



PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES
COMITÉ DU CODEX SUR LES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES DANS LES
ALIMENTS

Vingtième session

San Juan, Puerto Rico, 7 - 11 mai 2012

AVANT-PROJET PROPOSÉ DE DIRECTIVES SUR LES CRITÈRES DE PERFORMANCE DES
MÉTHODES D'ANALYSE MULTI-RÉSIDUS (ANNEXE AU CAC/GL 71-2009)

(N01-2011)

à l'étape 3

(Rapport du Groupe de travail électronique du CCRVDF sur les méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments, dirigé par le Canada et le Royaume-Uni, avec l'assistance de l'Australie, du Brésil, du Costa Rica, de l'Union européenne, de la France, de l'Allemagne, des Pays-Bas, de la Nouvelle-Zélande, de la Suède, de la Suisse, du Royaume-Uni, des États-Unis d'Amérique, de l'Uruguay, de l'AIEA, de la FIL de l'IFAH)

Les gouvernements et les organisations internationales qui souhaitent formuler des observations à l'étape 3 sur l'Avant-projet de Directives sur les caractéristiques de performance des méthodes d'analyse multi-résidus (voir l'Annexe 1), sont invités à le faire **au plus tard le 31 mars 2012**, comme suit : les observations devront être transmises, par courrier électronique de préférence, au U.S. Codex Office, Food Safety and Inspection Service - US Department of Agriculture, Room 4861 South Building, 14th Independence Ave., SW - Washington, DC, 20250 États-Unis (télécopie: +1 202 720 3157, ou **de préférence** par courrier électronique: CCRVDF-USSEC@fsis.usda.gov , avec copie au Secrétaire, Commission du Codex Alimentarius, Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie (télécopie: +39 06 57054593; adresse électronique Codex@fao.org **préférentiellement**).

Format de présentation des observations : Afin de faciliter la compilation des observations et la préparation des documents d'observations, les membres et les observateurs qui ne le font pas encore sont priés de soumettre leurs observations selon les directives décrites à l'Annexe 2 du présent document.

Introduction

1. La dix-neuvième session du CCRVDF a débattu des questions entourant les méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires et de la possibilité d'élargir les directives existantes aux critères de performance des méthodes d'analyse d'un résidu présentées dans le CAC/GL 71-2009 afin d'y inclure les méthodes d'analyse multi-résidus.

2. À cette fin et pour aborder la question de la disponibilité des méthodes, le Comité a décidé de créer un groupe de travail électronique présidé par le Canada et le Royaume-Uni, travaillant en anglais et ouvert à tous les membres et aux observateurs, et chargé du mandat suivant :

- Préparer un avant-projet d'Annexe sur les critères de performance pour les méthodes d'analyse multi-résidus pour les médicaments vétérinaires à inclure dans les Directives pour la conception et la mise en œuvre d'un programme national de réglementation d'assurance de la sécurité alimentaire concernant les risques liés à l'utilisation de médicaments vétérinaires sur des animaux producteurs d'aliments (CAC/GL 71-2009); et
- étudier les possibilités de faciliter la communication avec l'AIEA au sujet du développement de la base de données sur les méthodes d'analyse et les normes de référence.

Avancement

3. Le groupe de travail électronique a rédigé une annexe sur les critères de performance des méthodes d'analyse multi-résidus et l'a révisée en trois itérations. En plus des observations reçues par le groupe de rédaction, des présentations ont été faites à ce sujet à un certain nombre de réunions internationales de chercheurs, suite auxquelles les avis des participants ont été obtenus afin de faciliter la préparation de cet avant-projet d'annexe. La version préliminaire des critères de performance des méthodes d'analyse multi-résidus est jointe pour examen par le Comité.

4. Des discussions ont eu lieu avec l'AIEA, et on évalue actuellement une base de données qui servira à compiler les méthodes d'analyse multi-résidus. Une mise à jour de l'avancement du projet sera présentée au Comité à sa vingtième session.

Recommandations

- i. Examiner l'avant-projet de l'annexe sur les critères de performance des méthodes d'analyse multi-résidus (voir Annexe 1) et présenter des observations sur la version actuelle, de manière à avancer le projet selon le processus à étape, s'il y a lieu.
- ii. Examiner les progrès réalisés par l'AIEA (mise à jour présentée à la vingtième session) dans l'élaboration d'une base de données des méthodes d'analyse multi-résidus et solliciter de l'information auprès des pays membres et d'autres instances au sujet des méthodes d'analyse multi-résidus pour la base de données.

Annexe 1

**AVANT-PROJET DE DIRECTIVES SUR LES CRITÈRES DE PERFORMANCE DES MÉTHODES
D'ANALYSE MULTI-RÉSIDUS (MMR) APPLICABLES AUX RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS
VÉTÉRINAIRES**

(ANNEXE AU DOCUMENT CAC/GL 71-2009)

(N01-2011)

à l'étape 3

TABLE DES MATIÈRES

	Paragraphes
Généralités	1-3
Introduction	4-9
Champ d'application	10
Critères de performance des MMR	11-39
Caractéristiques de performance des méthodes de dépistage	11-16
Caractéristiques de performance des méthodes quantitatives	17-29
Caractéristiques de performance des méthodes de confirmation	30-39
Caractéristiques générales de performance pour utilisation dans un programme de contrôle réglementaire	40-43
Autres considérations	44-47
Tableaux 1-6	
Glossaire	
Abréviations	

Généralités

1. La Commission du Codex Alimentarius (CCA) a adopté des directives en 2008 pour concevoir et mettre en œuvre des programmes nationaux de réglementation en matière de salubrité des aliments en regard à l'utilisation de médicaments vétérinaires dans les animaux destinés à la consommation (CAC/GL 71-2009). Ces directives ont été conçues de manière à comprendre une orientation générale au sujet de la validation des méthodes d'analyse pour une utilisation avec des analytes uniques dans les conditions de validation unique en laboratoire (tel qu'indiqué dans le document CAC/GL 71-2009) et de manière à pouvoir être mises à jour selon les besoins pour permettre de couvrir d'autres domaines pertinents.

2. La dix-huitième session du CCRVDF a reconnu que la pratique ayant cours dans les laboratoires d'analyse qui effectuent ces travaux consiste à appliquer les méthodes d'analyse multi-résidus dans toute la mesure du possible afin d'accroître l'efficacité des travaux tout en maintenant les coûts à un niveau minimal. Toutefois, le Comité a également reconnu à cette même session que les données sur les caractéristiques de performance des méthodes analytiques multi-résidus étaient très limitées. Le présent document d'orientation vise à combler cette lacune.

3. Il est tenu pour acquis que les pays en développement pourraient avoir besoin d'une période de transition et/ou d'assistance technique dans leurs démarches visant à intégrer des directives.

Introduction

4. Les méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments doivent être capables de détecter sans risque d'erreur la présence ou l'absence d'une certaine substance à doser (méthodes de sélection), d'en déterminer la concentration (méthodes quantitatives), et d'identifier correctement la

substance recherchée (méthodes de confirmation). Lorsqu'une méthode d'analyse est utilisée pour déterminer que la limite maximale de résidus (LMR) définie d'un médicament vétérinaire approuvé a été excédée, il est impératif de confirmer les résultats avant de prendre les mesures prévues par la réglementation. Les mesures de réglementation pourraient inclure l'interdiction du produit sur le marché, la destruction du produit ou l'imposition de sanctions financières. Dans le cas de substances dont l'utilisation sur les animaux destinés à l'alimentation n'est pas approuvée ou a été interdite parce qu'aucune dose journalière acceptable (DJA) ni LMR n'a été fixée pour des raisons toxicologiques, il faut confirmer la présence de ce médicament, quelle qu'en soit la concentration, à l'aide d'une méthode de confirmation qui respecte les critères énoncés dans le CAC/GL 71-2009, puisque cette découverte peut automatiquement déclencher la prise de mesures réglementaires.

5. Les documents d'orientation technique publiés par la CCA visent à aider les pays engagés dans le contrôle des importations et des exportations de denrées alimentaires à imposer des exigences au chapitre des échanges de denrées alimentaires, dans le but de protéger les consommateurs et de faciliter le commerce. Dans ces documents, on recommande que « les laboratoires spécialisés dans les analyses réglementaires soient conformes à la norme ISO/IEC 17025:2005 - Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essai ». Les laboratoires devraient également participer à des programmes de tests d'aptitude pour l'analyse des denrées alimentaires qui respectent les exigences énoncées dans le « Protocole international harmonisé pour les essais d'aptitude des laboratoires d'analyse (chimique) », et, si possible, utiliser des méthodes d'analyse qui ont été validées selon les principes fixés par la CCA (voir CAC/GL 27-1997). En outre, les laboratoires doivent utiliser des procédés internes de contrôle de la qualité qui sont conformes aux procédures décrites dans les « Directives harmonisées sur le contrôle de qualité interne des laboratoires de chimie appliquée. » La section 5.4.5 de l'ISO/IEC 17025:2005 fournit des directives générales sur l'utilisation des méthodes validées.

6. Les méthodes d'analyse validées sont des méthodes présentant des paramètres opérationnels qui ont été jugées adaptées aux programmes de contrôle réglementaire (« adaptées à l'usage » dans un contexte réglementaire). La CCA a adopté dans le CAC/GL 49-2003 les directives applicables à la validation en laboratoire unique des méthodes d'analyse émises par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA) [RÉFÉRENCE : M. Thompson, S.L.R. Ellison and R. Wood. "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis" Pure Appl. Chem., 74 (5), 835-855 (2002)]. Ces directives ont également été intégrées aux « Critères généraux de sélection des méthodes d'analyse validées par un laboratoire unique » compris dans le Manuel de procédure de la CCA, vingtième édition. Ce document d'orientation aborde les attributs des MMR utilisées pour identifier un éventail d'analytes dans la même analyse ainsi que les exigences qu'ils doivent respecter pour être jugés utilisables dans les programmes de contrôle réglementaire des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments.

7. Le CCRVDF a préparé des directives pour traiter de la validation dans un laboratoire unique de méthodes portant sur un seul analyte (CAC/GL 71-2009). Toutefois, afin d'accroître l'efficacité des travaux et le cycle de rotation des échantillons, de nombreux laboratoires se tournent vers les méthodes multi-résidus, qui peuvent servir à déceler plusieurs analytes de classes identiques ou différentes. Aux fins du présent document, une méthode d'analyse multi-résidus est considérée comme une méthode comprenant au moins trois substances à analyser dans la même catégorie ou plus d'une classe de médicaments vétérinaires dans son champ d'application. Ces méthodes sont le plus couramment utilisées dans les laboratoires pour le dépistage de résidus de médicaments vétérinaires dans les échantillons, mais elles peuvent aussi être utilisées à la fois pour des analyses quantitatives et confirmatoires. Ce document traite donc des trois types d'analyses/méthodes et constitue une annexe au CAC/GL 71-2009. Il convient de mentionner qu'une MMR validée peut inclure certains analytes dont les exigences de performance des analyses quantitatives ont été pleinement validées, tandis que d'autres analytes ne respectent pas les critères de précision ou de récupération des analyses quantitatives ni les exigences applicables aux données nécessaires à la confirmation de présence du résidu. Lorsque la méthode est validée pour détecter ces analytes à la limite acceptée requise, elle peut alors servir au dépistage d'analytes qui, en cas de présence, devront ensuite être quantifiés à l'aide d'une méthode qui a été validée pour l'analyse quantitative de l'analyte visé ou qui a été confirmée à l'aide d'une méthode de confirmation convenablement validée, conformément aux critères prévus dans CAC/GL 71-2009.

8. Les principes décrits dans cette section sont considérés comme étant d'application pratique et adaptés à la détermination des caractéristiques de performance des méthodes d'analyse multi-résidus dans les programmes de contrôle réglementaire. Ces principes sont fondés sur les recommandations élaborées à

l'issue d'une consultation de l'AOAC de la FAO et de l'AIEA tenue à Miskolc, en Hongrie, en 1999 [RÉFÉRENCE : A. Fajgelj & A. Ambrus Principles and Practices of Method Validation, Royal Society of Chemistry, 2000]. Toutes les caractéristiques de performance ou un sous-ensemble peuvent être utilisées pour déterminer l'adéquation de la méthode au cours de sa validation (« adaptée à l'usage ») pour utilisation dans un contexte réglementaire. Elles s'appliquent tout aussi bien au MMR d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires.

9. La vingtième édition du Manuel de procédure de la CCA fournit des « Critères généraux de sélection des méthodes d'analyse validées par un laboratoire unique ». Les « Instructions de travail pour l'application de la démarche critères dans le Codex, Tableau 1 : Directives pour l'établissement de valeurs numériques pour le critère » contenues dans ce document sont pertinentes pour les MMR, tel qu'il en est question ci-après, tout comme le sont 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 ». Par souci d'harmonisation, les directives sur les critères de performance des méthodes analytiques appliquées aux résidus de médicaments vétérinaires devraient être compatibles avec les directives générales déjà approuvées par la CCA. En outre, un document d'orientation sur la validation et le contrôle de qualité a été récemment publié par l'Union européenne (SANCO/10684/2009) pour les analyses de résidus de pesticides. Le document de l'UE couvre les méthodes d'analyse multi-résidus, principalement les analyses de confirmation, mais aborde également plusieurs méthodes de dépistage de résidus par spectrométrie de masse. Des éléments du document SANCO/10684/2009 ont été intégrés dans le présent document lorsqu'il y avait lieu.

Champ d'application

10. Les présentes directives s'appliquent aux MMR servant à l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires, y compris les médicaments vétérinaires et les pesticides approuvés. Certains programmes de contrôle des résidus peuvent inclure d'autres groupes d'analytes, comme les pesticides et les contaminants de l'environnement. Des directives sur la validation des méthodes d'analyse multi-résidus applicables aux pesticides à usage autre que vétérinaire sont fournies dans le document CAC/GL 40-1993 : *Directives concernant les bonnes pratiques de laboratoire en matière d'analyse des résidus de pesticides*.

Caractéristiques de performance des méthodes d'analyse multi-résidus

Caractéristiques de performance des méthodes de dépistage

11. Bien que les sections suivantes décrivent les caractéristiques de performance applicables aux méthodes de dépistage, aux méthodes quantitatives et aux méthodes confirmatoires en général, il faut savoir que ces caractéristiques de performance doivent être définies et mesurées pour chaque analyte répertorié dans le champ d'application de la méthode multi-résidus entièrement optimisée. Il est préférable de procéder de la sorte une fois qu'il a été déterminé que l'élaboration et/ou la modification de la méthode est complète et que la méthode ne subira plus d'autres changements ou modifications. À cet égard, les concepts sont très similaires à ceux décrits dans les documents d'orientation concernant les caractéristiques de performance d'un analyte dans une méthode visant un seul analyte.

12. Les méthodes de dépistage sont généralement de nature qualitative ou semi-quantitative et couvrent souvent plusieurs analytes. Ces méthodes ont pour objectif de faire la distinction entre des échantillons ne contenant pas de résidus en quantité dépassant un seuil donné (échantillons « négatifs ») et des échantillons qui peuvent contenir des résidus dépassant ce seuil (échantillons « positifs »). Dès lors, la stratégie de validation consiste à établir un seuil de concentration au delà duquel les résultats sont « positifs », à déterminer statistiquement un taux pour les résultats « faux positifs » et « faux négatifs », à rechercher les interférences et à fixer des conditions d'utilisation appropriées.

13. La *sélectivité* d'une méthode de dépistage qualitative (binaire) est la capacité de la méthode à déterminer que les échantillons qui donnent un résultat négatif sont réellement négatifs. La méthode qualitative binaire a deux résultats possibles, soit oui/non ou positif/négatif. La méthode de dépistage doit aussi pouvoir différencier l'analyte ou le groupe d'analytes ciblés des autres analytes éventuellement présents dans l'échantillon. Dans une méthode de dépistage, la sélectivité n'est pas aussi grande que dans une méthode quantitative, parce que les méthodes de dépistage s'appuient souvent sur des caractéristiques structurelles communes à un groupe ou à une catégorie d'analytes. Ces méthodes, qui appartiennent en général à la catégorie des méthodes de dépistage qualitatives, sont souvent fondées sur l'inhibition de la

croissance microbiologique, des essais d'immunologie ou des réactions chromogènes qui peuvent identifier un analyte de manière non équivoque. On peut augmenter la sélectivité d'une méthode de dépistage en l'utilisant comme système de détection après une chromatographie ou une autre technique de séparation. Pour les tests de dépistage, on recommande un taux de sélectivité de 95 pour cent au moins, avec une certitude de 95 pour cent (valeur recommandée pour les tests de dépistage qualitatifs appliqués aux substances approuvées pour les besoins de réglementation), et 60 analyses faites sur des matériaux d'échantillons à blanc provenant d'au moins six sources différentes. Tous les résultats devraient être négatifs. À titre de comparaison, afin d'obtenir un taux de sélectivité minimal de 99 pour cent avec un niveau de confiance de 95 pour cent, il faudrait analyser 299 échantillons produisant tous des résultats négatifs. On peut ensuite faire des tests supplémentaires pour détecter les interférences potentielles en testant des matériaux d'échantillons à blanc fortifiés de substances interférentes potentielles (inclusivité et exclusivité), comme d'autres médicaments utilisés pour le traitement animal, des contaminants potentiels de l'environnement, des métabolites de médicament ou des substances de même nature chimique. Ici aussi, les résultats devraient être négatifs lorsque ces substances sont présentes à des taux de concentration auxquels on peut s'attendre normalement dans un échantillon.

14. Pour les tests de dépistage qualitatifs, en particulier ceux qui font usage de kits de dépistage donnant deux types de réponse (présence ou absence d'analyte), les termes « *concentration de dépistage* » et « *sensibilité de dépistage* » ou *seuil de dépistage* » désignent la plus petite concentration à laquelle l'analyte recherché peut être détecté avec certitude, dans des limites statistiques déterminées. Par exemple, dans le Performance Tested Program™ de l'AOAC, pour les kits de dépistage, certaines conditions sont nécessaires pour respecter les exigences minimales de sensibilité à un taux de dépistage positif de 90 pour cent et un intervalle de confiance de 95 pour cent. Ces conditions exigent qu'un minimum de 30 matériaux d'échantillons exempts de résidus fortifiés (provenant préférablement d'au moins six sources différentes) enrichis avec le ou les analytes recherchés donnent un résultat positif lorsqu'ils sont fortifiés à la concentration recherchée. Trois résultats négatifs ou plus constituent un échec du test de sensibilité. Si un ou deux résultats sont négatifs, l'expérience doit être répétée et deux résultats négatifs constitueraient alors un échec. L'expérience doit être répétée avec le matériau absorbé connu à la concentration recherchée, si ce matériau est disponible. D'autres approches, comme les conseils publiés par l'UE au sujet de l'établissement des seuils et de la capacité de décèlement des analyses de dépistage peuvent aussi être utilisées. ([http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline Validation Screening en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf))

15. La concentration de dépistage du test binaire qualitatif d'un analyte particulier est établie en menant des expériences de concentration-réponse, généralement à l'aide de 30 répliques (provenant d'au moins six sources) fortifiés dans des échantillons de contrôle connus à chacune des séries de concentration croissante. Les mêmes 30 échantillons de contrôle sont aussi analysés directement (sans inoculation) afin de produire des données de contrôle. Une fois que les concentrations ont été établies et que les 30 répliques des échantillons de contrôle donnent une réponse négative et que les 30 répliques fortifiés donnent tous une réponse positive, l'expérience est répétée en utilisant les matériaux de matrice de contrôle fortifiés aux quatre concentrations uniformément espacées entre les concentrations « toutes négatives » et « toutes positives ». Une série supplémentaire est testée à une concentration de 20 pour cent au-dessus de la concentration « toutes positives ». L'analyse statistique des résultats permet à l'utilisateur d'établir une concentration de détection fiable à la limite de confiance requise (habituellement 95 pour cent) [RÉFÉRENCE : Finney, D.J. 1978. *Statistical method in biological assay*. 3rd edition. New York, USA, MacMillan Publishing Co.].

16. Au cours de la préparation du présent document d'orientation, un nouveau concept a été mis au point sous les auspices de l'AOAC International; ce concept regroupe les paramètres qualitatifs applicables à la sensibilité de dépistage, aux faux positifs et au faux négatifs (décrits ci-dessus) en un seul paramètre appelé « probabilité de détection ». La probabilité de détection couvre toutes les fourchettes de concentration et les résultats nuls et non nuls, et permet d'obtenir une simple représentation graphique des données de laboratoire sous forme de courbe POD représentée d'après la concentration avec les barres d'erreur associées. En utilisant cette approche, il est possible de calculer la précision et la justesse des tests qualitatifs. [REFERENCE: Wehling, P., LaBude, R. A., Brunelle, S., & Nelson, T. Probability of detection (POD) as a statistical method for validation of qualitative methods. *J.AOAC International* 94 (1), 335-347, (2011)]. Ce paramètre simplifié mérite d'être pris en compte lors de la mise au point des expériences de validation des méthodes de dépistage binaire qualitatif des multi-résidus.

Caractéristiques de performance des méthodes quantitatives

17. La sélectivité est la capacité d'une méthode à déterminer un ou des analyte(s) particulier(s) dans des mélanges ou des matrices sans interférences d'autres composants au comportement similaire (CAC/GL 72-2009). Les limites de détection et de quantification prévues pour différentes limites d'action sont spécifiées dans la vingtième édition du Manuel de procédure de la CCA, au Tableau 1 « Directives pour l'établissement de valeurs numériques pour le critère » et peuvent servir à sélectionner une concentration de dépistage appropriée en fonction de l'essai. Il s'agit de l'aptitude d'une méthode d'analyse à détecter et à distinguer le signal d'un composé en présence d'autres composés qui peuvent être présents dans l'échantillon, et cette aptitude revêt une importance particulière lors de la définition des caractéristiques de performance des méthodes utilisées dans des programmes de contrôle réglementaire des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. Pour une méthode quantitative, la prescription exige que le signal utilisé pour la quantification ne se rapporte qu'à la substance à analyser et ne provoque aucune interférence due aux matériaux extraits ni ne soit influencé de toute autre manière par les effets de la matrice, à moins d'être convenablement corrigé. Les analyses chromatographiques à base de pics non pleinement expliqués donnent des résultats quantitatifs relativement peu fiables. L'emploi de détecteurs spécifiques de certains éléments, ou de détecteurs par ondes, ou de détecteurs par sélection de masse qui sont plus spécifiques d'un composé ou d'une structure particulière, combiné à une technique de séparation chromatographique, améliore la sélectivité des méthodes quantitatives de contrôle de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments.

18. En plus de la sélectivité, la méthode doit aussi être apte à fournir des résultats quantitatifs fiables et pouvant être démontrée. Deux facteurs entre nt en jeu à cet égard, qui contribuent tous les deux à l'incertitude de mesure dans les résultats obtenus avec la méthode :

- la proximité entre le résultat rapporté et la valeur réelle de la concentration de l'analyte présent dans l'échantillon, exprimée en termes de *justesse*, de *véracité* ou de *biais*; et
- l'aptitude de la méthode à fournir des résultats identiques pour des essais répétés (ou des valeurs acceptées dans le cas des matériaux de référence), exprimée en termes de *précision* (*répétabilité* et *reproductibilité*).

19. Il a été recommandé que les méthodes utilisées pour étayer les LMR du Codex soient conformes, en ce qui concerne la justesse et la précision, aux normes de performance figurant dans le tableau 1. Ces normes sont les mêmes que les limites actuelles appliquées aux analytes uniques de résidus de médicaments vétérinaires énoncées dans le CAC/GL 71-2009, et l'examen des données provenant de laboratoires utilisant des MMR laisse entrevoir que ces normes peuvent être adoptées pour les MMR, surtout si l'analyse de confirmation est effectuée selon des méthodes d'analyse plus particulièrement adaptées aux analytes uniques.

20. La *justesse* (véracité, biais) des résultats d'une méthode peut être déterminée par l'analyse répétée d'un matériau de référence certifié, en comparant ces résultats à ceux obtenus en utilisant une autre méthode pour laquelle les caractéristiques de performance ont été auparavant rigoureusement établies (habituellement une méthode étudiée en collaboration) ou, en l'absence de matériaux ou de méthodes de référence validées par un essai inter-laboratoires, en déterminant la justesse de l'analyte fortifié à blanc dans le matériau d'échantillon à blanc connu. L'utilisation, dans la mesure du possible, d'un analogue étiqueté isotopiquement stable ou d'une norme interne doit être encouragée, et peut améliorer l'exactitude des mesures et la précision de l'analyse, et permettre l'utilisation de limites plus strictes que celles utilisées pour la justesse indiquée dans le tableau 1. Le degré de justesse exigé des méthodes variera en fonction de l'utilisation que l'on entend faire des résultats dans le cadre de la réglementation. La justesse devrait être caractérisée avec soin à des concentrations proches de la LMR ou de la concentration retenue pour une mesure réglementaire (en général de 0,5 à 2 fois la concentration cible) pour faire en sorte que des mesures réglementaires ne soient prises que si des échantillons contiennent des résidus excédant les limites réglementaires, dans des limites statistiques de fiabilité. Lorsqu'aucune directive ne fournit de concentration recherchée, il est proposé d'adopter une valeur provisoire dans la fourchette de 1 à 10 µg/kg, pourvu que l'on dispose d'une confiance raisonnable d'absence d'incidence toxicologique significative, en attendant d'obtenir des directives plus formelles.

21. La *récupération* s'exprime habituellement sous forme de pourcentage de l'analyte déterminé par des expériences après fortification du matériau d'échantillons à une concentration connue et devrait être évaluée à des concentrations qui couvrent la fourchette d'analyse de la méthode. Lorsqu'on interprète les pourcentages de récupération, il faut bien savoir que l'analyte ajouté à un échantillon ne se comportera pas nécessairement de la même manière que cette même substance absorbée par la voie biologique (résidu de

médicament vétérinaire). Dans de nombreux cas, la quantité d'un résidu absorbé qui est extraite (le produit ou la fraction récupérée) est inférieure au total des résidus absorbés présents. Cette différence peut être dû à des pertes pendant l'extraction, à la liaison intracellulaire des résidus, à la présence de conjugués ou à d'autres facteurs qui ne sont pas entièrement représentés par des expériences de récupération réalisées avec des blancs fortifiés d'analyte, et les récupérations peuvent varier selon la concentration des résidus présents. Quels que soient les pourcentages de récupération moyens observés, il est souhaitable que la récupération présente une faible variabilité de manière à ce qu'on puisse faire une correction fiable, si nécessaire. Les corrections de récupération devraient être conformes aux orientations de la Commission du Codex Alimentarius (CAC/GL 37-2001).

22. La *fidélité*, qui quantifie les écarts entre les résultats d'essais sur des portions d'un même échantillon, est un facteur important à prendre en considération lorsqu'on détermine quand un résidu présent dans un échantillon doit être considéré comme excédant une LMR ou une autre limite réglementaire. Elle peut s'exprimer en termes de *répétabilité* (au sein d'un laboratoire) et de *reproductibilité* (interlaboratoires) lorsque la méthode a été soumise à des essais dans plusieurs laboratoires. Pour la validation des méthodes par un laboratoire unique, la précision en tant que répétabilité devrait être déterminée à partir d'expériences réalisées à des jours différents, en utilisant un minimum de six sources de tissus, avec des lots de réactifs différents (et un matériel différent, etc.) et de préférence par des analystes différents. La fidélité d'une méthode s'exprime généralement en écart-type. Une autre expression utile est l'écart-type relatif, ou coefficient de variation (l'écart-type, divisé par la valeur absolue de la moyenne arithmétique). On peut l'exprimer en pourcentage en multipliant par 100.

23. Les méthodes quantitatives se fondent généralement sur la comparaison entre la réponse d'une substance à analyser et la réponse d'étalons de la substance à analyser dans des solutions à des concentrations connues. Lors de l'élaboration et de la validation de la méthode, la courbe d'étalonnage devrait être déterminée pour évaluer la réponse du détecteur aux étalons en fonction d'un éventail de concentrations. Ces concentrations (un minimum de cinq, plus les blancs) devraient couvrir l'ensemble de la fourchette recherchée d'analyse et la courbe résultante devrait être exprimée statistiquement. Bien qu'il soit recommandé dans la pratique d'inclure un échantillon à blanc dans les étalons d'analyse, cela n'implique pas pour autant qu'on puisse extrapoler les résultats à la région située en-dessous de la courbe sous l'étalon le plus bas pour obtenir un résultat quantitatif. La fonction d'analyse se rapporte à la réponse pour la substance à analyser récupérée à partir du matériau d'échantillons à différentes concentrations dans la fourchette recherchée d'analyse. Par conséquent, il est implicite que, dans de telles circonstances, la fonction analytique est dérivée en présence des réactifs utilisés dans les matrices et les co-extractifs de la méthode, et non à partir des mesures prises à l'aide de solutions étalons pures, sauf s'il a été prouvé que la réponse du signal de détection de l'étalon pur n'est pas influencée par la présence des réactifs et des composants de la matrice apparentés à la méthode. Pour les substances à analyser pour lesquelles une LMRMV a été établie dans un matériau d'échantillons particulier (matrice), la réponse est en général déterminée pour un matériau d'échantillons à blanc ou pour des matériaux d'échantillons à blanc fortifiés à chaque 0,5x, 1,0x et 2,0x la LMR (il est recommandé d'utiliser six sources différentes de blancs).

24. On observe une certaine ambiguïté dans la littérature scientifique quant aux termes « matrice fortifiée » et « matrice appariée ». De la terminologie a été proposée pour clarifier cette position (RÉFÉRENCE : Wang, J., Cheung, W., & Grant, D. (2005) Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, J. Agric. Food Chem. 53: 528-537), et les définitions ci-dessous seront utilisées dans ce texte.

- Courbe d'étalonnage standard – Courbe d'étalonnage préparée selon des normes en l'absence de matrice, habituellement appelée courbe d'« étalonnage externe dans la littérature scientifique;
- Courbe d'étalonnage ajustée à la matrice – Courbe d'étalonnage préparée par addition de normes à la matrice témoin après extraction; et
- Méthode de la courbe d'étalonnage ajustée à la matrice, également connue sous le nom de courbe d'étalonnage standard enrichie par la matrice, soit une courbe d'étalonnage préparée par addition de normes à la matrice témoin avant extraction.

25. L'expérience de fonction d'analyse peut aussi être utilisée pour calculer la récupération analytique à chaque concentration et revêt une importance particulière lorsque la présence de produits co-extraits de la matrice modifie la réponse de la substance à analyser par rapport aux étalons d'analyse. La régression,

qu'elle soit linéaire ou quadratique, est déterminée à partir des expériences de fonction d'analyse décrites et est l'expression statistique de la courbe obtenue pour l'analyse de matériaux d'échantillons fortifiés aux concentrations recherchées, une fois qu'il est prouvé que les données adaptées respectent les exigences applicables à la régression. La pondération de la régression, par exemple $1/x$, $1/x^2$, etc. devrait être considérée, surtout pour l'analyse de résidus une fois qu'un dépistage de résidus en bonne et due forme a été réalisé afin de déterminer le facteur de pondération d'après l'homoscédasticité ou une caractéristique des données. La régression linéaire ou quadratique pondérée permet de montrer une limite inférieure de quantification avec un degré accru de précision et d'exactitude. Il est de plus en plus courant dans les méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments de baser la détermination quantitative sur une courbe type préparée en ajoutant une norme à un matériau de matrice à blanc représentatif connu avant de procéder à l'extraction de l'analyte à un éventail de concentrations appropriées couvrant la valeur recherchée (la fonction analytique). L'utilisation d'une telle courbe-type adaptée à la matrice pour l'étalonnage intègre une correction de la récupération aux résultats d'analyse obtenus.

26. La définition acceptée de la *sensibilité* (CAC/GL 72-2009) est le « quotient du changement dans l'indication d'un système de mesure et le changement correspondant dans la valeur de la quantité mesurée »; cette propriété est associée à la pente de la courbe d'étalonnage et de la capacité de distinguer les écarts de concentration de l'analyte. Il faut fixer les limites inférieures de substances à analyser dont on pourra déceler la présence avec certitude par détection, quantification ou confirmation en utilisant une méthode particulière d'analyse. La *limite de détection* d'une méthode est définie dans CAC/GL 72-2009 et peut se définir en pratique comme la plus petite quantité ou concentration mesurée de substance à analyser qui permet de déduire la présence de la substance dans la prise d'essai (sans pour autant l'identifier ou la confirmer). Cependant, on estime de plus en plus qu'il n'est pas très utile de connaître cette caractéristique, en raison de la variabilité inhérente aux différents détecteurs, etc. On pense que la limite de dépistage est déterminée uniquement lorsque les exigences de performance de la méthode approchent cette limite. On peut la calculer à partir de l'écart-type ($s_{y/x}$) à partir de l'analyse de régression linéaire de la courbe-type générée par la fonction d'analyse expérimentée ci-dessus (RÉFÉRENCE : Miller, J.C. & Miller, J.N. 1993. *Statistics for analytical chemistry*. 3rd Edition. Chichester, UK, Ellis Horwood Ltd.). La limite de détection est alors calculée en utilisant le point d'interception y (en supposant qu'il s'agit d'une valeur positive) de la courbe et trois fois $s_{y/x}$. Cette approche donne une estimation plus prudente de la limite de détection. La limite de détection peut également être estimée à l'aide de mesures prises sur des substances d'essai représentatives de la réaction la moins appropriée de l'analyte du blanc ajouté au triple de son écart-type. Lorsque l'on a recours à cette approche, il s'avère souvent nécessaire de fortifier les substances d'essai à une concentration entraînant une réaction quasiment indétectable afin d'obtenir un écart-type du blanc approximatif.

27. La *limite de quantification* (LQ), également appelée limite de quantification, peut être établie à partir des mêmes expériences en utilisant le point d'interception y de la courbe plus dix fois $s_{y/x}$. Pour les méthodes utilisées pour étayer des LMR établies par la Commission du Codex Alimentarius, la limite de quantification devrait répondre aux critères de fidélité et de justesse (récupération) du tableau 1 et devrait être égale ou inférieure à 0,5x la LMR. Cependant, quand la limite de quantification d'une méthode est plus basse que les concentrations réelles vérifiées pour la conformité à une LMR, la validation et l'application ultérieure de la méthode devraient être basées sur *le plus petit niveau étalonné*, qui est en général égal (ou inférieur) à 0,5x la LMR. Lorsqu'elles doivent être utilisées dans un programme réglementaire, les limites de détection et de quantification sont des paramètres importants si la méthode est destinée à évaluer des expositions à des résidus, lorsqu'il peut être intéressant de contrôler les résidus à des concentrations inférieures à la LMR, ou si elle est destinée à rechercher des substances non assorties de DJA ni de LMR. Pour vérifier la conformité à une LMR, il est important d'inclure un plus petit niveau étalonné à l'analyse qui démontre de manière adéquate que la concentration de la LMR doit être déterminée avec certitude. Le plus petit niveau étalonné d'une méthode utilisée pour étayer une LMR ne devrait pas être inférieur à la limite de quantification. Le *Manuel de procédure* recommande le terme « *limite de détermination* » dans les « Termes à utiliser dans l'approche de critères. »

28. La consultation Miskolc menée en 1999 a reconnu que des approches alternatives pourraient être appliquées à la validation des méthodes. Les approches considérées comprenaient les termes « limite de décision » (CC α) et « capacité de détection » (CC β). Ces termes sont définis dans le glossaire ci-dessous et ont été adoptés subséquemment dans certains pays, par exemple dans l'Union européenne en vertu de la décision 2002/657/CE de la Commission, et devraient être acceptés comme solution de rechange à l'utilisation de la limite de détermination et de la limite de dosage.

29. *L'incertitude de mesure* est définie dans le document CAC/GL 72-2009 comme un « paramètre non négatif caractérisant la dispersion des valeurs attribuées à une mesure, d'après l'information utilisée ». Il n'existe aucune approche standard convenue pour calculer l'incertitude de mesure; plusieurs approches ont été publiées à ce sujet [RÉFÉRENCE : CAC/GL 59-2006 : Directives pour l'estimation de l'incertitude des résultats (Annexe, modifiée en 2011). RÉFÉRENCE : Technical Specification ISO/TS 21748:2004: Guidance for the repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. First edition 2004-03-15.]. L'ISO/IEC 17025:2005 exige que les laboratoires déterminent et publient le facteur d'incertitude associé aux résultats d'analyse. Dans le SANCO/10684/2009, on avance qu'une approche pratique pour permettre aux laboratoires d'estimer l'incertitude des mesures et de vérifier leurs estimations d'après leurs propres données intra-laboratoire consiste à évaluer leur performance au moyen de tests de compétence.

Caractéristiques de performance des méthodes de confirmation

30. L'analyste doit décider lui-même de la marche à suivre pour identifier un résidu de façon certaine; il s'efforcera tout particulièrement de choisir une méthode permettant d'amoindrir les effets des substances perturbatrices. En fin de compte, il incombe à l'analyste de faire des choix, de fournir des données à l'appui et d'interpréter les résultats en fonction des principes scientifiques et en posant un jugement informé [RÉFÉRENCE : Bethem, R., Boison, J. O., Gale, J., Heller, D., Lehotay, S., Loo, J., Musser, J., Price, P., & Stein, S. Establishing the Fitness for Purpose of mass spectrometric methods. J. Amer. Chem. Society for Mass Spectrometry 14 (5) 528-541(2003).].

31. La *sélectivité*, ou capacité d'une méthode à identifier de manière non équivoque un signal comme se rapportant exclusivement à un analyte spécifique, est la principale caractéristique des méthodes de confirmation. Certaines techniques instrumentales, telles que la spectroscopie aux rayons infrarouges ou la spectrométrie de masse peuvent être suffisamment sélectives pour fournir une identification non équivoque. Les méthodes confirmatoires sont souvent fondées sur ces techniques.

32. La confirmation par CG-SM repose généralement sur l'analyse d'un analyte de référence de pair avec des impondérables et nécessite l'acquisition de signaux relatifs à trois ions de diagnostic CG-(SIM)/EIMS (c.-à-d. les trois valeurs m/z , on parle du « critère de trois ions ») à approximativement la résolution de masse de l'unité, avec des tolérances correspondantes d'abondance relative dans des mesures de contrôle d'ions sélectionnés. [RÉFÉRENCE : Sphon, J. A. (1978) J. Assoc. Official Anal. Chemists. Use of mass spectrometry for confirmation of animal drug residues Chemists 61 (5), 1247-1252 (1978)]. Dans ce processus, il est tenu pour acquis que la durée de rétention de la CG correspond aussi à celle de la norme de référence. L'approche de Sphon, qui est jugée utile et scientifiquement valide, utilise l'exclusion des possibilités sans produire d'identification positive.

33. En 1996, Li *et al.* ont élargi le « critère à trois ions » de Sphon aux méthodes LC-(ESI) MS/MS. Dans les conditions de LC-MS/MS, au moins deux et préférablement trois paires d'ions produit-précurseur ont été utilisées pour remplacer le critère MS à trois ions qui s'était avéré adapté au GC-EI/MS [RÉFÉRENCE : Li, L. Y. T., Campbell, D. A., Bennett, P. K., and Henion, J. (1996) Anal Chem. 68, 3397]. Selon le critère de Li, un ion précurseur, préférablement l'ion $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ et deux fragments d'ion structurellement significatifs (ou des ions de transition du produit) couplés à des données de durée de rétention correspondantes sont nécessaires pour répondre aux critères de performance acceptés pour les méthodes réglementaires. Cependant, la confiance d'identification augmentera dès lors qu'on utilisera un plus grand nombre d'ions (ou de transitions de produit) à fragment structurellement significatif ou de points d'identification, et certains laboratoires pourront choisir d'utiliser plus que le nombre minimal suggéré.

34. Les tableaux 2 et 3 fournissent le schéma des points d'identification (PI) publié dans la décision 2002/657/CE de la Commission européenne et approuvée par le CCRVDF [RÉFÉRENCE : CAC/GL 71-2009]. On considère que les méthodes fondées sur la spectrométrie de masse à haute résolution sont plus fiables en raison de la mesure plus précise de la masse, comparativement aux techniques de spectrométrie de masse à faible résolution. Les conditions de performance des méthodes de confirmation utilisant la spectrométrie de masse à chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) à basse résolution et la spectrométrie de masse à chromatographie liquide (LC-MS), telles que publiées dans la décision 2002/657/CE de la Commission européenne et par un organe d'experts internationaux, [RÉFÉRENCE : Bethem, R., Boison, J. O., Gale, J., Heller, D., Lehotay, S., Loo, J., Musser, J., Price, P., & Stein, S. Establishing the Fitness for Purpose of mass spectrometric methods. J. Amer. Chem. Society for Mass Spectrometry 14 (5) 528-

541(2003).] sont énoncées au tableau 4. Le système de PI (tableau 2) est basé sur l'affectation arbitraire d'un point d'identification à chaque fragment d'ion structurellement important détecté à l'aide d'une méthode de spectrométrie de masse à faible résolution. En cas d'utilisation d'un instrument à faible résolution en tandem, des fragments secondaires sont détectés à partir d'un fragment primaire isolé au départ par le spectromètre. Le fait que ces fragments structurellement importants sont produits à partir de la fragmentation d'un fragment plus grand (ion parent ou précurseur) associé à la molécule apporte une plus grande certitude et chaque ion fils ou produit se voit attribuer une valeur de 1,5 point d'identification. Par conséquent, la combinaison d'un ion précurseur et de deux ions produits apporte les quatre points d'identification nécessaires si des instruments SM/SM à faible résolution sont utilisés dans une méthode de confirmation (tableau 3).

35. L'utilisation de spectromètres de masse à haute résolution dans une méthode de confirmation apporte une certitude supplémentaire, étant donné que la haute résolution permet d'identifier la masse de manière plus précise et qu'elle peut être utilisée pour prédire la composition élémentaire de chaque fragment. Pour un seul spectromètre de masse à haute résolution, chaque fragment structurellement important détecté se voit attribuer une valeur de deux points d'identification, tandis que les ions produits générés par des expériences par SM/SM à haute résolution ont chacun une valeur de 2,5 points d'identification (tableau 2).

36. Indépendamment de la résolution du spectromètre de masse, au moins un coefficient ionique doit également être mesuré pour éliminer la possibilité que des fragments de la même masse résultent de composés isobares de structure similaire. Les temps de rétention, ou mieux encore, des temps de rétention relatifs doivent également être déterminés pour éviter le risque de fausses identifications lors de l'utilisation des spectromètres de masse à haute résolution. En outre, il faut envisager de déterminer le ratio signal-bruit.

37. Du fait que l'utilisation des spectromètres de masse à haute résolution se répand et que les coûts de cette méthode diminuent, on suggère d'affecter des points d'identification d'après la précision de la mesure de la masse en se basant sur les erreurs de masse relatives plutôt qu'en réglant la puissance (tableau 3). Cette façon de faire présente l'avantage que le critère de la cote du PI soit compatible dans une vaste fourchette de masses ou indépendamment de la masse. Ainsi, pour les substances assorties de LMR, il faut surveiller au moins deux ions pour obtenir trois PI de manière à avoir la confirmation de l'identité du composé moyennant des erreurs de masse ≤ 5 ppm. À l'aide de fragmentation dans la source ou de dissociation induite par collision avec une énergie de fragmentation ou de collision faible et haute, un analyseur TOF et/ ou Orbitrap utilisé individuellement ou en tandem pourrait acquérir des spectres riches de fragments, si bien que d'autres PI pourraient être assignés pour la confirmation.

38. D'autres techniques, lorsqu'elles sont employées en combinaison, peuvent réaliser un degré de spécificité comparable en tant que techniques de confirmation (tableau 5). Par exemple, la spécificité peut être vérifiée en combinant des méthodes telles que :

- la chromatographie en couche mince;
- la chromatographie gaz- liquide spécifique de l'élément considéré avec les systèmes de détection qui l'accompagnent;
- la formation de dérivés caractéristiques suivie de chromatographie additionnelle; et
- la détermination de temps de rétention relatifs spécifiques des composés faisant appel à plusieurs systèmes chromatographiques de polarités différentes.

Ces procédures doivent être applicables à la LMR désignée de l'analyte.

39. Lorsqu'une méthode de confirmation telle que la spectrométrie de masse n'est pas disponible, les informations sur la sélectivité liée à l'analyse d'un résidu de médicament vétérinaire particulier dans un échantillon peuvent être développées à partir de diverses sources. [RÉFÉRENCE : Guidelines for the implementation of Decision 2002/657/EC, SANCO/2004/2726rev2, Annex 1: *SPECLOG – the specificity log*; http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/cons_2002-657ec_en.pdf] Cette information peut être récupérée dans un document journal structuré contenant toute l'information conduisant à la conclusion qu'une méthode a détecté un composé particulier dans un échantillon, au taux de concentration rapporté. Si aucune analyse séparée ne peut fournir la preuve irréfutable de l'identité du composé et/ou de la quantité présente souhaitée, les informations combinées qui ont été compilées prouvent que l'analyste s'est consciencieusement efforcé d'arriver à un résultat logique conforme aux données et autres informations disponibles.

Caractéristiques générales de performance des méthodes destinées à un programme de contrôle réglementaire

40. Il existe un certain nombre d'autres considérations pour la sélection de méthodes appropriées destinées aux programmes de contrôle réglementaires des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. Les méthodes doivent être suffisamment robustes, efficaces par rapport à leur coût, relativement peu complexes, portatives et susceptibles de traiter simultanément un ensemble de prélèvements dans un bref laps de temps, etc. La stabilité des analytes recherchés doit également être établie.

41. L'analyse de la *robustesse* doit être réalisée en utilisant une approche normale de plan factoriel afin de déterminer tout point de contrôle critique où des variations mineures dans la méthode d'analyse peuvent entraîner un résultat statistiquement différent [RÉFÉRENCE : Youden, W.J. & Steiner, E.H. 1975. *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. Gaithersburg, USA, AOAC International.]. Les facteurs typiques à inclure dans un plan englobent les variations des volumes ou concentrations de réactifs, du pH, de la durée et de la température d'incubation ou de réaction, de la qualité des réactifs et des différents lots ou sources d'un réactif ou d'équipement de chromatographie. L'analyse de la robustesse peut aussi être effectuée à l'aide d'autres méthodes, comme selon l'approche Plackett-Burman. L'analyse de la robustesse d'une méthode de confirmation peut être nécessaire si la méthode diffère fortement de la méthode quantitative validée auparavant (si la méthode utilise différentes procédures d'extraction ou de dérivatisation que celles qu'utilise la méthode quantitative).

42. Le *rapport coût-efficacité* est l'utilisation de réactifs et de fournitures qui sont facilement disponibles avec la pureté nécessaire auprès des fournisseurs locaux ainsi que de l'équipement dont les pièces et l'entretien sont également facilement disponibles. L'*efficacité de la méthode* est plus grande lorsque plusieurs échantillons peuvent être analysés en même temps. Cela réduit le temps nécessaire à l'analyse par échantillon et réduit en général le coût par échantillon, étant donné qu'il y a certains frais fixes associés à l'analyse d'échantillons, que ce soit séparément ou sous forme de lots plus grands. La capacité d'une méthode à prendre en charge plusieurs échantillons dans un lot est importante lorsqu'un grand nombre d'échantillons doivent être analysés dans un court laps de temps ou pour une date déterminée. La *portabilité* est la caractéristique des méthodes d'analyse qui leur permet d'être transférées d'un endroit à un autre sans perte les caractéristiques de performance d'analyse établies.

43. La *stabilité de la substance* à analyser pendant l'analyse doit être établie pour les étalons et la substance à analyser en présence de matériel étalon, pendant le traitement par l'analyse complète pour toutes les méthodes utilisées dans un programme de contrôle réglementaire et pour les conditions typiques de stockage pendant qu'un échantillon attend d'être analysé. La période choisie pour la stabilité pendant le stockage devrait couvrir la période pendant laquelle un échantillon peut être stocké pour toutes les analyses nécessaires, y compris l'utilisation de méthodes de dépistage, quantitatives et confirmatoires. Il est prudent de procéder à une étude de stockage pour une période supérieure à 90 jours au moins au-delà du temps nécessaire pour réaliser toutes les analyses de dépistage, quantitatives et de confirmation et pour obtenir les résultats, au cas où il y aurait un problème ou une demande de nouvelle analyse. Il est également prudent d'évaluer l'effet que le cycle de gel-dégel pourrait avoir sur la stabilité des analytes congelés. Cela permettra de prendre une décision quant à savoir si un échantillon, une fois décongelé pour l'analyse, peut être retourné ou non à l'entrepôt et analysé de nouveau à une date ultérieure, sans changement significatif par rapport au résultat d'analyse précédent. Le stockage inadéquat ou une mauvaise manipulation des échantillons peut conduire à des résultats erronés; lorsque les résultats d'analyse sont contestés, on peut se référer aux orientations fournies dans le CAC/GL 70-2009.

Autres considérations

44. Idéalement, une méthode d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires doit être élaborée et caractérisée pour l'analyse des quatre principaux tissus généralement classés comme « tissus comestibles », soit le gras, le foie, les reins et les muscles. En outre, le lait, les œufs et le miel sont commercialisés au niveau international, et des méthodes d'analyse peuvent également être nécessaires pour ces matrices. Les préférences alimentaires locales peuvent nécessiter le recours à des méthodes adaptées à d'autres tissus normalement consommés dans un pays ou une région. En outre, la réglementation peut prévoir la nécessité d'analyser l'urine ou d'autres liquides organiques pour dépister les résidus, en particulier si le programme de réglementation comprend l'expérimentation animale en direct. Du point de vue pratique, l'exigence minimale normale est le recours à une méthode d'analyse qui doit être mise au point pour ce qu'on appelle normalement le « tissu cible », soit le tissu d'un animal traité et dans lequel on peut s'attendre à observer les concentrations les plus élevées et les plus persistants du résidu de médicament. Il s'agira normalement du tissu prélevé lors d'un programme national de surveillance des résidus. En outre, il faut analyser le tissu « dans le commerce » lorsque les produits sont expédiés entre les pays. Le tissu est le plus souvent de type musculaire, mais il peut inclure d'autres tissus. Les Directives générales sur la sélection de tissus cibles appropriés et des tissus que l'on peut s'attendre à retrouver « dans le commerce » sont présentées dans le tableau 6 et dans les rapports du Comité mixte d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires. La connaissance du métabolisme et de la répartition/épuisement des résidus dans les tissus sera idéalement acquise pour chaque résidu de médicament avant la sélection finale des tissus à valider.

45. La concentration des analytes utilisés pour caractériser une méthode devrait être choisie de manière à couvrir les limites acceptées de tous les analytes devant être recherchés dans tous les produits.

46. Une fois que les paramètres résumés ci-après sont déterminés pour tous les analytes répertoriés dans le champ d'application d'une méthode multi-résidus, la méthode peut alors être considérée comme prête pour une évaluation plus poussée selon un processus de validation qui servira à établir si la méthode est appropriée (c'est-à-dire « apte à l'usage ») pour un programme de contrôle réglementaire des médicaments vétérinaires dans la production alimentaire animale.

47. Fajgelj et coll. [RÉFÉRENCE : A. Fajgelj and A. Ambrus Principles and Practices of Method Validation, Royal Society of Chemistry, 2000] fournit des indications supplémentaires sur la pertinence des paramètres ci-dessous et sur la manière de les évaluer.

(a) Sélectivité

- (i) Absence d'interférences - tous les analytes ciblés sont élucidés par la chromatographie
- (ii) Effets de la matrice – caractérisés et mesures correctives appliquées
- (iii) Paramètres de réponse du détecteur qualitatifs, quantitatifs et/ou confirmatoires déterminés

(b) Étalonnage

- (i) Sensibilité
- (ii) Fourchette d'étalonnage
- (iii) Fonction d'étalonnage
- (iv) Limite de détection et limite de quantification

(c) Fiabilité des résultats

- (i) Récupération
- (ii) Justesse (vérité, biais)
- (iii) Précision et incertitude des mesures

(d) Portabilité de la méthode

- (i) Identification des points de contrôle critiques
- (ii) Identification des points d'arrêt possible
- (iii) Analyse de la robustesse

(e) Études de stabilité

- (i) Stabilité de l'analyte dans les extraits d'échantillon et les solutions de référence; stabilité de l'analyte lors du traitement et de l'analyse de l'échantillon
- (ii) Stabilité de l'analyte durant la congélation et sous l'effet répété de gel-dégel.

(f) Études de résidus avérés (Si les matériaux appropriés sont disponibles)

- (i) Vérifier la performance des étapes comprises dans la méthode pour libérer des résidus liés
- (ii) Vérifier l'uniformité de la récupération et de la justesse
- (iii) Vérifier la stabilité de l'analyte durant la congélation et sous l'effet répété de gel-dégel.

Tableau 1 : Critères de performance qui devraient être respectés en utilisant les méthodes convenant à l'analyse quantitative à l'appui des LMR de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments

Concentration (µg/kg)	Coefficient de variabilité (CV)		Justesse
	Répétabilité (intra-laboratoire)	Reproductibilité (entre laboratoires)	Fourchette de récupération moyenne*
	(%)	(%)	(%)
≤ 1	36	54	50-120
1 à 10	32	46	60-120
10 à 100	22	34	70-120
100 à 1 000	18	25	70-110
≥ 1 000	14	19	70-110

* Si un laboratoire est tenu de présenter des résultats d'analyse corrigés en fonction de la récupération analytique, la précision de la récupération sera plus importante que la récupération absolue. Toutefois, si les résultats d'analyse sont présentés non corrigés en fonction de la récupération analytique, la récupération absolue sera essentielle.

Tableau 2 : Rapport entre un éventail de classes de fragment de masse et les points d'identification obtenus

Technique MS	Points d'identification gagnés par ion
Spectrométrie de masse à faible résolution	1,0
Ion précurseur LRMS _n	1,0
Ion de produit de transition LRMS _n	1,5
SGRH	2,0
Ion précurseur SGRH _n	2,0 ^{a, b}
Ion de produit de transition SGRH _n	2,5 ^{a, b}

Remarques :

- Chaque ion ne peut être compté qu'une seule fois
- La CG-SM obtenue par ionisation des électrons est considérée comme une technique différente de la CG-SM à ionisation chimique.
- Plusieurs analytes peuvent être utilisés pour augmenter le nombre de points d'identification, mais uniquement si les dérivés utilisent des réactions chimiques différentes.
- Les produits de transition comprennent à la fois des ions de produit et de ions de produit de première génération.
- ^a Basé sur une résolution MS ≥ 10,000 (creux de 10 pour cent par rapport à la fourchette complète de masse) ou ≥ 20 000 FWHM à la plage de masse recherchée.
- ^b Basé sur une précision de la masse < 5ppm.

Tableau 3 : Exemples du nombre de points d'identification obtenus pour un ensemble de techniques et combinaisons correspondantes (n = nombre entier)

Technique	Source de l'identification	Nombre de points d'identification
CG-SM (EI ou CI)	N	N
CG-SM (EI + CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
CG-SMEI ou CG-SMCI (2 dérivés)	2 (dérivés A) + 2 (dérivés B)	4
CL-SM	N	N
CG-SM/SM	1 ion précurseur + 2 ions produits	4
CL-SM/SM	1 ion précurseur + 2 ions produits	4
CG-SM/SM	2 ions précurseurs, chacun avec 1 ion produit	5
CL-SM/SM	2 ions précurseurs, chacun avec 1 ion produit	5
CL-SM/SM/SM	1 précurseur, 1 ion produit et 2 ions produits de 2 ^{ème} génération	5,5
SGRH	N	2n
CG-SM et CL-SM	2 + 2	4
CG-SM et SGRH	2 + 1	4
CL-SGRH/SM et CG-SGRH/SM	1 ion précurseur + 2 ions produits	6

Tableau 4 Exigences de performance pour les intensités ioniques relatives (par rapport à l'échantillon de référence) à l'aide de diverses techniques de spectrométrie analytique de masse

Intensité relative des ions (% du pic de référence)	CG-SM (EI) (relative)	CG-SM (CI), CG-SM/SM, CLC-SM, CL-SM/SM (relative)
(%)	(%)	(%)
> 50	≤ 10	≤ 20
20-50	≤ 15	≤ 25
> 10– < 20	≤ 20	≤ 30
≤ 10	≤ 50	≤ 50

Tableau 5 : Exemples de méthodes de dépistage adaptées à l'analyse confirmatoire des substances, tel que recommandé par la Consultation Miskolc

Méthode de détection	Critère
CL ou CG et spectrométrie de masse	Si un nombre suffisant de fragments ioniques sont surveillés
CL / DAD	Si le spectre UV est caractéristique
CL/fluorescence	En combinaison avec d'autres techniques
2-D TLC / (spectrophotométrie)	En combinaison avec d'autres techniques
CG/ECD, NPD, FPD	Uniquement en combinaison avec un minimum de deux techniques de séparation ^a
Dérivatisation	Si ce n'était pas la méthode préférée
CL/immunogramme	En combinaison avec d'autres techniques
CL / UV / VIS (longueur d'onde unique)	En combinaison avec d'autres techniques

^a Autres systèmes de chromatographie (application des phases stationnaires et/ou des phases mobiles de sélectivité différente) ou autres techniques.

Tableau 6: Conseils pratiques sur le choix des tests de matrice appropriés pour l'examen des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments

Espèce/produits	Tissu cible ou matrice habituellement utilisés pour mettre au point les méthodes	
	Soluble dans l'eau	Liposoluble
Non ruminant (p. ex. porc)*	Foie ou reins, muscles **	Gras, muscle
Volaille (poulet, dinde, etc.)*	Foie, muscle	Gras ou muscle avec adhésion de la peau dans des proportions normales **
Mollusques/crustacés (crevettes, etc.)	Muscle	Muscle
Lait (généralement du lait de vache)	Lait entier	Lait entier
Miel	Miel	Miel
Œuf	Entier – sans coquille	Entier - sans coquille

* La mise au point de la méthode et la caractérisation des paramètres d'analyse doivent être effectuées pour toutes les principales espèces dont proviennent les échantillons destinés aux tests de routine. Pour les applications à usage limité, il peut être acceptable de démontrer l'applicabilité de la méthode aux nouvelles espèces, si la méthode s'est déjà avérée être applicable à une autre espèce du groupe (par exemple, les ruminants) et qu'elle respecte les normes de performance vérifiées auparavant pour les principales espèces « équivalentes ».

** Les résidus de composés solubles dans l'eau sont généralement présents en plus fortes concentrations dans le foie et les reins, le choix des tissus reposant sur les études de répartition fournies par le promoteur du médicament lors de son homologation par une autorité nationale ou régionale. Les composés liposolubles sont généralement présents sous forme de résidus à des concentrations plus élevées en matières grasses, de sorte que dans ce cas les matrices choisies pour les tests sont généralement le gras et les muscles. Toutefois, dans le cas de la volaille et des poissons à nageoires, où les aliments préparés et consommés comprennent souvent à la fois des muscles et de la peau avec des adhésions de gras, la directive pourrait se lire « muscle avec adhésion de peau dans des proportions normales », ce qui correspond aux tissus de muscles, de gras et de peau combinés pouvant être consommés. Ces exigences devraient être clairement établies avec le client (l'acheteur ou l'utilisateur des résultats) avant d'entreprendre la mise au point des méthodes. Les autorités nationales ou régionales peuvent exiger que la méthode s'applique à d'autres matrices.

*** Les poissons à nageoires peuvent présenter de hautes concentrations en lipides (par exemple les salmonidés) ou de faibles concentrations en lipides (par exemple tilapia, perche), et cette caractéristique peut influencer le choix de la méthode d'analyse.

GLOSSAIRE*

Ce glossaire comprend uniquement les termes non définis dans les « Directives sur la terminologie analytique », CAC/GL 72-2009.

Limite acceptée (LA)	Valeur de concentration pour un analyte correspondant à une limite réglementaire ou à une valeur de référence qui constitue l'objet de l'analyse, par exemple LMR, LMP; norme commerciale, limite de concentration visée (évaluation de l'exposition d'origine alimentaire), niveau d'acceptation (environnement), etc. Pour une substance sans LMR ou pour une substance interdite, il peut ne pas y avoir de LA (en réalité, elle peut être de zéro ou elle peut faire défaut) ou il peut s'agir de la concentration visée au-dessus de laquelle les résidus détectés devraient être confirmés (limite d'action ou limite administrative).
Erreur alpha (α)	Probabilité que la concentration de l'analyte dans l'échantillon de laboratoire est inférieure à une valeur particulière (par exemple la LA) lorsque les mesures effectuées sur une ou plusieurs portions à analyser/d'essai indiquent que la concentration dépasse cette valeur (faux positif). Les valeurs acceptées pour cette probabilité sont généralement de l'ordre de 1 à 5 %.
Erreur beta (β)	Probabilité que la concentration effective de l'analyte dans l'échantillon de laboratoire est supérieure à une valeur particulière (par exemple la LA) lorsque des mesures prises sur une ou plusieurs portions à analyser indiquent que la concentration ne dépasse pas cette valeur (faux négatif). Les valeurs acceptées pour cette probabilité sont généralement de l'ordre de 1 à 5%.
Méthode de confirmation	Méthode qui fournit des informations complètes ou complémentaires permettant d'identifier l'analyte avec un degré acceptable de certitude [à la limite acceptée ou niveau qui intéresse l'analyste]. Autant que possible, les méthodes de confirmation fournissent des informations sur les propriétés chimiques de l'analyte, de préférence à l'aide de techniques de spectrométrie. Si une technique particulière ne présente pas une spécificité suffisante, on peut recourir à des procédés supplémentaires, par exemple en combinant de manière appropriée purification, séparation chromatographique et détection sélective. Les titrages biologiques peuvent aussi fournir quelques données de confirmation. Outre l'identité de l'analyte, il faudra aussi confirmer sa concentration, par exemple par l'analyse d'une deuxième prise d'essai et/ou d'une nouvelle analyse de la prise d'essai initiale à l'aide d'une autre méthode appropriée (par exemple colonne ou détecteur différents). La confirmation qualitative et quantitative peut aussi être effectuée à l'aide de la même méthode, le cas échéant.
Limite de décision (CCα)	Limite à laquelle on peut décider que la concentration de l'analyte présent dans un échantillon dépasse effectivement cette limite, avec une probabilité d'erreur de α (faux positif). Dans le cas d'une substance pour laquelle la limite acceptée est zéro, la CC α est la concentration la plus basse, à laquelle une méthode peut faire la différence avec une probabilité statistique de $1 - \alpha$ si l'analyte identifié est présent. La CC α équivaut à la limite de détection (LD) selon certaines définitions (en général pour $\alpha = 1\%$). Dans le cas de substance ayant une LA établie, la CC α est la concentration mesurée, au-dessus de laquelle on peut décider avec une probabilité statistique de $1 - \alpha$ que la concentration de la substance à doser est effectivement supérieure à la LA.
Capacité de détection (CCβ)	C'est la concentration effective la plus faible de l'analyte pouvant être détectée, identifiée et quantifiée dans un échantillon avec une erreur beta (faux négatif). Dans le cas de substances interdites, la CC β est la concentration la plus faible à laquelle une méthode est capable de déterminer l'analyte dans des échantillons contaminés avec une probabilité statistique de $1 - \beta$. Dans le cas de substances pour lesquelles une LMR a été fixée, CC β est la concentration à laquelle la méthode est capable de détecter des échantillons qui dépassent cette LMR avec une probabilité statistique de $1 - \beta$. Quand il est appliqué à la concentration détectable la plus faible, ce paramètre vise à fournir une information équivalente à la limite de quantification (LQ), mais CC β est toujours associée à une probabilité statistique spécifiée de détection, ce qui explique qu'on la préfère à la LQ.
Faux résultat négatif	Voir erreur beta
Faux résultat positif	Voir erreur alpha
Résidus d'origine	Résidus d'un analyte dans une matrice provenant de la voie par laquelle les résidus à l'état de traces devraient normalement parvenir, par opposition aux résidus provenant de l'enrichissement d'échantillons en laboratoire. Appelés aussi résidus météorisés.

Méthode individuelle	Méthode apte à déterminer la présence d'un ou de plusieurs composés spécifiés. Une méthode individuelle distincte peut être nécessaire, par exemple pour déterminer certains métabolites inclus dans la définition des résidus d'un pesticide ou d'un médicament vétérinaire particulier.
Concentration étalonnée la plus faible (CEPF)	Concentration la plus faible de l'analyte détectée et mesurée dans l'étalonnage du système de détection. Elle peut être exprimée comme une concentration de la solution dans la prise d'essai ou en tant que masse et ne doit pas comprendre la contribution du témoin.
Matrice	Matériau ou composant échantillonné à des fins d'analyse, à l'exclusion de l'analyte.
Matrice témoin	Échantillon dans lequel les analytes recherchés ne sont pas détectables.
Courbe d'étalonnage ajustée à la matrice	Courbe d'étalonnage ajustée à la matrice – Courbe d'étalonnage préparée par addition de normes aux extraits d'échantillons obtenus à partir d'une matrice témoin après extraction.
Méthode de la courbe d'étalonnage ajustée à la matrice	Méthode de la courbe d'étalonnage ajustée à la matrice, également connue sous le nom de courbe d'étalonnage standard enrichie par la matrice, soit une courbe d'étalonnage préparée par addition de normes à la matrice témoin avant extraction.
Méthode	Série d'opérations depuis la réception d'un échantillon à analyser jusqu'à la production du résultat final.
Validation de la méthode	Procédé visant à vérifier qu'une méthode est adaptée à l'objectif.
Méthode multi-résidus, MMR	Méthode convenant pour l'identification et la quantification d'une gamme d'analytes, habituellement dans un certain nombre de matrices différentes.
Résultat négatif	Résultat indiquant que l'analyte n'est pas présent à ou au-dessus de la concentration étalonnée la plus basse (voir aussi limite de détection). (voir aussi limite de détection)
Vérification des performances	Séries de données sur le contrôle de la qualité produites durant l'analyse des lots d'échantillons pour valider les analyses en cours. Les données peuvent être utilisées pour affiner les paramètres de performance de la méthode.
Résultat positif	Résultat indiquant que l'analyte est présent à une concentration à ou au-dessus de la concentration étalonnée la plus basse.
Méthode quantitative	Méthode pouvant donner des résultats, exprimés en valeurs numériques dans des unités appropriées, avec une exactitude et une précision appropriées à l'objectif. Le degré d'exactitude et de précision doit être conforme aux critères spécifiés au tableau 1.
Blanc de réactifs	Un échantillon composé de tous les réactifs qui ont été exécutés par le biais de la méthode, à l'exclusion de la matrice de l'échantillon.
Méthode de référence	Méthode d'analyse quantitative dont la fiabilité a été démontrée par une exactitude, une spécificité, une précision et une capacité de détection bien établies. Ces méthodes ont généralement fait l'objet d'études inter-laboratoires et s'appuient le plus souvent sur la spectrométrie moléculaire. Le statut des méthodes de référence est valide uniquement si la méthode est appliquée dans un régime approprié d'assurance de qualité.
Procédure de référence	Procédure dont l'efficacité a été démontrée. Lorsque cela n'est pas possible, une procédure de référence pourrait être une procédure en théorie très efficace et fondamentalement différente de celle à l'essai.
Analyte représentatif	Analyte choisi pour représenter un groupe d'analytes qui ont des chances d'avoir le même comportement durant l'application d'une méthode d'analyse multi-résidus, si l'on en juge par leurs propriétés physico-chimiques, par exemple structure, solubilité dans l'eau, K_{ow} , polarité, volatilité, stabilité hydrolytique, pKa, etc.
Analyte représenté	Analyte dont les propriétés physico-chimiques sont comprises dans la gamme des propriétés des analytes représentatifs.
Produit représentatif	Aliment destiné à la consommation humaine ou animale utilisé pour représenter un groupe de produits à des fins de validation d'une méthode. Un produit sera considéré comme représentatif d'après la composition immédiate de l'échantillon, par exemple teneur en eau, graisse/huile, acide, sucre et chlorophylle, ou de similitudes biologiques des tissus, etc.
Préparation de l'échantillon	Procédé utilisé, si nécessaire, pour convertir l'échantillon de laboratoire en une prise d'essai, en enlevant les parties (terre, cailloux, os, etc.) ne servant pas pour l'analyse.

Transformation de l'échantillon	Le (ou les) procédé(s) (par exemple découpage, broyage, mélange) utilisés pour rendre la portion d'essai suffisamment homogène pour ce qui concerne la distribution de l'analyte, avant le retrait de la partie à analyser. L'élément transformateur de la préparation doit être conçu de manière à éviter des changements induits dans la concentration de l'analyte.
Méthode de dépistage	Méthode utilisée pour détecter la présence d'un analyte ou d'une classe d'analytes à ou au-dessus de la concentration la plus faible recherchée. Elle devrait être conçue de manière à éviter les faux résultats négatifs à un degré de probabilité spécifié (généralement $\beta = 5\%$). Il est parfois nécessaire de confirmer les résultats qualitatifs positifs à l'aide d'épreuves de confirmation ou de référence. Voir Limite de décision et capacité de détection.
Addition de solutions étalons	Procédé par lequel des quantités connues de l'analyte sont ajoutées à des parties d'un extrait d'échantillon contenant l'analyte (sa concentration mesurée au départ étant X), afin de produire de nouvelles concentrations nominales (par exemple, 1,5X et 2X). On mesure les réponses de l'analyte produites par les parties enrichies et l'extrait original, et on détermine la concentration de l'analyte dans l'extrait original (sans ajouter d'analyte) à partir de la pente et de l'intersection de la courbe de réponse. Si la courbe de réponse obtenue n'est pas linéaire, il faut faire preuve de prudence pour interpréter la valeur de X.
Courbe d'étalonnage standard (SCC)	Courbe d'étalonnage préparée selon des normes en l'absence de matrice, habituellement appelée courbe d'« étalonnage externe ».

ABRÉVIATIONS

CCRVDVDF	Comité du Codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments	CL-SM/SM	Spectrométrie de masse en tandem par chromatographie liquide
CI	Ionisation chimique	LRMS	Spectrométrie de masse à faible résolution
CIMS	Spectrométrie de masse à ionisation chimique	MMSCC	Méthode de la courbe d'étalonnage ajustée à la matrice
DAD	Détection de tableau de diode	LMR	Limite maximale de résidus
ECD	Détecteur de capture des électrons	MMR	Méthode multi-résidus
EI	Ionisation de l'électron	MS	Spectrométrie de masse
EIMS	Spectrométrie de masse à ionisation électronique	MSCC	Courbe d'étalonnage ajustée à la matrice
FAO	Organisation pour l'agriculture et l'alimentation	NPD	Détecteur de phosphore d'azote
FPD	Détecteur photométrique à flamme	$S_{y/x}$	Écart-type des résidus calculés à partir de la fonction d'étalonnage linéaire
GC	Chromatographie en phase gazeuse	SCC	Courbe d'étalonnage standard
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse	TLC	Chromatographie en couche mince
CG-SM/SM	Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse en tandem	UV	Détection de la lumière ultraviolette
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution	OMS	Organisation mondiale de la santé
IP	Point d'identification	VIS	Détection de la lumière visible
JECFA	Comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires		
CL-SM	Chromatographie liquide - spectrométrie de masse		

Annexe 2**CONSEILS GÉNÉRAUX SUR LA PRÉSENTATION DES OBSERVATIONS**

Afin de faciliter la compilation des observations et la préparation des documents d'observations, les membres et les observateurs qui ne le font pas encore sont priés de soumettre leurs observations sous les intitulés suivants :

- (i) Observations générales
- (ii) Observations particulières

Les observations particulières devraient comprendre une référence à la section pertinente et/ou au paragraphe du document auquel les observations renvoient.

Lorsqu'il est proposé de modifier un paragraphe particulier, les membres et les observateurs sont priés de fournir leur proposition d'amendement avec une justification correspondante. Les nouveaux libellés devraient être présentés en **caractères gras/soulignés** et les passages supprimés devraient être présentés en ~~caractères barrés~~.

Pour faciliter le travail des secrétariats qui compilent les observations, les membres et observateurs sont priés de s'abstenir d'utiliser des caractères ou un surlignage en couleur car les documents sont imprimés en noir et blanc, et de ne pas utiliser la fonction de suivi des modifications, car celles-ci peuvent être perdues quand des observations sont copiées et collées dans un document consolidé.

Afin de diminuer le volume de travail de traduction et d'économiser du papier, les membres et observateurs sont priés de ne pas reproduire le document en entier, mais seulement les parties du texte pour lesquelles le changement et/ou l'amendement est proposé.