basés sur les FET

Analogues	Niveau inférieur validé (mg/kg)	FET	Critères calculés basés sur les FET* (mg/kg)			Critères proposés basés sur les résultats de validation de la méthode et les critères calculés basés sur les FET
			LD	LQ	mAL	
STX	0.04	1	0.01	0.02	0.03	FET ≥ 1 mAL ≤ 0,05 mg/kg LD ≤ 0,01 mg/kg LQ ≤ 0,02 mg/kg Précision : RSD ≤ 44%
NEO		1	0.01	0.02	0.03	
GTX 1	0.07	1	0.01	0.02	0.03	
GTX 4	0.06	0.7	0.02	0.03	0.05	0,1 < FET < 1 mAL ≤ 0,1 mg/kg LD ≤ 0,03 mg/kg LQ ≤ 0,05 mg/kg Précision : HorRat ≤ 2
dcSTX	0.04	0.6	0.02	0.04	0.08	
GTX 2	0.14	0.4	0.03	0.06	0.1	
GTX 3	0.06	0.6	0.02	0.04	0.08	
dcGTX3	0.04	0.4	0.03	0.06	0.1	
dcGTX2	0.14	0.2	0.06	0.11	0.3	
GTX 5 (B-1)	0.14	0.1	0.11	0.23	0.5	FET ≤ 0,1 mAL ≤ 0,5 mg/kg LD ≤ 0,1 mg/kg LQ ≤ 0,2 mg/kg Précision : HorRat ≤ 2
C-1	0.05	0.006	1.90	3.81	13	
C-2	0.05	0.1	0.11	0.23	0.5	
C-3	-	0.01	1.14	2.29	7.3	
C-4	-	0.1	0.11	0.23	0.5	

* $LQ(Z) = 0,8 \text{ mg/kg} \cdot 1/5 \cdot 1/7$ (0,8 est la LM, 1/5 est dû à des niveaux supérieurs à 0,1 mg/kg, 7 est la somme des FET (Annexe 1)). $LQ(X) = LQ(Z)/FET(X)$, LD et mAL se trouvent dans la fiche Excel NMKL selon les critères Codex, correspondant à LM 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,55, 1, 11 et 19 mg/kg, respectivement.

B) Critères pour les toxines lipophiles

Les résultats de la méthode suivante ont été utilisés :

- EU-RL-MB: Etude de validation interlaboratoires de la Procédure UE harmonisée pour la détermination de biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par LC-MS/MS.

La méthode a entre autres été validée pour les toxines du groupe des AO et les toxines du groupe des AZA. Le tableau A2.2 montre les résultats de l'étude de validation, les critères obtenus en calculant la LQ à partir des FET et finalement les critères proposés basés sur une combinaison des deux.

Tableau A2.2 Analogues de groupes de toxines, seuil inférieur validé avec précision satisfaisante obtenu par les études interlaboratoires EURLM, FET, critères calculés basés sur les FET, et critères proposés selon les résultats de l'étude et les critères calculés basés sur les FET

Analogues AO	Niveau inférieur validé (mg/kg)	FET	Critères calculés basés sur les FET* (mg/kg)	Critères proposés basés sur les résultats de validation de la méthode et les critères calculés basés sur les FET
Acide okadaïque, AO	0.06	1	Par calcul selon les équations 1&2 : FET=1 LQ = 0,03 mg/kg, LD = 0,01 mg/kg, mAL = 0,04 mg/kg	FET ≥ 1 mAL ≤ 0,04 mg/kg LD ≤ 0,01 mg/kg LQ ≤ 0,03 mg/kg Précision : RSD ≤ 44%
Dinophysistoxine-1 (DTX1)	0.1	1		
Dinophysistoxine-2 (DTX2)	0.04	0.5		

	Σ FET	2.5	FET=0,5: LQ = 0,05 mg/kg, LD = 0,03 mg/kg, mAL =0,1 mg/kg Dans la procédure SOP ² (réf sous tableau 1) le critère pour mAL = 0,04 mg/kg	FET ≤ 0,5 mAL ≤ 0,1 mg/kg LD ≤ 0,03 mg/kg LQ ≤ 0,05 mg/kg Précision : HorRat ≤ 2
Analogues AZA				
AZA1	0.04	1	Par calcul selon les équations 1&2 : FET=1: LQ = 0,02 mg/kg LD = 0,01 mg/kg mAL = 0,03 mg/kg FET=1,8 : LQ = 0,01 mg/kg, LD = 0,006 mg/kg, mAL =0,02 mg/kg	FET ≥ 1 mAL ≤ 0,03 mg/kg LD ≤ 0,01 mg/kg LQ ≤ 0,02 mg/kg Précision : RSD ≤ 44%
AZA2	0.02	1.8		
AZA3	0.02	1.4		
	Σ FET	4.2		

* LQ(Z)=0,8 mg/kg·1/5·1/7 (0,8 est la LM, 2/5 est dû à des niveaux inférieurs à 0,1 mg/kg, 7 est la somme des FET (Annexe 1). LQ(X) =LQ(Z)/FET(X), LD et mAL se trouvent dans la fiche Excel NMKL selon les critères Codex.

Annexe 3 Pourquoi l'équation Horwitz/Thompson n'est pas valable pour les méthodes multi-composants ?

La toxicité totale est la somme de la concentration des analogues multipliés par les FET respectifs.

Au seuil minimum applicable, mAL, on exprime ceci par Σ mAL·FET

Dans le Manuel de procédures du Codex, le critère pour la précision est donné comme étant l'écart-type relatif. L'écart-type relatif (RSD) est exprimé selon l'équation suivante :

$$RSD(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100\% \Leftrightarrow s = \frac{RSD \cdot x}{100} \quad (1)$$

Où s est l'écart type et x est la concentration (ici: $x = \text{mAL} \cdot \text{FET}$).

L'écart-type pour la toxicité totale serait l'incertitude combinée de l'écart-type des analogues, c.-à-d. la somme des variances de l'écart-type, s^2 , des analogues en cause.

$$s_{total} = \sqrt{\sum s_i^2} = \sqrt{\left(\frac{RSD_i}{100} \cdot \text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i\right)^2} \quad (2)$$

L'écart-type relatif de la toxicité totale, RSD_{total} au seuil minimum applicable (mAL) est la racine carrée de la somme des variances des composants individuels divisée par la concentration:

$$RSD_{total}(\%) = \frac{\sqrt{\sum \left(\frac{RSD_{Ri}}{100} \cdot \text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i\right)^2}}{\sum (\text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i)} \cdot 100\% = \frac{\sqrt{\sum (RSD_{Ri} \cdot \text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i)^2}}{\sum (\text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i)} \quad (3)$$

En fonction des valeurs FET, les mAL pour les IPM sont 0,05, 0,1 et 0,5 mg/kg, respectivement (voir Annexe 2) (correspondants aux niveaux maximum de 0,14, 0,25 et 1 mg/kg des critères Codex, selon le tableur Excel du site internet NMKL). Pour ces niveaux, le RSD variera de 32 – 44%. Les chiffres utilisés dans les calculs figurent dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3.1 FET, mAL et RSD de toxines IMP, et combinaison de ceux-ci pour estimation de l'écart-type relatif de la toxicité totale, RSD_{total}

TOXINE IPM	FET	mAL (mg/kg)	FET· mAL (éq. mg/kg)	RSD(%)	(mAL·FET·RSD) ² (éq.% mg/kg) ²
STX	1	0.05	0.05	44	4.84
GTX1	1	0.05	0.05	44	4.84
GTX2	0.4	0.1	0.04	39	2.43
GTX3	0.6	0.1	0.06	39	5.48
GTX4	0.7	0.1	0.07	39	7.45
GTX5 (B1)	0.1	0.5	0.05	32	2.56
GTX6 (B2)	0.1	0.5	0.05	32	2.56
dcGTX2	0.2	0.1	0.02	39	0.608
dcGTX3	0.4	0.1	0.04	39	2.43
C1 (epi-GTX8)	0.006	0.5	0.003	32	0.0092
C2 (GTX 8)	0.1	0.5	0.05	32	2.56
C3	0.01	0.5	0.005	32	0.026
C4	0.1	0.5	0.05	32	2.56
NEO	1	0.05	0.05	44	4.84
dcSTX	0.6	0.1	0.06	39	5.48
dcNEO (GTX 7)	0.4	0.1	0.04	39	2.43
11-hydroxy-STX	0.3	0.1	0.03	39	1.37
Total	7		0.718		52.48

En utilisant la formule (3) pour estimer l'écart-type relatif de la toxicité totale, on obtient l'équation suivante :

$$RSD_{total}(\%) = \frac{\sqrt{4.84+4.84+2.43+\dots+1.37}}{0.72} = 10\%$$

Un écart-type relatif de 10% pour la toxicité totale est très juste. Si les cinq premiers analogues des toxines IPM du tableau 3.1 étaient les seuls présents (STX, GTX1, GTX2, GTX3 et GTX4), le RSD_{total} serait de 19%. Si seul la STX était présente, le RSD_{total} serait de 44%. Et en n'ayant qu'un seul analogue, cela correspondrait à la valeur numérique obtenue avec l'équation Horwitz/Thompson.

La LM pour la toxicité totale de l'IPM est de 0,8 mg/kg d'éq. STX diHCL. Pour un composant unique avec une concentration de 0,8 mg/kg, le RSD_R annoncé est de 33%. S'il s'agissait de l'exigence pour la toxicité totale et que tous les analogues étaient présents, le RSD de chaque analogue dépasserait 100%, ce qui n'est pas satisfaisant.

Le RSD du total diminue si le nombre de composants augmente. Plus il y a de composants, plus le RSD est étroit. On peut aisément illustrer cette assertion en supposant que pour n analogues $FET = 1$, $mAL=1$ et $RSD=44\%$

$$RSD_{total} = \frac{\sqrt{\sum (RSD_{Ri} \cdot mAL_i \cdot TEF_i)^2}}{\sum (mAL_i \cdot TEF_i)} = \frac{\sqrt{\sum (44_1 \cdot 1_1 \cdot 1_1)^2 + (44_2 \cdot 1_2 \cdot 1_2)^2 + \dots + (44_n \cdot 1_n \cdot 1_n)^2}}{\sum (1_1 \cdot 1_1) + \dots + (1_n \cdot 1_n)}$$

$$= \frac{\sqrt{44^2 \cdot n}}{n} = \frac{44\sqrt{n}}{n}$$

Lorsque n augmente, le RSD_{total} diminue.

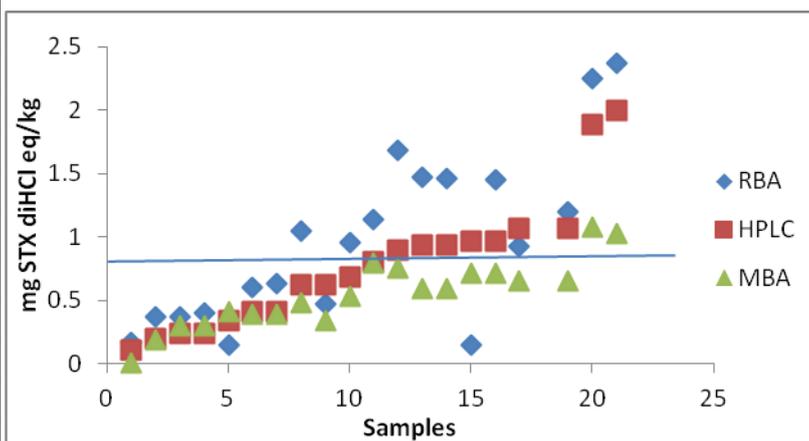
Il en découle que l'équation Horwitz/Thompson ne peut pas être appliquée à des résultats multi-composants, et qu'il n'est pas non plus réaliste d'établir des critères de précision pour un ensemble de composants puisque, selon l'équation ci-dessus, la précision sera moindre alors qu'il y a plus d'analogues.

Annexe 4 Comparaison de méthodes pour les toxines paralysantes de mollusques

Source : Van Dolah, Frances M.; Fire, Spencer E.; Leighfield, Tod A.; Mikulski, Christina M.; Doucette, Gregory J. Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish by Receptor Binding Assay: Collaborative Study, *J. AOAC Int.* 95, 795 (2012)

Pendant la validation de l'AOAC 2011.27, un essai de liaison aux récepteurs (RBA) pour les toxines paralysantes des mollusques (TPM) sur plaque à microtitration a été comparé à la méthode CLHP (AOAC 2005.06) et au bio-essai sur souris (AOAC 959.08). En tout, 21 homogénats de mollusques ont été analysés. Neuf laboratoires ont analysé selon l'AOAC 2011.27, un laboratoire a analysé les échantillons en utilisant la méthode d'oxydation précolonne CLHP (AOAC 2005.06) pour déterminer la composition de congénères STX. Trois laboratoires ont réalisé le bio-essai sur souris (AOAC 959.08). L'étude s'est concentrée sur la capacité de l'essai à mesurer la toxicité TPM d'échantillons inférieurs, proches ou légèrement au-dessus de la limite réglementaire. Les résultats figurent dans le tableau et la figure ci-dessous, par teneur croissante selon la méthode CLHP. Les chiffres en caractère gras indiquent les résultats supérieurs ou égaux à la limite maximale. Il en ressort qu'à des niveaux proches et supérieurs à la limite maximale de 0,8 mg/kg d'éq STX diHCL, la méthode du bio-essai sur souris donne des résultats inférieurs à la méthode CLHP et la méthode RBA.

Échantillon	RBA	CLHP	Bio-essai sur souris
AOAC	2011.27	2005.06	959.08
1	0,168	0,108	-
2	0,365	0,196	0,182
3	0,371	0,236	0,299
4	0,403	0,236	0,299
5	0,149	0,341	0,405
6	0,599	0,413	0,387
7	0,627	0,413	0,387
8	1,051	0,618	0,485
9	0,466	0,625	0,343
10	0,96	0,685	0,528
11	1,134	0,802	0,792
12	1,683	0,894	0,752
13	1,476	0,931	0,595
14	1,46	0,931	0,595
15	0,144	0,965	0,714
16	1,452	0,965	0,714
17	0,926	1,07	0,653
19	1,203	1,07	0,653



20	2,252	1,89	1,08
21	2,374	2	1,027

NOUVELLE-ZÉLANDE

La Nouvelle-Zélande note la discussion du CCMAS au sujet des critères pour les méthodes d'analyse de biotoxines marines et transmet les observations suivantes.

À l'origine, la démarche relative aux critères a été retenue à cause du manque de consensus au sein du CCFFP quant à la méthode de référence appropriée pour chaque groupe de toxines.

Les méthodes de référence restent la situation idéale. Il semblerait que la plupart des pays utilisent les méthodes CLHP pour détecter l'acide domoïque (LC-MS en Nouvelle-Zélande, avec une bonne corrélation avec la méthode CLHP). De nos jours, nombre de pays utilisent la méthode LC-MS pour le groupe des acides okadaïques et les azaspiracides plutôt que les bio-essais sur souris pour la toxine lipophile utilisés précédemment parce que ces derniers donnent un plus grand nombre de faux positifs et certains résultats faux négatifs.

Le brévétotoxines sont signalées par les États-Unis et ont posé un problème une fois en Nouvelle-Zélande, et n'ont pas été observées depuis 20 ans en quantités significatives. À notre connaissance, elles ne font pas l'objet de dépistage dans les produits échangés dans le commerce international.

Le principal différend restant concerne l'utilisation de bio-essais sur souris pour la détection du groupe des saxitoxines, dont l'utilisation est progressivement arrêtée dans de nombreux pays en faveur de méthodes chimiques et fonctionnelles. Les méthodes chimiques actuellement utilisées dépendent considérablement d'études de bio-essais sur souris de la toxicité d'analogues individuels de toxines par injection intrapéritonéenne pour établir les facteurs d'équivalence de toxicité (FET). Des études de toxicité orale sont néanmoins en cours pour ces congénères de toxines dans plus d'un pays, dont notamment la Nouvelle-Zélande, et les résultats révèlent des différences significatives entre la toxicité orale et la toxicité intrapéritonéenne ; dans certains cas certains analogues sont nettement plus toxiques oralement et dans d'autres cas, ils sont moins toxiques.

Par ailleurs, les informations disponibles sur des cas d'intoxication toxique par des mollusques dans le contexte néo-zélandais indiquent qu'en cas de présence de saxitoxine et de néo-saxitoxine dans des mollusques, il est possible qu'il y ait une marge de sécurité insuffisante entre la valeur actuelle de 0,8 mg/kg et le point où les consommateurs tombent malades par rapport aux marges de sécurité appliquées pour d'autres contaminants alimentaires. D'autres analogues de toxines présents dans nos eaux (principalement des toxines C) n'ont à notre connaissance pas provoqué de maladie, même à 20-30 mg/kg de mollusques consommés.

À la lumière de ceci, la Nouvelle-Zélande propose au Comité d'envisager de faire progresser la section sur les méthodes pour les biotoxines de la Norme sur les mollusques bivalves en:

- Établissant des méthodes de référence pour l'acide domoïque et ses isomères, pour le groupe de l'acide okadaïque et les azaspiracides.
- Éliminant les limites et méthodes d'analyse pour les brévétotoxines, car elles ne font actuellement pas l'objet de dépistage dans les produits échangés dans le commerce international.
- Insérant 'à élaborer' pour la méthode de référence pour le groupe des saxitoxines dans l'attente de nouveaux progrès scientifiques permettant d'établir des facteurs corrects d'équivalence de toxicité orale. Insérant à cet effet une note de bas de page et en notant que nombre de méthodes sont actuellement utilisées dans le monde et qu'elles donnent un degré de protection raisonnable.

Nous annexons un exemplaire d'un article néo-zélandais récent qui décrit pourquoi les études toxicologiques IP et donc les méthodes d'analyse sur lesquelles elles reposent sont inappropriées. Cet article fait partie de nos observations et nous demandons que le Comité tienne compte de ces informations dans ses délibérations sur ce sujet.

Selon l'avis de la Nouvelle-Zélande, le concept de la 'toxicité totale' reposant sur le bio-essai sur souris IP est erroné et pose un double problème. Il y a d'une part la surestimation du risque provenant de certains analogues de toxines et d'autre part la sous-estimation du risque provenant de certains analogues de toxines. La poursuite de l'utilisation des bio-essais sur souris empêche d'établir des limites avec des marges de sécurité appropriées comme celles qui s'appliqueraient pour d'autres contaminants. Le même problème s'est

posé pour les toxines lipophiles et il a été largement résolu en analysant la présence de composants spécifiques. Il faut faire la même chose pour le groupe de composés de saxitoxines.

Les critères convenus pendant la réunion du CCFFP en 2012 étaient le résultat de compromis concédés par de nombreuses délégations désireuses d'atteindre un résultat. Un élément clé de ce compromis était de ne pas inclure les FET à cause d'un manque de consensus. Si l'approche par critères est maintenue, la Nouvelle-Zélande ne peut accepter que l'inclusion de FET dérivés d'études sur la toxicité orale. La Nouvelle-Zélande n'est pas d'accord avec l'inclusion de FET provenant d'études IP.

Dépistage contre méthodes de référence

Il existe un débat secondaire, et encore non résolu à ce stade, sur la relation entre les méthodes de dépistage validées et les méthodes de référence – certains pays insistent sur l'utilisation de méthodes de référence pour analyser des produits dans le commerce. D'autres estiment que des méthodes de dépistage validées ou d'autres méthodes de confirmation que la méthode de référence devraient suffire à condition qu'elles soient validées pour garantir que le produit soumis à ces méthodes de dépistage satisfasse toujours à la méthode de référence pertinente.

La Nouvelle-Zélande estime fermement que peu importe la méthode utilisée pour le dépistage de produits pourvu que quand un produit est analysé par une méthode de référence, le résultat se situe au sein de limites acceptables. S'il peut être convenu d'insérer un libellé à cet effet dans la Norme pour les mollusques bivalves, cela pourrait contribuer à résoudre les difficultés que certains pays ont avec les méthodes de référence qu'ils ne peuvent actuellement pas mettre en œuvre en raison de leur complexité technique ou de leur coût.