

Guide

sur la production
de matériaux de contrôle qualité
à partir d'échantillons produits lors
d'un Essai InterLaboratoires
d'Aptitude (EILA)



Ce guide est destiné aux laboratoires nationaux de référence (LNR). Il propose des lignes directrices générales sur le processus de production de matériaux de contrôle qualité à partir d'échantillons produits lors d'un essai interlaboratoires d'aptitude. Ces matériaux de contrôle qualité sont destinés aux laboratoires officiels.

Ce guide a été préparé par le GT « Matériaux de Référence » (MR) animé par Christophe GÉNOUEL (SCL - Laboratoire de Rennes) et comprenant les membres suivants :

Les membres experts :

Stéphanie PRÉVOST (LABERCA), Jean Marc LAMBERT (AECLDPA), Michel LAURENTIE (Anses - Laboratoire de Fougères), Dominique HURTAUD-PESSEL (Anses - Laboratoire de Fougères ; de 2015 à 2020), Marie Pierre CHOTARD-SOUTIF (Anses - Laboratoire de Fougères ; à partir de 2017), Vincent HORT (Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments), deux représentants de l'ADILVA (en 2015 et en 2018).

Les laboratoires officiels (LO) listés en annexe 1 de ce guide, ayant participé aux études pilotes et contribué aux échanges fructueux entre LNR et LO.

Les représentantes de la direction du SCL : Hélène GAYON (de 2015 à 2019) et Julie SISOURAT-CABILLIC (de 2019 à 2021).

Les représentants Anses de la direction de la stratégie et des programmes : Barbara GOUGET (de 2015 à 2019), Thierry GUÉRIN (à partir de mars 2022), Véronique DA-RIZ et Bertrand LOMBARD (relecteurs de la version finale).

Sommaire

AVANT-PROPOS	4
1. GÉNÉRALITÉS	5
1.1 Matériaux de référence / matériaux de contrôle qualité	5
1.2 Contexte réglementaire.....	5
2. DOMAINE D'APPLICATION	5
3. TERMES, DÉFINITIONS, ACRONYMES et SYMBOLES	6
3.1 Termes et définitions	6
3.2 Acronymes.....	8
3.3 Symboles.....	9
4. RECOMMANDATIONS POUR LA PRÉPARATION ET LA CONSERVATION D'UN MCQ	9
4.1 Choix du ou des couple(s) analyte(s)/matrice(s)	10
4.2 Choix des niveaux de concentrations ciblés.....	11
4.3 Préparation des ESEA	11
4.4 Stockage des ESEA	11
5. APPROCHE POUR L'OBTENTION D'UN MCQ AVEC UNE DURÉE DE CONSERVATION	11
6. ÉVALUATION DE L'HOMOGÉNÉITÉ ET DE LA STABILITÉ DE L'ESEA DANS LE CADRE DE L'ORGANISATION D'UN EILA ET PRÉDICTION D'UNE DURÉE DE CONSERVATION	13
6.1 Variable qualitative	13
6.2 Variable quantitative	14
6.2.1 Vérification de l'homogénéité.....	14
6.2.2 Évaluation de la stabilité afin d'estimer la durée de conservation	14
7. MISE À DISPOSITION DES MCQ	20
Annexe 1 - Membres du GT MR et autres contributeurs	21
Annexe 2 – Modèle d'inventaire type de Matériaux de Référence établi pour chaque réseau LNR et LO	23
Annexe 3 – Présentation des études pilotes (2016 - 2018)	24
Annexe 4 - Exemples d'EILA avec calculs et interprétation appropriés sur l'homogénéité et la stabilité	26
Annexe 5 - Approches statistiques pour Régression Linéaire, Intervalle de Confiance, Prédiction de la durée de conservation	29
Annexe 6 - Exemple d'estimation d'une durée de conservation du MCQ en fonction des IMA choisis pour 3 études pilotes	31
Annexe 7 - Proposition de fiche descriptive d'un MCQ assorti d'une durée de conservation	37
Bibliographie	38

En 2012, les laboratoires officiels (LO) ont exprimé le besoin d'avoir à leur disposition une liste de matériaux de référence commercialisés par les différents fournisseurs et/ou fabricants. Cette demande a été relevée suite à l'enquête de satisfaction globale réalisée conjointement par l'Anses et le SCL et déployée auprès de l'ensemble des laboratoires officiels. Ce besoin a été confirmé lors des réunions du « Collège de la Référence » organisées par l'Anses et le SCL, en 2014-2015.

Pour répondre à cette demande, un groupe de travail (GT) inter-instituts a été constitué (participants listés dans l'**annexe 1**), et son mandat a été validé lors du Collège de la Référence de novembre 2014. Ce GT réunit des membres des Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) de l'Anses, du SCL et du LABERCA [1], et un membre de l'association des experts chimistes des laboratoires départementaux et publics d'analyses (AECLDPA), représentant les LO.

Dans un premier temps, le GT a réfléchi à la mise à disposition d'un inventaire des matériaux de référence (MR) commercialement disponibles. Cette réflexion a permis de proposer un modèle d'inventaire présenté en **annexe 2** de ce guide. Le GT recommande à chaque LNR, assisté par son réseau de LO, une mise à jour annuelle de cet inventaire et sa diffusion par les canaux de communication que le LNR jugera pertinent. Les inventaires des matériaux de référence réalisés par le LNR montrent parfois le manque de disponibilité de certains couples analyte/matrice. Le coût peut également s'avérer prohibitif.

C'est pourquoi le GT a réfléchi à la faisabilité de produire, caractériser et qualifier des MR par les LNR. Les échantillons générés dans le cadre des essais interlaboratoires d'aptitude (EILA), organisés par les LNR, paraissent adaptés et compatibles avec cet objectif.

L'étude pilote réalisée entre 2016 et 2018 (voir **annexe 3**) a impliqué les LO volontaires du domaine des contaminants chimiques (les biotoxines marines, les mycotoxines, les médicaments vétérinaires et les promoteurs de croissance). L'exploitation des résultats de cette étude pilote a permis de démontrer la faisabilité de qualifier des échantillons produits lors d'un EILA en MR. Le terme « matériau de contrôle qualité » (MCQ) avec durée de conservation (Dc) a été retenu par le GT et sera employé dans la suite de ce document.

Ce guide propose donc une méthodologie pour produire des MCQ avec durée de conservation, à partir d'échantillons produits d'EILA.

Il convient à chaque LNR d'apprécier la pertinence et la faisabilité de fournir des MCQ aux LO en suivant les lignes directrices de ce guide. Les spécificités propres à chacun des domaines couverts par les LNR sont à prendre en compte, notamment la disponibilité d'échantillons naturellement contaminés, l'offre commerciale en MR, le programme de travail du LNR, etc.

À noter que le périmètre de ce travail s'est limité aux problématiques des MR utilisés dans le domaine des contaminants chimiques des aliments et que l'applicabilité de cette méthodologie reste à évaluer dans d'autres domaines par les LNR intéressés par cette démarche.

1. GÉNÉRALITÉS

1.1 Matériaux de référence / matériaux de contrôle qualité

Le terme « matériau de référence » (MR) désigne, selon la norme ISO Guide 30 [2], un matériau suffisamment homogène et stable quant à une ou plusieurs propriétés spécifiées, qui a été préparé pour être adapté à son utilisation prévue dans un processus de mesurage : étalonnage d'un système de mesure, évaluation d'une méthode de mesure, assignation de valeurs à d'autres matériaux, et le contrôle de la qualité.

Ces matériaux de référence peuvent être utilisés par les LO et les LNR dans le cadre de l'accréditation NF EN ISO/IEC 17025 [3]). Leur usage devient impératif en l'absence d'essai interlaboratoires (détermination du biais, LAB REF 02 [4]).

Il existe une grande diversité de matériau de référence, qui diffèrent par leurs propriétés quantitatives ou qualitatives (nature des matériaux ou espèces). Selon l'objectif à atteindre, le matériau de référence doit donc être sélectionné selon la matrice, l'analyte, le niveau de concentration, afin d'être le plus représentatif possible des échantillons à analyser. Plusieurs types de matériaux de référence sont à considérer : matériau de référence certifié (MRC), matériau de référence externe (MRE) et matériau de référence interne (MRI). Le terme « matériau de contrôle qualité » (MCQ), également défini dans la norme ISO Guide 30 [2], est employé notamment lorsqu'un MR est utilisé pour le contrôle de la qualité d'un mesurage.

1.2 Contexte réglementaire

Le précédent règlement sur les contrôles officiels (règlement CE n° 882/2004 [5]) ne précisait aucune obligation pour les LNR de caractériser et de fournir des matériaux de référence. Le code rural et de la pêche maritime [6] n'explique pas non plus le rôle du LNR en matière de distribution, production et qualification/certification des matériaux de référence.

Lors de la révision du règlement CE n° 882/2004 [5], les discussions de 2012-2016 s'orientaient vers une obligation des LRUE de fournir des matériaux de référence aux LNR « lorsque nécessaire ».

Le règlement actuel sur les contrôles officiels (règlement (UE) 2017/625 [7]) a finalement précisé dans son article 94 point 2 b) l'obligation pour les LRUE de *"fournir aux laboratoires nationaux de référence des matériaux de référence"*.

Pour les LNR, l'article 101 point 1 f) du règlement (UE) 2017/625 [7] stipule : *"s'il y a lieu, [les LNR] valident des réactifs et des lots de réactifs, dressent et tiennent à jour des listes des matériaux et réactifs de référence disponibles et des fabricants et fournisseurs de ces matériaux et réactifs"*.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Le présent guide a pour objectif de proposer une démarche pour produire des matériaux de contrôle qualité (MCQ) assortis d'une durée de conservation à partir d'entités soumises à essai d'aptitude (ESEA) issus des essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) organisés par les LNR pour les LO.

Ce guide est destiné à être mis en œuvre essentiellement par les LNR, dans le cadre de leur mandat de référence. Il peut également être mis en œuvre par les LRUE pour produire des MCQ à destination de leur réseau de LNR.

Les recommandations présentées dans ce document s'appliquent aux analyses physico-chimiques quantitatives. Sous réserve d'ajustements, ce guide peut aussi s'appliquer à des analyses quantitatives dans le domaine des analyses microbiologiques. Ce guide peut également être utilisé pour les analyses qualitatives. Cependant, dans le cas d'analyses purement qualitatives, il n'est pas possible de prévoir une durée de conservation en appliquant le modèle statistique décrit dans ce guide.

3. TERMES, DÉFINITIONS, ACRONYMES & SYMBOLES

3.1 Termes et définitions

Matériau de référence (MR)

Matériau suffisamment homogène et stable quant à une ou plusieurs propriétés spécifiées, qui a été préparé pour être adapté à son utilisation prévue.

Note 1 : Par matériau, on entend le(s) analyte(s) et la matrice le(s) contenant ou non.

Note 2 : Matériau de référence est un terme générique.

Note 3 : Les propriétés peuvent être quantitatives ou qualitatives, par exemple l'identité de substances ou d'espèces.

Note 4 : Les utilisations prévues peuvent être l'étalonnage d'un système de mesure, l'évaluation d'une méthode, l'assignation de valeurs à d'autres matériaux et le contrôle de la qualité.

[SOURCE : Guide ISO 30 :2015, 2.1.1]

Matériau de référence certifié (MRC)

MR caractérisé par une procédure métrologiquement valide applicable à une ou plusieurs propriétés spécifiées et accompagné d'un certificat de MR qui indique la valeur de la propriété spécifiée, son incertitude associée, et une expression de la traçabilité métrologique.

Note 1 : Le concept de valeur inclut une propriété nominale ou un attribut qualitatif tels que l'identité ou la séquence. Les incertitudes concernant ces propriétés peuvent être exprimées par des probabilités ou des niveaux de confiance.

Note 2 : Des procédures métrologiquement valides applicables à la production et à la certification de MR sont données, entre autres, dans le Guide ISO 35.

Note 3 : Le Guide ISO 31 donne des indications sur le contenu des certificats de MR.

[SOURCE : Guide ISO 30 :2015, 2.1.2, sans reprise de la note 4]

Matériau de référence externe (MRE)

Matériau de référence dont la valeur de consensus a été déterminée à la suite d'études interlaboratoires, comme les essais d'intercomparaisons organisés pour évaluer les performances des laboratoires

[SOURCE : LAB GTA 05, révision 3]

Matériau de référence interne (MRI)

MR dont une ou plusieurs propriétés spécifiées a(ont) été déterminée(s) par l'utilisateur.

Note 1 : un MRI peut être conçu à partir d'un MRC ou d'un MRE.

Note 2 : un MRI peut être conçu par ajout d'une quantité connue de l'analyte à la matrice exempte de cet analyte. Ce MRI doit être suffisamment homogène et stable quant aux propriétés spécifiées.

Note 3 : À cause de leur manque de stabilité, les échantillons supplémentés à utiliser extemporanément ne sont pas considérés comme des MRI.

[SOURCE : FD V01-000 :2023, 7.4]

Matériau de contrôle qualité (MCQ)

Matériau aux caractéristiques qualitatives ou quantitatives connues.

Note 1 : par matériau, on entend le(s) analyte(s) et la matrice le(s) contenant ou non.

Note 2 : le terme témoin est synonyme du terme contrôle qualité.

Note 3 : un témoin positif ou négatif est un contrôle qualité. Il s'agit d'un témoin, qui, soumis à essai conformément à une méthode, démontre l'aptitude de celle-ci à conduire à une réponse fidèle binaire positive ou négative.

Note 4 : un matériau de contrôle qualité peut être soit un matériau supplémenté à utiliser extemporanément, soit un matériau de référence.

[SOURCE : FD V01-000 : 2023, 8.10]

Entité soumise à l'essai d'aptitude (ESEA)

Échantillon, produit, artefact, matériau de référence, élément d'un matériel, étalon, ensemble de données ou autres informations utilisées pour un essai d'aptitude.

[SOURCE : NF EN ISO 17043 :2023, 3.8]

Essai d'Aptitude (EA)

Évaluation de la performance d'un participant par rapport à des critères préétablis au moyen de comparaisons interlaboratoires.

Note 1 : Pour les besoins de la norme NF EN ISO/CEI 17043 le terme « essai d'aptitude » est considéré dans son sens le plus large et il inclut sans s'y limiter :

- a) Les programmes quantitatifs dans lesquels l'objectif est de quantifier un ou plusieurs mesurandes de l'ESEA
- b) Les programmes qualitatifs dans lesquels l'objectif est d'identifier ou de décrire une ou plusieurs caractéristiques de l'ESEA
- c) Les programmes séquentiels dans lesquels une ou plusieurs ESEA sont distribuées séquentiellement pour procéder à l'essai ou au mesurage, et reviennent par intervalles à l'organisateur d'essais d'aptitude
- d) Les programmes simultanés, dans lesquels les ESEA sont réparties en vue d'essai ou de mesurages concurrents dans une période de temps définie
- e) Les exercices de situation unique, dans lesquels les ESEA sont fournies à une seule occasion
- f) Les programmes continus, dans lesquels les ESEA sont fournies à intervalles réguliers
- g) Les échantillonnages, dans lesquels des échantillons sont prélevés en vue d'une analyse ultérieure
- h) Les transformations et interprétations de données, dans lesquelles des ensembles de données ou d'autres informations sont fournis et les informations sont traitées pour en effectuer une interprétation (ou un autre résultat).

Note 2 : Certains organisateurs d'essai d'aptitude dans le domaine médical utilisent le terme « évaluation externe de la qualité » (EEQ) pour leur programme d'essai d'aptitude ou pour leurs programmes plus larges ou les deux (voir Annexe A NF EN ISO/CEI 17043. Les exigences de la NF EN ISO/CEI 17043 recouvrent uniquement les activités EEQ satisfaisant à la définition de l'essai d'aptitude.

Note 3 ajouté : EILA est équivalent à EA dans ce texte.

[SOURCE : NF EN ISO 17043 :2023, 3.7 modifié par le GT]

Comparaison interlaboratoires (CIL)

Organisation, exécution et évaluation de mesures ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées.

[SOURCE : NF EN ISO 13528 :2022, 3.1]

Niveau Exigible de Détection (NED)

Niveau spécifié de dilution d'un matériau de référence contenant l'analyte, qui doit entraîner, pour un réactif donné, une réponse positive avec un protocole technique spécifié et qui est défini par voie réglementaire, normative ou, à défaut par l'organisme de contrôle.

Note 1 : L'organisme de contrôle peut être l'organisateur.

[SOURCE : XP U 47-310 :2013]

Laboratoire Officiel (LO)

Laboratoire pratiquant des analyses dans le cadre des contrôles officiels ou pour d'autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation, équivalent à un laboratoire officiel de contrôle agréé par la DGAI et/ou DGCCRF et/ou tout autre autorité compétente.

Étude de stabilité isochrone

Étude expérimentale de stabilité d'un matériau de référence, au cours de laquelle plusieurs unités exposées à des conditions et des durées de stockage différentes sont analysées sur un court intervalle de temps.

[SOURCE : FD ISO GUIDE 35 :2018, 3.9]

Étude de stabilité chronologique

Étude de stabilité dont les résultats de mesure sont acquis dans des conditions de fidélité intermédiaire.

[SOURCE : Lignes Directrices Aquaref :2017]

3.2 Acronymes

AECLDPA	Association des Experts Chimistes des Laboratoires Départementaux et Publics d'Analyses
ADILVA	Association française des Directeurs et cadres de Laboratoires Vétérinaires publics d'Analyses
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Dc	Durée de conservation
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
DGCCRF	Direction Générale de Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DGDDI	Direction Générale de la Douane et des Droits Indirects
DAOA	Denrée Alimentaire d'Origine Animale
ESEA	Entité Soumise à Essai Aptitude
EILA	Essai InterLaboratoires d'Aptitude
ETM	Éléments Traces Métalliques
GT	Groupe de Travail
IMA	Instabilité Maximale Admissible
LABERCA	Laboratoire d'Études des Résidus et des Contaminants dans les Aliments
LD	Limite de Détection
LDA	Laboratoire Départemental d'Analyse
LNR	Laboratoire National de Référence
LO	Laboratoire Officiel
LRUE	Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
MCQ	Matériau de Contrôle Qualité
MR	Matériau de Référence
MRC	Matériau de Référence Certifié
MRE	Matériau de Référence Externe
MRI	Matériau de Référence Interne
NED	Niveau Exigible de Détection
SCL	Service Commun des Laboratoires de la DGCCRF et de la DGDDI

3.3 Symboles

b_0	Ordonnée à l'origine estimée de la relation $Y = b_0 + b_1x_i$
b_1	Pente estimée de la relation $Y = b_0 + b_1x_i$
β_0	Ordonnée à l'origine de la relation $Y = \beta_0 + \beta_1x_i$
β_1	Pente de la relation $Y = \beta_0 + \beta_1x$
ε	Composante d'erreur aléatoire
\bar{y}	Moyenne arithmétique des résultats d'essai
\bar{x}	Moyenne arithmétique
$s(b_1)$	Erreur-type sur le paramètre b_1
$s(b_0)$	Erreur-type sur le paramètre b_0
T_0	Première échéance de mesures effectuées lors du test d'homogénéité
T_{stab}	Deuxième échéance de mesures réalisées juste après la date limite de retour des résultats des participants
T_{sup}	Troisième échéance de mesure entre T_0 et T_{stab} ou après T_{stab}
U_{mesure}	Incertitude élargie de la méthode de mesure
α	Niveau de signification (probabilité d'erreur de type I)

4. RECOMMANDATIONS POUR LA PRÉPARATION ET LA CONSERVATION D'UN MCQ

La préparation d'un matériau initial en vue de l'obtention d'une ESEA est une étape cruciale, qui nécessite une expertise afin d'obtenir un ou des ESEA homogènes et stables. L'approche proposée ici, consiste à produire des ESEA en nombre suffisant pour l'organisation d'un essai d'aptitude d'une part et d'autre part pour une distribution auprès des LO, en tant que MCQ pour lequel une durée de conservation aura été définie selon une approche statistique. Les différentes étapes de la préparation sont présentées dans la **Figure 1**.

L'expertise et l'expérience du LNR dans son domaine d'application permettra de choisir le(s) triptyque(s) matrice(s) / analyte(s) / niveau(x), le(s) plus pertinent(s) et ainsi de préparer le matériau.

À partir de celui-ci l'ESEA sera préparée dans son conditionnement final, la valeur assignée sera déterminée et l'homogénéité sera vérifiée. Il sera alors utilisé pour réaliser l'EILA. Après vérification de la stabilité et après clôture de l'EILA, les ESEA restant deviendront des MCQ avec durée de conservation qui pourront être envoyés aux LO. Si le LNR décide de fabriquer un MCQ avec durée de conservation, il en informera son réseau, le plus en amont possible.

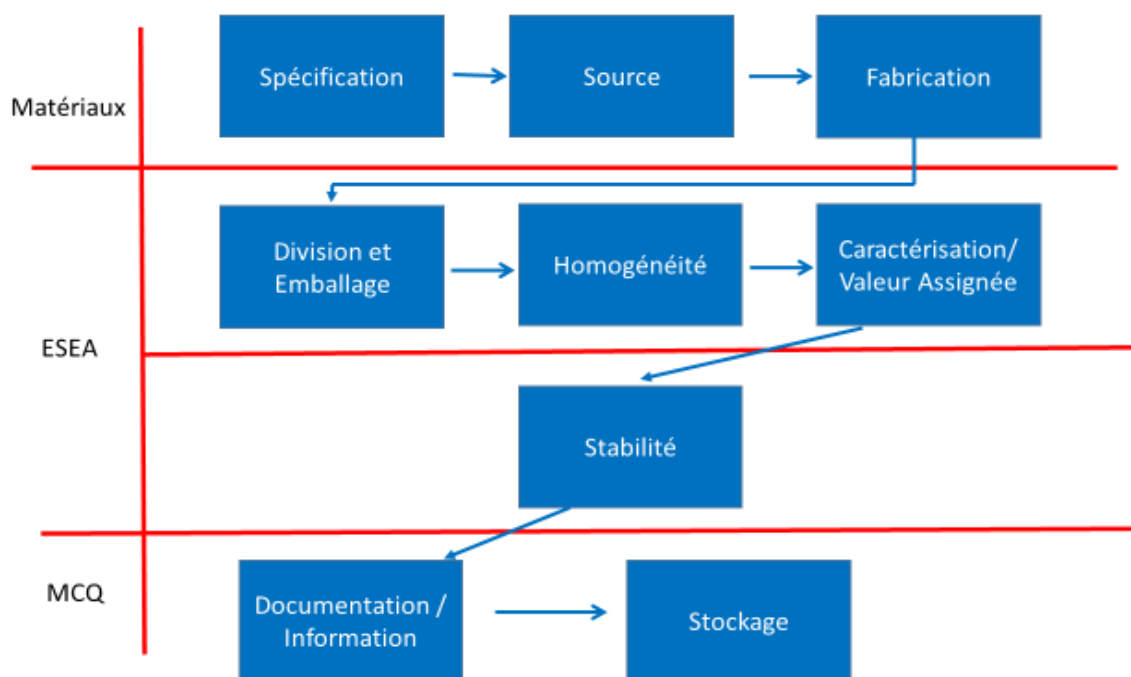


Figure 1 : Des matériaux aux MCQ, les différentes étapes (inspiré de l'ISO Guide 80:2014 [8])

4.1 Choix du ou des couple(s) analyte(s)/matrice(s)

Le choix de la matrice et des analytes retenus dans le cadre de la préparation d'une ESEA doit être le plus représentatif possible du domaine d'application de la méthode mise en œuvre. Ces choix sont effectués par le LNR et reposent sur son expertise. Dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments, deux types de matrices sont couramment employés :

- **Les matrices naturellement contaminées ou issues d'expérimentations animales** : le choix de ce type de matrice est idéal car il est plus représentatif des échantillons analysés en routine. En effet, l'analyte doit réellement être extrait de la matrice, contrairement à une supplémentation. L'absence d'échantillons naturellement contaminés, les faibles quantités disponibles, le nombre d'analytes limités présents dans la matrice ou les niveaux de concentrations inadaptés peuvent présenter un frein majeur au choix de cette option.

Le mélange de deux matrices naturellement contaminées ou issues d'expérimentation de même nature est possible afin d'augmenter le nombre d'analytes d'intérêts ou pour adapter le niveau de concentration attendu. Les niveaux de concentration en analytes de chaque échantillon individuel doit être suffisamment élevés, en raison de l'effet de dilution occasionné par le mélange.

- **Les matrices exemptes de composés d'intérêts et supplémentées en analytes** : lorsque des solutions de standards sont disponibles et que leur coût n'est pas un facteur limitant, la supplémentation en analytes est possible et permet de gérer le nombre d'analytes et leur niveau de concentration pour la préparation de l'ESEA.

Lorsqu'une ESEA doit contenir un large panel d'analytes, une solution hybride peut être mise en œuvre : il consiste à utiliser une matrice naturellement contaminée avec certains analytes et à la compléter avec les analytes que l'on souhaite intégrer à l'ESEA.

4.2 Choix des niveaux de concentrations ciblés

Les niveaux de concentrations ciblés sont définis en fonction des données d'occurrence existantes, des exigences réglementaires (si elles existent), des performances de la méthode d'analyse et de son domaine d'application.

Lorsque des matrices naturellement contaminées sont employées, le choix des niveaux de concentration ciblés est plus limité. Des mélanges d'échantillons peuvent permettre d'ajuster sensiblement les concentrations d'une ESEA, toutefois, cela devient particulièrement complexe lorsque ces échantillons contiennent plusieurs composés d'intérêt.

4.3 Préparation des ESEA

Cette étape est essentielle. La production d'ESEA [9] peut faire intervenir divers processus tels que le broyage, la lyophilisation ou la filtration. Des agents de stabilisation peuvent également être ajoutés. Le processus d'homogénéisation des futures ESEA permet de garantir une homogénéité inter-unités. Les procédures utilisées dépendent du type d'ESEA et nécessitent généralement une certaine expertise en matière de préparation d'échantillons.

L'utilisation d'une matrice exempte des composés d'intérêts implique de procéder à une supplémentation avec la ou les molécule(s) d'intérêt. Dans ce cas, deux méthodes de supplémentation peuvent être mises en œuvre : la supplémentation de l'homogénat ou la supplémentation individuelle des unités pour analyse. Quand cela est possible, il est préférable d'opter pour la première option.

Afin de disposer de suffisamment d'unités pour une future utilisation en routine en tant que MCQ avec durée de conservation, il conviendra de disposer d'une quantité suffisante d'ESEA pour mettre en œuvre les tests d'homogénéité, de stabilité et pour la participation des laboratoires à l'EILA. La quantité d'échantillon nécessaire est également dépendante de la taille de la prise d'essai utilisée pour la mise en œuvre de la méthode d'analyse. La préparation d'un grand nombre d'unités peut néanmoins présenter une difficulté majeure lorsque d'importants volumes de matrice sont à manipuler. Des équipements adaptés peuvent alors être requis.

L'étape finale consiste à codifier et étiqueter les différentes ESEA produites.

4.4 Stockage des ESEA

Les conditions de conservation, clairement décrites par le LNR organisateur de l'EILA, doivent assurer l'intégrité de l'ESEA tout au long de son utilisation et au-delà la campagne de l'EILA pour pouvoir être mises à la disposition des LO.

5. APPROCHE POUR L'OBTENTION D'UN MCQ AVEC UNE DURÉE DE CONSERVATION

L'évaluation de l'ESEA dans le but de devenir un futur MCQ avec durée de conservation, devra comporter au minimum 3 échéances dans le cas d'une étude de stabilité chronologique (illustration de ces échéances avec la **Figure 2** et définition d'une stabilité chronologique au 3.1) :

- Les mesures de la première échéance, T_0 , sont effectuées lors du test d'homogénéité par le LNR. Ce test est réalisé après avoir conditionné sous la forme finale les ESEA et avant de les distribuer aux participants.
- Les mesures de la deuxième échéance, T_{stab} , sont réalisées par le LNR lors du test de stabilité du support d'EILA. Ces analyses sont effectuées juste après la date limite de retour

des résultats des participants (généralement comprise entre 1 à 3 mois). Ce test se réalise sur au minimum 3 ESEA et avec des analyses répétées sur chacune des unités ($n \geq 2$).

- Une échéance supplémentaire, T_{sup} , doit être ajoutée afin d'obtenir un troisième point nécessaire à l'application d'un modèle de régression linéaire permettant de définir une durée de conservation. Cette échéance sera réalisée entre T_0 et T_{stab} ou après T_{stab} . Les mesures de cette échéance supplémentaire seront effectuées par le LNR sur au minimum 3 ESEA avec des analyses répétées sur chacune des unités ($n \geq 2$).

Note : une approche alternative consiste à intégrer les résultats des participants (LO) à l'EILA à l'échéance T_{stab} puisque les analyses du LNR à l'échéance de stabilité et les analyses des participants effectuées dans le cadre de l'EILA peuvent parfois être proches. Deux conditions doivent toutefois être respectées afin d'intégrer les résultats des participants (LO) :

- Les LO doivent avoir effectué les analyses à une date fixe proche de celle de la stabilité T_{stab} .
- La justesse (biais) et la fidélité (CV) entre les résultats acquis par le LNR (à T_0 lors de l'homogénéité et à T_{sup}) et ceux des LO (à T_{stab}) ne doivent pas être statistiquement différents.

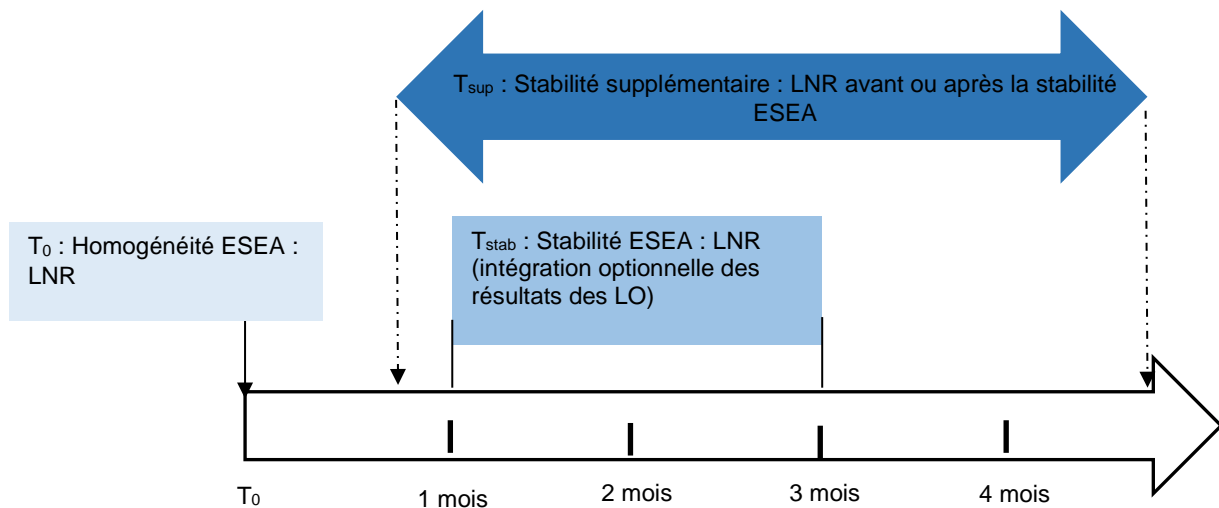


Figure 2 : Calendrier organisationnel des essais d'homogénéité et de stabilité

Lorsqu'une étude de stabilité isochrone (décrite dans le § 6.2.2) est mise en œuvre, l'approche décrite ci-dessus doit être adaptée. Contrairement à une étude de stabilité chronologique, où les résultats du T_0 sont ceux du test d'homogénéité, ici les résultats des trois échéances sont obtenus lors du test de stabilité. De plus, l'ensemble des mesurages doivent être effectués par le LNR. En fonction du positionnement de l'échéance T_{sup} (avant ou après T_{stab}), les mesurages correspondant à T_0 , T_{sup} et T_{stab} seront effectués à :

- T_{stab} lorsque $T_{sup} < T_{stab}$
- T_{sup} lorsque $T_{sup} > T_{stab}$

6. ÉVALUATION DE L'HOMOGENÉITÉ ET DE LA STABILITÉ DE L'ESEA DANS LE CADRE DE L'ORGANISATION D'UN EILA ET PRÉDICTION D'UNE DURÉE DE CONSERVATION

L'organisateur de l'essai d'aptitude doit s'assurer que les ESEA sont suffisamment homogènes et stables tout au long de la campagne. Cette exigence capitale, englobe l'homogénéité intra et inter-unités. Cette évaluation doit être conduite après conditionnement sous leur forme finale des ESEA.

L'homogénéité et la stabilité doivent être vérifiées :

- À chaque nouveau lot, même si une vérification de l'homogénéité a déjà été effectuée lors d'une campagne précédente ayant le même périmètre, et le même objectif.
- Pour chaque triptyque matrice / analyte / niveau.

Deux cas sont alors à envisager : les matériaux sont caractérisés par une variable qualitative ou par une variable quantitative.

6.1 Variable qualitative

Plusieurs normes traitent de l'évaluation de l'homogénéité et la stabilité avec des variables qualitatives : les normes NF EN ISO 13528 [9] (norme d'application générale) NF EN ISO 22117 [10] (microbiologie des aliments), et NF U47-400 [11] (santé animale).

Dans le cas où les ESEA contiennent ou non les analytes recherchés, 100 % des réponses obtenues doivent être positives ou négatives, que ce soit pour l'homogénéité ou la stabilité. Le plan expérimental doit comporter plusieurs entités et la mesure doit être réalisée en conditions de répétabilité ($n \geq 2$).

Une durée de conservation peut être définie à partir des données de stabilité, toutefois cette prédiction ne pourra pas être effectuée au-delà de la dernière échéance. La stabilité du MCQ positif doit donc être vérifiée périodiquement.

Dans le cas où la variable qualitative est déduite d'une variable quantitative et que la relation est clairement établie, l'homogénéité et la stabilité peuvent être établies sur la variable quantitative en suivant ce qui est défini dans le paragraphe 6.2.

Pour des ESEA dont la concentration en analyte est proche de la LD ou du NED - c'est à dire le niveau d'analyte cible le plus faible correspondant à une probabilité de détection de 100 % - ou à proximité d'une valeur seuil où l'incertitude est forte, le nombre d'unités d'EILA à analyser peut être calculé selon la norme NF EN ISO 22117, paragraphe 8.4 [10].

Un exemple de vérification d'homogénéité et de stabilité pour un EILA qualitatif concernant une méthode de dépistage est présenté en **Annexe 4**.

6.2 Variable quantitative

Selon les domaines, des normes sont disponibles afin d'évaluer statistiquement l'homogénéité et la stabilité des supports d'EILA avec des variables quantitatives. Parmi elles, nous pouvons citer les normes NF EN ISO 22117 [8], NF ISO 13528 [9], et U47-400 [10], Guide ISO 35 [12].

6.2.1 Vérification de l'homogénéité

Afin d'éviter la réalisation d'essais additionnels, l'approche proposée ici consiste à reprendre les résultats obtenus lors de la vérification de l'homogénéité d'une ESEA dans le cadre d'un EILA. Cette vérification est conduite en suivant les exigences de la norme NF ISO 13528 [9]. Le plan expérimental mis en œuvre est construit avec un nombre d'unités supérieur ou égal à 10. Il n'est pas recommandé de réduire le nombre d'unités d'EILA à un nombre inférieur à 10 comme indiqué dans l'annexe B.1.1 de la norme NF ISO 13528 [9]. Justifier le choix si le nombre minimal de 10 ne peut pas être respecté (p. ex. contraintes techniques ou raisons éthiques pour des bio-essais). L'évaluation statistique de l'homogénéité doit être conduite telle que décrite dans l'annexe B de la norme ISO 13528 [9]. Lors de l'analyse préliminaire des données brutes, il est fortement recommandé de ne pas supprimer des données jugées atypiques.

À noter que le Guide ISO 35 [12] fournit des lignes directrices très précises sur la méthodologie à mettre en œuvre pour évaluer une homogénéité dans le cadre de la production d'un matériau de référence certifié. Cette norme exige qu'une analyse de la variance à un facteur soit conduite. Contrairement à l'approche proposée dans la norme NF ISO 13528 [9], il s'agit d'une véritable approche statistique. Elle constitue donc une alternative particulièrement pertinente mais plus complexe à mettre en œuvre.

Nous recommandons de mettre en œuvre le schéma expérimental de la norme NF EN ISO 13528 [9], à savoir 10 unités d'EILA mesurées en double en conditions de répétabilité ($n=2$). Une attention particulière doit être portée sur l'existence d'une tendance liée à la production des ESEA ou à la séquence d'analyse.

6.2.2 Évaluation de la stabilité afin d'estimer la durée de conservation

À partir des données obtenues lors de l'étude de la stabilité, dans le cadre de l'EILA, et selon le protocole défini dans la norme NF ISO 13528 [9], il est nécessaire d'ajouter des échéances afin de pouvoir estimer une durée de conservation. En effet, seules les approches statistiques développées dans le Guide ISO 35 [12] permettent de la prédire.

Le minimum requis consiste à avoir au moins 3 échéances, répétées en double. Toutefois, un nombre plus élevé d'échéances et de répétitions (par exemple 5 échéances avec 3 répétitions) permettent de calculer une durée de conservation avec une meilleure évaluation de l'incertitude élargie (U) associée.

Tel que définis dans les normes NF ISO 13528 [9] et le Guide ISO 35 [12], la stabilité peut être étudiée selon une approche chronologique ou une approche isochrone :

- Une étude de stabilité chronologique (cf. 3.1 définition) permet d'obtenir des résultats de mesure dans des conditions de fidélité intermédiaire [13]. En effet, plusieurs mesures sont relevées à différents points dans le temps (**Figure 3**).

1 – Obtention des unités de l'ESEA et stockage dans les conditions de l'étude de stabilité (facteur testé)

2 – Prélèvement à chaque pas de temps de l'étude

3 – Mesures à chaque pas de temps de l'étude (conditions de fidélité intermédiaire)

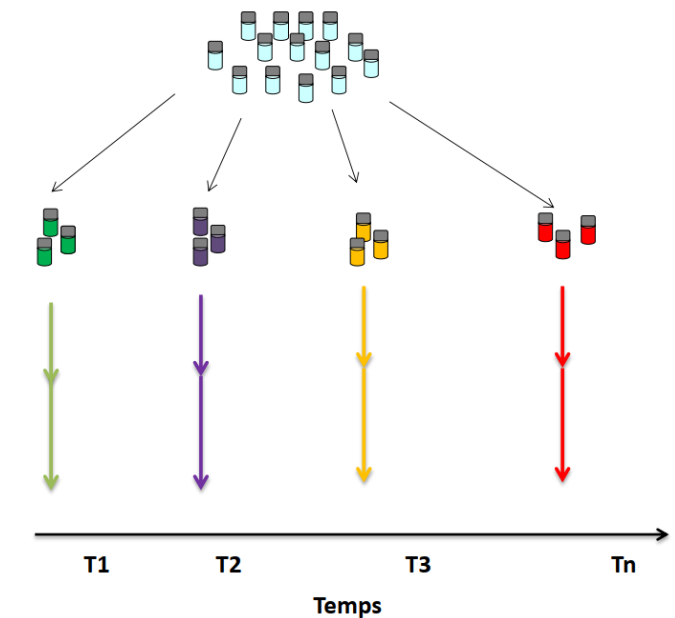


Figure 3 : Plan d'expérience chronologique permettant d'évaluer la stabilité d'un matériau soumis à un EILA (cf. lignes directrices Aquaref [14])

- Une étude de stabilité isochrone (cf. 3.1 définition) permet d'acquérir les résultats dans des conditions de répétabilité (en fin d'étude). Un ensemble d'unités est exposé à des conditions de stockage définies pendant un certain temps, avant d'être placé dans les conditions de référence (à une température inférieure à celle pour laquelle on considère que la dégradation est improbable), au terme de la durée d'exposition prévue pour chaque entité. Il est également possible de procéder dans l'autre sens et de placer, dans un premier temps, les entités dans les conditions de référence, puis ensuite de les placer dans les conditions de stockage définies. (**Figure 4**).

1 – Obtention des unités de l'ESEA et stockage des unités destinées à l'étude de stabilité dans des conditions de référence

2 – Prélèvement à chaque pas de temps

3 – Stockage dans les conditions de l'étude de stabilité (facteur testé)

4 – Préparation et mesures dans des conditions de répétabilité

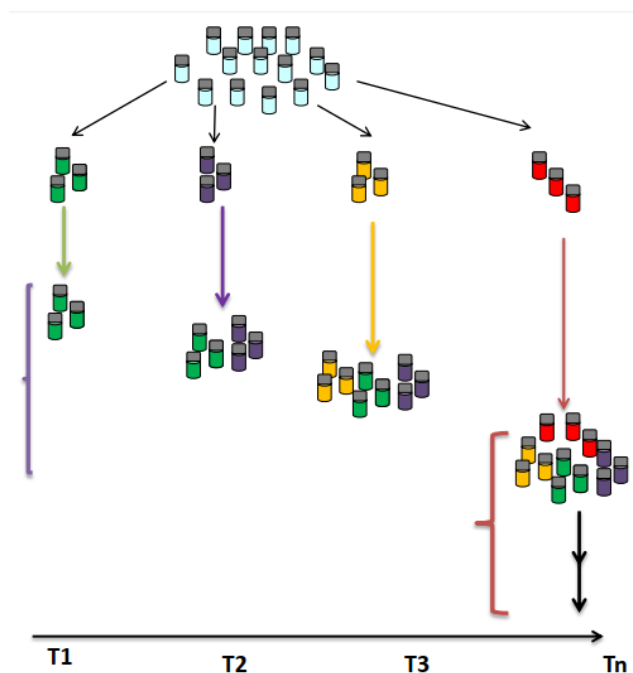


Figure 4 : Plan d'expérience isochrone permettant d'évaluer la stabilité d'un matériau soumis à un EILA (cf. lignes directrices Aquaref [14])

Les avantages et inconvénients de ces 2 approches sont décrits dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des approches de stabilité chronologique et isochrone (Cf. Guide ISO 35 [12] et lignes directrices Aquaref [14])

	Approche chronologique	Approche isochrone
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Facilité de mise en œuvre. • Acquisition des résultats au fur et à mesure de l'étude. 	<ul style="list-style-type: none"> • Approche très discriminante permettant de disposer de la meilleure fidélité analytique possible. Tous les mesurages sont effectués dans des conditions de répétabilité. La mise en évidence d'une hétérogénéité ou d'instabilité est ainsi facilitée. Cette approche permet de s'affranchir d'une dérive à long terme du système de mesure qui peut être prise à tort pour une instabilité.
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessité de disposer d'une méthode de mesure avec une excellente fidélité intermédiaire afin de ne pas conclure à tort à une instabilité. • Moins discriminante que l'approche isochrone pour mettre en évidence une hétérogénéité ou une instabilité. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessité de pouvoir stocker de manière temporaire les entités dans des conditions de stabilité parfois extrême (-80°C). Il n'est pas toujours possible de stocker les entités dans des conditions plus extrêmes que celles prévues pour le stockage définitif des entités. • Acquisition des résultats à la fin de l'étude. La conclusion de la stabilité ou de l'instabilité est donc tardive. • Nécessite que les paramètres étudiés évoluent de manière minimale dans les conditions de stockage de référence. • Les mécanismes de dégradation ne sont pas systématiquement influencés par l'évolution de la température.

À noter qu'il est également possible de mener une étude de stabilité pseudo-isochrone. Il s'agit d'un type d'étude de stabilité hybride, entre l'étude chronologique et l'étude isochrone. Ces approches sont décrites dans les lignes directrices Aquaref [14].

Pour évaluer la stabilité et la durée de conservation, le choix d'un modèle linéaire est recommandé tel que proposé dans le Guide 35 [12]. Il s'agit d'une approximation des mécanismes cinétiques de dégradation. Dans le cas où un mécanisme non linéaire est identifié, un modèle mathématique de dégradation correspondant doit être préféré (p. ex. modèle exponentiel, logarithmique...).

Le modèle se décrit par l'équation (1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon \quad \text{Équation 1}$$

où β_0 , est l'ordonnée à l'origine, β_1 la pente et ε la composante d'erreur aléatoire.

Le modèle est ajusté par régression linéaire basée selon la méthode des moindres carrés afin de permettre d'estimer une valeur Y pour une valeur X particulière.

Avant d'ajuster le modèle de régression, il convient d'examiner les résultats et de vérifier les hypothèses sous-jacentes. Il est notamment nécessaire de s'assurer que le modèle de dégradation choisi est adéquat. Dans le cas d'un modèle linéaire, il conviendra de s'assurer de l'absence de non-linéarité. Les hypothèses suivantes doivent être vérifiées (**Figure 5**) :

- La normalité de la distribution. Le tracé d'un Q-Q plot (quantile-quantile plot) permet d'évaluer graphiquement cette hypothèse. Il est également possible de calculer le coefficient d'aplatissement (kurtosis), d'asymétrie (skewness) de la distribution ou de mettre en œuvre le test d'hypothèse de Shapiro-Wilk. D'autres tests statistiques existent et peuvent être appliqués.
- L'homoscédasticité (homogénéité de la variance). Le calcul des résidus et leur représentation graphique (en fonction du temps) peuvent permettre d'évaluer graphiquement cette hypothèse. Le test statistique de Levène ou d'autres tests statistiques pertinents peuvent être appliqués.

Dans le cas où ces hypothèses ne seraient pas vérifiées, il est possible de rechercher et d'écartier les données qui seraient jugées atypiques. Cela devra néanmoins être effectué avec une grande prudence et argumenté.

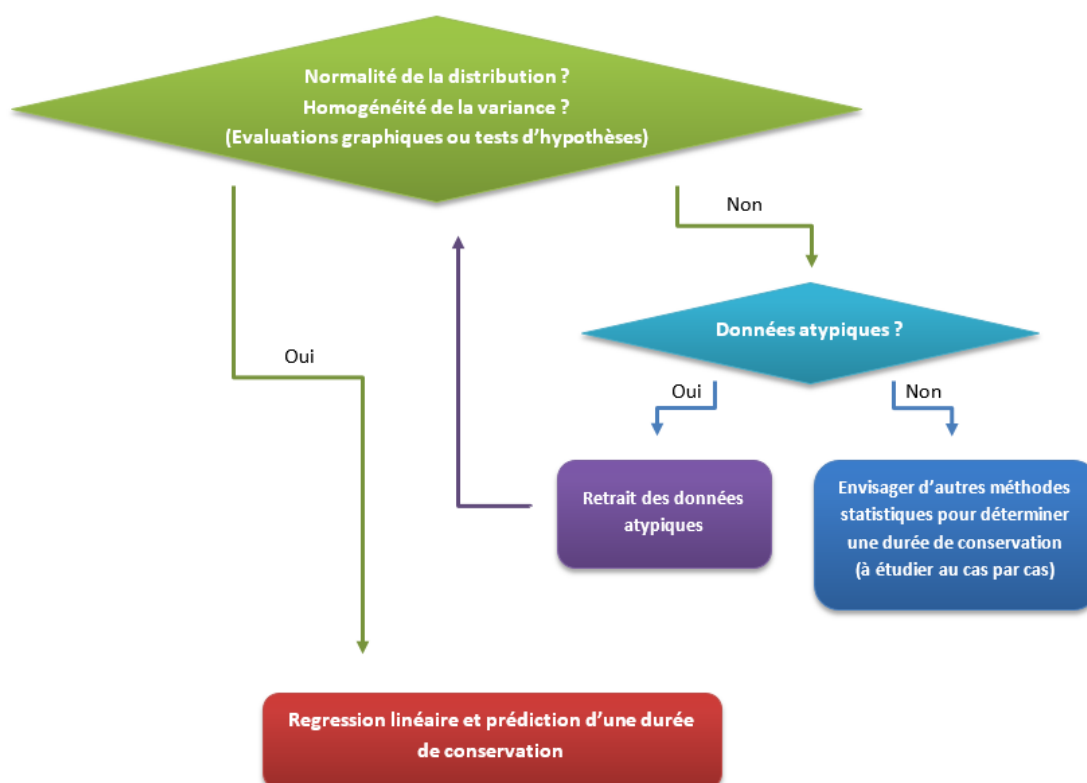


Figure 5 : Traitement statistique à mener pour une prédiction de la durée de conservation d'un MCQ

Le chapitre B4 de l'annexe B du guide ISO 35 [12], décrit la procédure permettant de prédire la durée de conservation d'un MCQ. La difficulté réside dans la détermination des limites d'acceptabilité (Instabilité Maximale Admissible - IMA). Les IMA peuvent être déterminées selon les 6 différentes approches non hiérarchisées suivantes (au choix du LNR ; cf. **Figure 6**) :

- **Cas 1** : en se basant sur des exigences réglementaires, lorsqu'elles existent ;
- **Cas 2** : à partir de l'incertitude élargie de mesure de la méthode (U_{mesure}), avec $\text{IMA} = 1/3 U_{\text{mesure}}$ (au maximum). U_{mesure} sera l'incertitude élargie de mesure définie en intralaboratoire si les essais de stabilité sont réalisés par le LNR. Dans le cas où des mesures sont également fournies par les LO à T_{stab} , alors l'incertitude élargie interlaboratoires U_{mesure} doit être utilisée (cf. §5) ;
- **Cas 3** : en utilisant l'écart-type inter-unités d'homogénéité obtenu en conditions de répétabilité à T_0 ($\text{IMA} = 2 \times \text{écart-type inter-unités d'homogénéité}$) ou durant l'étude de validation en retenant l'écart-type de répétabilité de la méthode ($\text{IMA} = 2 \times \text{écart-type de répétabilité}$) ;
- **Cas 4** : en fixant une valeur par perception selon l'expérience / expertise du LNR ou en se basant sur des données bibliographiques existantes (p. ex. 20 ou 25 %).
- **Cas 5** : à partir d'un écart-type issu d'un modèle empirique (p. ex. Horwitz, Horwitz revu par Thompson) avec $\text{IMA} = 2 \times \text{écart-type du modèle} / 3$;
- **Cas 6** : à partir de l'incertitude élargie U de la valeur assignée définie lors de l'EILA. Par analogie avec un MRC, l'IMA est égale à l'incertitude élargie $U_{\text{MRC}} / 3$.

Le croisement entre l'intervalle de confiance de la valeur prédite et l'IMA permet de prédire la durée de conservation du MCQ. Cette approche est celle adoptée dans le Guide ISO 35 [12] et retenue par ce GT. Il est possible de prolonger cette droite au-delà de la période de stabilité étudiée dans le cas où la durée de conservation n'a pas encore été atteinte. Cette durée de conservation ne pourra être donnée qu'à titre informatif. Les formules statistiques sont détaillées dans l'**Annexe 5**. Afin d'obtenir une durée de conservation plus rigoureuse, il conviendra d'ajouter de nouvelles échéances de stabilité.

Le traitement statistique des résultats doit être effectué en utilisant un logiciel adéquat. Certains logiciels commerciaux (p. ex. Stability, Statgraphics, plug-in XLSTAT avec Excel) et d'autres libres (p. ex. R, Python) permettent de faire ces calculs. Toutefois, ces derniers nécessitent le développement de scripts. Les profils de stabilité présentés dans ce document ont été générés à partir d'un script R faisant appel au package ggplot2 [15 ; 16]

Choix d'une méthode de fixation d'une instabilité maximale admissible (IMA)

Cas 1 :
Exigence
réglementaire

Cas 2 :
Incertitude
de mesure

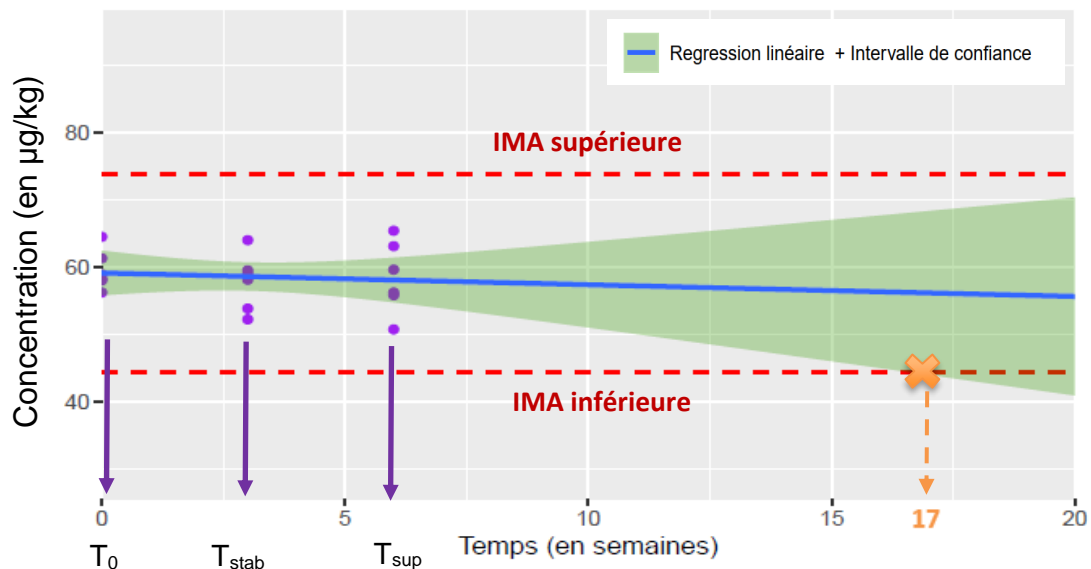
Cas 3 :
Écart-type
d'homogénéité

Cas 4 :
Par
perception

Cas 5 :
Modèle
empirique

Cas 6 :
Incertitude
de la valeur
assignée

Représentation graphique



Conclusion sur la stabilité

Prédiction de la durée de conservation

Figure 6 : Logigramme du processus de prédiction de la durée de conservation d'un MCQ
(Approche adaptée des lignes directrices Aquaref [14])

Selon la stratégie établie en **Figure 6**, la stabilité entre T_0 et T_{sup} est assurée et la prédiction de la durée de conservation est ici de 17 mois (croisement entre IMA et régression linéaire + intervalle de confiance).

Des exemples de calculs d'homogénéité et de stabilité des ESEA pour obtenir un MCQ avec une durée de conservation sont présentés en **Annexe 4 (A4.2)**. Trois exemples d'estimation d'une durée de conservation du MCQ en fonction des IMA choisis sont présentés en **Annexe 6**.

7. MISE À DISPOSITION DES MCQ

La mise à disposition par le LNR, auprès des LO du réseau, d'un MCQ avec durée de conservation, produit lors de l'organisation d'un EILA, est conditionnée par les résultats des analyses réalisées selon les étapes décrites aux paragraphes 5 et 6. L'exploitation statistique des données permet ou non de déterminer une durée de conservation prédictive pour le triptyque (matrice, analyte, niveau de concentration) considéré. La durée de conservation définie pour un MCQ et pour un triptyque donné est difficilement extrapolable aux autres composés de la même famille ou à des niveaux de concentration différents (même pour des analytes similaires appartenant à la même famille de composés, sauf exception dûment justifiée).

Le LNR s'appuie sur son expérience, sur la bibliographie et les travaux existants pour apprécier/valider la cohérence de la durée de conservation déterminée.

Note : Selon le Guide ISO 35 [12] pour les MRC, il est recommandé de surveiller la stabilité d'un matériau, notamment si la durée de conservation peut paraître longue ou si des conditions de conservation ont été modifiées. La surveillance d'un MCQ par le LNR peut être mise en œuvre mais reste optionnelle.

La communication de cette durée de conservation prédictive est faite au moment de l'envoi du MCQ aux demandeurs. Cette information est accompagnée à minima de la valeur assignée à l'ESEA (valeur assignée de l'EILA) et éventuellement de son incertitude élargie associée, afin de permettre l'utilisation appropriée par les LO utilisateurs du MCQ. Voir modèle de fiche descriptive en **Annexe 7**.

La durée de conservation est une donnée prédictive qui n'engage pas la responsabilité du LNR. A fortiori, le LNR décline toute responsabilité sur l'utilisation du MCQ au-delà de la durée de conservation. Enfin, l'utilisation des MCQ avec durée de conservation est de la responsabilité de l'utilisateur et n'engage pas la responsabilité du LNR.

Annexe 1 - Membres du GT MR et autres contributeurs

Animateur :

Christophe GÉNOUEL, SCL - Laboratoire de Rennes

Membres experts :

Stéphanie PRÉVOST, LABERCA

Jean Marc LAMBERT, AECLDPA

Michel LAURENTIE, Anses - Laboratoire de Fougères

Dominique HURTAUD-PESSEL, Anses - Laboratoire de Fougères (de 2015 à 2020)

Marie Pierre CHOTARD-SOUTIF, Anses - Laboratoire de Fougères (à partir de 2017)

Vincent HORT, Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments

Deux représentants de l'ADILVA (en 2015 et en 2018)

Représentants de la direction de la stratégie et des programmes de l'Anses :

Barbara GOUGET (de 2015 à 2019)

Thierry GUÉRIN (à partir de mars 2022)

Véronique DA-RIZ (relecteur version finale)

Bertrand LOMBARD (relecteur version finale)

Représentantes de la direction du SCL :

Hélène GAYON (de 2015 à 2019)

Julie SISOURAT-CABILLIC (de 2019 à 2021)

Les membres du GT souhaitent **remercier chaleureusement** les LO suivants, ayant participé aux études pilotes et ayant contribué aux échanges fructueux entre LNR et LO :

- Liste des 8 laboratoires participants à l'étude pilote de l'Anses Fougères sur les médicaments vétérinaires (Chloramphénicol) :
 - o Laboratoire Départemental 31 EVA (LD 31)
 - o Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches (LDAR 87)
 - o Laboratoire public Conseil Expertise et Analyse en Bretagne – site de Combourg (LABOCEA 35)
 - o Laboratoire de l'Environnement et de l'Alimentation de la Vendée (LEAV 85)
 - o Laboratoire Départemental de la Côte d'Or (LDCO 21)
 - o Aveyron Labo
 - o Laboratoire public Conseil Expertise et Analyse en Bretagne – site de Quimper (LABOCEA 29)
 - o Anses - Laboratoire de Fougères
- Liste des 10 laboratoires participants à l'étude pilote de l'Anses Maisons Alfort sur les Biotoxines marines :
 - o Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments
 - o Laboratoire Départemental de la Côte d'Or (LDCO 21)
 - o Laboratoire public Conseil Expertise et Analyse en Bretagne – site de Combourg (LABOCEA 35)
 - o Laboratoire de l'Environnement et de l'Alimentation de la Vendée (LEAV 85)
 - o Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer - Laboratoire Environnement et Ressources de Bretagne Occidentale - IFREMER-LER
 - o Laboratoire Départemental d'Analyses des Bouches du Rhône (LDA 13)
 - o QUALYSE - site de La Rochelle-17
 - o INOVALYS - site de Nantes - 44
 - o INOVALYS - site de Vannes - 56 (ex-LDA 56)
 - o Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer – Centre Atlantique - IFREMER Centre-Atlantique

- Liste des 5 laboratoires participants à l'étude pilote Aflatoxine M1 du SCL 35 :
 - o Laboratoire public Conseil Expertise et Analyse en Bretagne – site de Ploufragan (LABOCEA 22)
 - o INOVALYS - site de Nantes - 44
 - o QUALYSE - site de La Rochelle - 17
 - o Laboratoire de l'Environnement et de l'Alimentation de la Vendée (LEAV 85)
 - o Service Commun des Laboratoires DGCCRF&DGDDI – site de Rennes (SCL 35)

- Liste des 4 laboratoires participants à l'étude pilote Esters de stéroïdes du LABERCA :
 - o Laboratoires des Pyrénées et des Landes – Site de Mont de Marsan (LPL)
 - o Laboratoire Départemental de la Côte d'Or (LDCO 21)
 - o INOVALYS - site de Nantes - 44
 - o Laboratoire public Conseil Expertise et Analyse en Bretagne – site de Quimper (LABOCEA 29)

Annexe 2 – Modèle d'inventaire type de Matériaux de Référence établi pour chaque réseau LNR et LO

Inventaire des matériaux de référence disponibles à la date du xx/yy/20zz

La liste ci jointe n'est pas exhaustive et est donnée/fournie à titre indicatif

NOM du LNR

personne contact : xxx

Courriel : généric@xxx.fr

Matériaux de Référence Certifié (MRC)

Analyte ou groupe de substances	Matrice (colonne optionnelle à remplir en fonction des besoins)	Gamme de concentration - ordre de grandeur	DLUO (info optionnelle)	Fournisseur	Lien sur page d'accueil du fournisseur
---------------------------------	---	--	-------------------------	-------------	--

Matériaux de Référence Externe (MRE)

Analyte ou groupe de substances	Matrice (colonne optionnelle à remplir en fonction des besoins)	Gamme de concentration - ordre de grandeur	Fournisseur	Lien sur page d'accueil du fournisseur
---------------------------------	---	--	-------------	--

MCQ avec durée de conservation fourni par le LNR

Analyte ou groupe de substances	Matrice (colonne optionnelle à remplir en fonction des besoins)	Gamme de concentration - ordre de grandeur	DLUO
---------------------------------	---	--	------

D'une manière générale, la stratégie retenue pour cette étude pilote a été la suivante :

- 1- Caractérisation du support d'EILA par une étude statistique d'homogénéité et/ou de stabilité : calcul de la valeur cible, de l'écart type de dispersion des résultats ;
- 2- Distribution du support auprès des laboratoires participants pour une analyse et un rendu de résultat selon leur procédure habituelle à une date définie par le LNR ;
- 3- Selon le domaine d'application de la étude pilote, des analyses additionnelles ont été demandées aux LO, à une ou plusieurs dates fixées par le LNR organisateur.

Note : Pour les biotoxines marines, la seconde étude pilote, en mode isochrone fait exception à ce cas général. Les études de stabilité et d'homogénéité ont été réalisées par le seul LNR.

L'organisation de chaque étude pilote est décrite ci-dessous :

A3.1 Esters de stéroïdes/matrice poils

Le Laboratoire d'Etude des Résidus et des Contaminants Chimiques dans les Aliments (LABERCA) est LNR pour les promoteurs de croissance. Dans le cadre du GT, l'étude pilote a porté sur un matériau contenant les substances interdites appartenant au Groupe A3 décrit dans l'annexe 1 de la Directive 96/23CE. Cette étude pilote a été réalisée simultanément avec l'EILA organisé fin 2015 par le LABERCA sur le couple analyte/matrice esters de stéroïdes/poils. Aucun échantillon provenant d'expérimentation n'étant disponible pour cette étude pilote, les échantillons préparés sont des échantillons supplémentés par les analytes d'intérêt. Quatre laboratoires du réseau ont participé à cette étude pilote en mettant en œuvre la méthode validée et accréditée. Les données d'acquisition brutes des analyses réalisées aux échéances T0, T+2 mois, T+4 mois, T+6 mois, T+8 mois et T+12 mois, ont été retraitées par le LNR afin de s'assurer de la qualité du jeu de données avant leur exploitation statistique. L'analyse d'un QC méthodologique par les laboratoires participants a été imposée pour cette étude pilote. Le stockage des flacons à – 18 °C a été demandé dans les instructions. Le retraitement des données a permis de déterminer une durée de conservation préliminaire pour 15 des 20 composés testés (5 composés non stables).

A3.2 Médicaments vétérinaires

Le laboratoire de Fougères de l'Anses est LNR pour les résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées d'origine animale et aliments pour animaux. Dans le cadre du GT, l'étude pilote a porté sur du chloramphénicol dans du muscle de porc. Le chloramphénicol est inscrit dans le tableau 2 des substances interdites du règlement de la commission européenne (EU) N°37/2010 du 22/12/2019. Des EILA portant sur la confirmation de la présence de cette substance dans une matrice biologique sont régulièrement organisés par le LNR à destination des LO. Le matériau utilisé pour l'étude pilote a été préparé conjointement à un essai d'aptitude, ce qui a permis d'optimiser l'étude d'homogénéité et l'envoi des ESEA. Huit laboratoires (7 LO et le LNR) ont accepté de participer à cette étude. Tous ont reçu 6 flacons contenant chacun environ 20 g de matériau congelé afin d'analyser le matériau à 6 échéances programmées (T0, T+2 mois, T+4 mois, T+8 mois, T+12 mois et T+25 mois). Le stockage des flacons à – 18 °C a été imposé. L'analyse des résultats à T+12 mois a montré que le matériau stocké à – 18 °C était stable à minima 12 mois et le modèle statistique a établi une durée de conservation prédictive de 32 mois. Cependant à l'échéance de T+ 25 mois, la confirmation de cette durée de conservation prédictive de 32 mois n'a pas été validée. Il en résulte que la qualité des données initiales et l'écart important entre les échéances à T+12 mois et T+25 mois ont un impact significatif sur l'estimation de la durée de conservation.

A3.3 Biotoxines marines

Le Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSAI) de l'Anses à Maisons-Alfort détient un mandat de LNR pour les biotoxines marines. Dans le cadre du GT, 2 études pilotes de stabilité de matériaux ont été conduites avec la méthode de détermination des biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par LC-MS/MS ([ANSES LSAI LSA-INS-0147.pdf](#)). Les matériaux étudiés étaient des homogénats de mollusques bivalves naturellement contaminés par plusieurs biotoxines marines lipophiles réglementées, produits initialement lors des campagnes d'EILA 2015 et 2017. Ces matériaux ont été estimés homogènes et stables lors de leur campagne respective. Les conditions de conservation étaient fixées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La première étude était une étude de stabilité interlaboratoires, étalée sur une durée de 2 ans. Cette étude était subdivisée en 3 échéances (T0, T+ 1 an et T+ 2 ans). Neuf laboratoires appartenant au réseau des laboratoires agréés pour l'analyse des biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par LC-MS/MS ont participé à cette étude. Sur 12 biotoxines marines testées, 9 ont été estimées stables au terme de ces 2 ans.

La seconde étude était une étude de stabilité intra-laboratoire de deux ESEA produits en 2017. Un plan d'expérience isochrone [7], étalé sur une durée de 6 semaines et composé de 3 échéances, a été construit en suivant les exigences de la norme FD ISO Guide 35 [12]. Sur les 11 biotoxines marines ou groupes de biotoxines marines contenues dans les deux ESEA, 10 ont été estimées stables au terme de ces 6 semaines. Une prédiction de la durée de conservation de ce matériau a également été étudiée par extrapolation d'une régression linéaire modélisant la dégradation des composés d'intérêt.

A3.4 Aflatoxine M1

Le laboratoire du Service Commun des Laboratoires de Rennes (SCL35) est LNR pour les mycotoxines et toxines de plantes dans les denrées d'origine animale et les denrées d'origine végétale. Dans le cadre du GT, l'étude pilote mycotoxine a porté sur un matériau constitué de poudre de lait déshydratée contenant de l'Aflatoxine M1. L'analyse a été réalisée selon la méthode NF EN ISO 14501 (« Détermination de la teneur en aflatoxine M1 dans les laits et laits en poudre »), par CLHP-Fluo. Le choix du matériau de poudre de lait s'est porté sur un support d'EILA qui avait déjà fait l'objet d'un circuit d'intercomparaison en Mai 2016 (Circuit Bipea 31d) avec un nombre de laboratoires participants assez large (20-25 laboratoires), dont les 5 laboratoires du réseau mycotoxines dans les DAOA. Cela constituait donc le premier jeu de données à T0 (mai 2016). Ce même support d'EILA Bipea a été redistribué en aveugle à T+12 mois aux 5 laboratoires du réseau (envoi en avril 2017 ; rendu des résultats fin mai 2017), avec, de nouveau, une demande d'analyse en double. A T+12 mois, le LNR a vérifié la qualité des données 2016 et 2017 et a transmis le jeu de données (analyse en simple majoritairement en 2016 à T0 et moyenne de 2 résultats en 2017 à T+12 mois) pour traitement statistique (comparaison des moyennes avec test de Student). La conclusion de cette étude pilote simplifiée est que le matériau poudre de lait est stable à minima 12 mois et qu'une durée de conservation minimale de 12 mois pour le triplet poudre de lait/aflatoxine M1/concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ est réaliste.

A3.5 Conclusions des études pilotes

À partir d'un support d'EILA dont l'homogénéité et la stabilité ont été caractérisées initialement par un LNR, les résultats de ces études pilotes démontrent qu'il est possible de proposer une méthodologie de production d'un matériau de référence avec une date d'utilisation optimale (durée de conservation Dc), qui pourrait être utilisée à des fins de contrôle qualité par les LO.

Cependant, ces études pilotes ont aussi montré que la prédiction de cette durée de conservation dépendait de la qualité des données, des échéances de recueil des données, du nombre d'échéances et des approches statistiques mises en œuvre.

Enfin, lorsque les LO participent à la caractérisation du MCQ, le travail additionnel engendré pour le LNR et les LO peut être chronophage, d'où l'idée de proposer dans ce guide une démarche scientifiquement établie et rigoureuse, proportionnée au besoin.

Annexe 4 - Exemples d'EILA avec calculs et interprétation appropriés sur l'homogénéité et la stabilité

A4.1 Exemple d'un EILA qualitatif

L'objectif de cet EILA était d'évaluer la performance des LO mettant en œuvre une méthode qualitative (résultat conforme ou suspect) de dépistage de résidus d'antibiotiques dans le muscle par LC-MS/MS. L'exemple de cet EILA est composé de 2 ESEA, l'ESEA 1 qui représente un "blanc" (absence d'antibiotique) et l'ESEA 2 composée de 3 antibiotiques à des concentrations permettant de le déclarer comme suspect (**Tableau A4-1**).

Les concentrations trouvées ou l'absence de pic permettent de prendre une décision sur le statut de l'échantillon conforme ou suspect selon le schéma suivant :

- Lorsque la concentration est supérieure à la valeur seuil, l'ESEA est considéré comme suspect.
- Lorsque la concentration est inférieure à la valeur seuil, l'ESEA est considéré comme conforme.
- Lorsqu'il y a absence de pic, l'ESEA est considéré comme conforme.

Tableau A4-1 – Composition des matériaux

	ESEA 1	ESEA 2		
Analytes	"Blanc"	Dihydrostreptomycine (DHS)	Pénicilline G	Sulfadiméthoxine
Concentration visée en µg/kg	-	500	25	50
Valeur seuil en µg/kg	-	250	5	25
Résultats attendus	Conforme	Suspect	Suspect	Suspect

Tableau A4-2 – Résultats obtenus pour l'étude d'homogénéité

ESEA 1		ESEA 2			
N° unité	« Blanc »	N° unité	Dihydrostreptomycine (DHS)	Pénicilline G	Sulfadiméthoxine
104a	Conforme	498a	Suspect	Suspect	Suspect
104b	Conforme	498b	Suspect	Suspect	Suspect
20a	Conforme	82a	Suspect	Suspect	Suspect
20b	Conforme	82b	Suspect	Suspect	Suspect
265a	Conforme	293a	Suspect	Suspect	Suspect
265b	Conforme	293b	Suspect	Suspect	Suspect
55a	Conforme	424a	Suspect	Suspect	Suspect
55b	Conforme	424b	Suspect	Suspect	Suspect
62a	Conforme	99a	Suspect	Suspect	Suspect
62b	Conforme	99b	Suspect	Suspect	Suspect
123a	Conforme	242a	Suspect	Suspect	Suspect
123b	Conforme	242b	Suspect	Suspect	Suspect
352a	Conforme	32a	Suspect	Suspect	Suspect
352b	Conforme	32b	Suspect	Suspect	Suspect
3a	Conforme	228a	Suspect	Suspect	Suspect
3b	Conforme	228b	Suspect	Suspect	Suspect
15a	Conforme	486a	Suspect	Suspect	Suspect
15b	Conforme	486b	Suspect	Suspect	Suspect
402a	Conforme	244a	Suspect	Suspect	Suspect
402b	Conforme	244b	Suspect	Suspect	Suspect
Conclusion	Homogène	Conclusion	Homogène	Homogène	Homogène

Dans le cas d'un EILA qualitatif, les résultats (**Tableau A4-2**) des 20 extraits doivent être conformes ou suspects sans exception pour déclarer le matériau homogène :

- Les 20 extraits (10 unités, 2 prises d'essai par unité) de l'ESEA 1 ont montré des résultats conformes, l'ESEA 1 est déclaré homogène.
- Les 20 extraits (10 unités, 2 prises d'essai par unité) de l'ESEA 2 ont montré des résultats suspects, l'ESEA 2 est déclaré homogène.
-

Tableau A4-3 – Résultats de l'étude de stabilité

ESEA 2			
N° unité	Dihydrostreptomycine (DHS)	Penicilline G	Sulfadiméthoxine
121a	Suspect	Suspect	Suspect
121b	Suspect	Suspect	Suspect
201a	Suspect	Suspect	Suspect
201b	Suspect	Suspect	Suspect
40a	Suspect	Suspect	Suspect
40b	Suspect	Suspect	Suspect
Conclusion	Stable	Stable	Stable

À l'échéance de la stabilité, les 6 extraits (3 unités, 2 prises d'essai par unité) de l'ESEA 2 ont montré des résultats suspects (**Tableau A4-3**), l'ESEA 2 est déclaré stable.

Tableau A4-4 – Valeurs assignées

ESEA	ESEA 1	ESEA 2		
Analytes	« Blanc »	Dihydrostreptomycine (DHS)	Penicilline G	Sulfadiméthoxine
Valeurs assignées	Conforme	Suspect	Suspect	Suspect

Les résultats d'homogénéité et de stabilité sont en concordance avec les valeurs assignées de l'essai d'aptitude (Tableau A4-4).

A4-2 Exemple d'un EILA quantitatif

Afin d'illustrer l'approche de préparation d'un MCQ avec une durée de conservation, une étude de stabilité chronologique a été réalisée sur un muscle de porc contenant du chloramphénicol produit dans le cadre d'un EILA quantitatif.

Tableau A4-5 – Préparation d'un MCQ avec une durée de conservation

T ₀ - Résultats du test d'homogénéité (22/11/2016)			T _{stab} - Résultats du test de stabilité (27/01/2017)			T _{sup} - Résultats de l'échéance supplémentaire (15/03/2017)		
Code de l'unité	Valeur 1 µg/kg	Valeur 2 µg/kg	Code de l'unité	Valeur 1 µg/kg	Valeur 2 µg/kg	Code de l'unité	Valeur 1 µg/kg	Valeur 2 µg/kg
16MA-136	0,220	0,228	16MA-4	0,221	0,230	16MA-22	0,226	0,204
16MA-144	0,221	0,214	16MA-580	0,230	0,234	16MA-190	0,219	0,230
16MA-148	0,208	0,217	16MA-307	0,208	0,216	16MA-121	0,228	0,203
16MA-181	0,225	0,195	16MC-Labo A	0,170	0,167	Moy (n=6)	0,218	
16MA-205	0,212	0,208	16MC-Labo B	0,177	0,206	ET (n=6)	0,012	
16MA-211	0,204	0,219	16MC-Labo C	0,191	0,211			
16MA-246	0,226	0,208	16MC-Labo D	0,235	0,210			
16MA-417	0,214	0,209	16MC-Labo E	0,177	0,178			
16MA-477	0,208	0,216	16MC-Labo F	0,198	0,199			
16MA-488	0,219	0,203	16MC-Labo G	0,183	0,181			
Moy (n=20)	0,214		16MC-Labo H	0,197	0,175			
ET (n=20)	0,009		Moy (n=22)	0,200				
			ET (n=22)	0,022				

Trois échéances ont été évaluées : T₀ avec les résultats du test d'homogénéité, T_{stab} avec les résultats du LNR et des LO et T_{supp} avec les résultats complémentaires du LNR (Tableau A4-5).

Annexe 5 - Approches statistiques pour Régression Linéaire, Intervalle de Confiance, Prédiction de la durée de conservation

5.1) Régression Linéaire

Les formules de statistiques décrites dans cette annexe sont reprises de la norme ISO Guide 35 [12], annexe B, paragraphe B.3.

Le modèle de base utilisé est le modèle linéaire simple exprimé par l'équation :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon \quad \text{Équation 1}$$

ou β_0 et β_1 sont respectivement l'ordonnée à l'origine et la pente, ε désignant la composante d'erreur aléatoire qui est supposée généralement suivre une loi normale de moyenne=0 et de variance σ^2 .

Dans un ensemble de n couples y_i et x_i l'équation 1 devient :

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i \quad \text{Équation 2}$$

Pour ajuster le modèle, les paramètres peuvent-être estimés par les formules suivantes :

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Équation 3}$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad \text{Équation 4}$$

Avec b_0 et b_1 respectivement l'ordonnée- à l'origine et la pente estimée et \bar{x} et \bar{y} sont la moyenne des observations.

Les erreurs-types $s(b_1)$ et $s(b_0)$ sur les paramètres b_0 et b_1 sont calculées par les formules suivantes :

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Équation 5}$$

avec

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n-2} \quad \text{Équation 6}$$

et

$$s(b_0) = s(b_1) \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}} \quad \text{Équation 7}$$

Un examen visuel et la vérification des hypothèses permet de :

Vérifier les tendances (courbure, etc.) des résidus ($r_i = y_i - (b_0 + b_1 x_i)$) ;

Vérifier la normalité en préparant un tracé dit de (Q-Q plot) ;

Vérifier l'hétérogénéité de la dispersion des différents groupes, et de réaliser els test adéquats pour vérifier l'existence de cette hétérogénéité (test de Levène).

Pour évaluer l'existence d'une pente et donc une évolution statistiquement significative, le calcul de la statistique t est réalisé :

$$t_{b_1} = \frac{|b_1|}{s(b_1)} \quad \text{Équation 8}$$

Cette valeur est comparée à une valeur critique bilatérale du t de Student pour n-2 degrés de liberté avec un risque $\alpha=0.05$ ($t_{n-2, \frac{1-\alpha}{2}}$).

Si t_{b_1} est supérieur à $t_{n-2, \frac{1-\alpha}{2}}$ la pente est statistiquement différente de 0 avec un niveau de confiance de 95 %.

1) Intervalle de confiance

Une fois que les paramètres de la droite de régression ont été établis ils peuvent être utilisés pour fournir une estimation \hat{y} pour une valeur particulière de \hat{x} par l'équation :

$$\hat{y} = b_0 + b_1\hat{x} \quad \text{Équation 9}$$

Il est utile de calculer un intervalle de confiance pour la valeur prédite \hat{y} . Un intervalle de confiance bilatéral à un niveau de confiance de 95 % peut-être calculé par l'équation :

$$\hat{y} \pm t_{n-2, \frac{1-\alpha}{2}} s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\hat{x}-\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i-\bar{x})^2}} \quad \text{Équation 10}$$

Avec $(t_{n-2, \frac{1-\alpha}{2}})$ la valeur critique bilatérale du t de Student avec n-2 degrés de liberté.

2) Prédiction de la durée de conservation (Dc)

La durée de conservation d'un matériau va dépendre de l'existence d'une tendance linéaire positive ou négative et de sa limite acceptable pour pouvoir utiliser le matériau et conserver sa valeur nominale.

Sur la base de l'intervalle de confiance de 95 % pour les futures valeurs, en tenant compte de la tendance linéaire positive ou négative (par exemple vitesse de dégradation), la durée de conservation sera déterminée par le croisement d'une des limites de confiance (supérieure ou inférieure) et d'une IMA (voir **Figure 6** paragraphe 6.2.2 ou **Figure 9 Annexe 6**).

La durée de conservation (Dc) est obtenue, après avoir calculé l'intervalle de confiance, par les équations 11 et 12, et en tenant compte des limites respectivement inférieures et supérieures dénommés L_{inf} et L_{sup} . La durée de conservation prendra la valeur minimale de :

$$D_c = \min(t_{s,sup}, t_{s,inf})$$

$t_{s,sup}$ et $t_{s,inf}$ sont les plus petites solutions positives à :

$$L_{sup} - \left[b_0 + b_1 t_{s,sup} \pm t_{n-2, \frac{1-\alpha}{2}} s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(t_{s,sup}-\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i-\bar{x})^2}} \right] = 0 \quad \text{Équation 11}$$

$$L_{inf} - \left[b_0 + b_1 t_{s,inf} \pm t_{n-2, \frac{1-\alpha}{2}} s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(t_{s,inf}-\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i-\bar{x})^2}} \right] = 0 \quad \text{Équation 12}$$

Note 1 : les équations 11 et 12 ont au total 4 solutions réelles. Lorsqu'il n'existe pas de solution positive pour l'une de ces équations (par exemple, pour une dégradation statistiquement significative où les deux solutions positives proviennent de l'équation 12), les solutions négatives sont écartées. Seules des solutions positives doivent être utilisées.

Note 2 : les équations 11 et 12 peuvent être résolues de manière algébrique ou par itération.

Note 3 : si les limites de spécification sont trop proches l'une de l'autre (en particulier, si l'une des limites de spécification se situe à l'intérieur de l'intervalle donné par l'équation 10), il n'est pas possible de trouver une solution réelle.

Annexe 6 - Exemple d'estimation d'une durée de conservation du MCQ en fonction des IMA choisis pour 3 études pilotes

A6.1. Exemple d'estimation d'une durée de conservation d'un matériau de contrôle qualité de chloramphénicol dans le muscle de porc (cf. annexe 3 §A3.2)

Cet exemple présente l'analyse des données de l'**Annexe A4.2** d'un matériau de contrôle qualité de muscle de porc contenant du chloramphénicol.

Pour le MCQ chloramphénicol, l'IMA choisie correspond au cas n° 3 ($IMA=2*CV_{\text{homogénéité}}$) ce qui donne une valeur d'IMA de 9,4 %.

Analyse des données avec en T_{stab} les résultats du LNR et des LO (Figure 7)

En préalable au calcul de la durée de conservation, la normalité de la distribution et l'analyse de la variance ont été étudiés.

La normalité de la distribution a été vérifié avec le test de Anderson Darling :

- La distribution des données ne suit pas statistiquement une loi Normale.

L'homogénéité de la variance a été vérifié avec le test de Levène :

- L'homogénéité des variances ne peut pas être statistiquement acceptée (même après transformation logarithmique, cf. **Figure 7 b**).

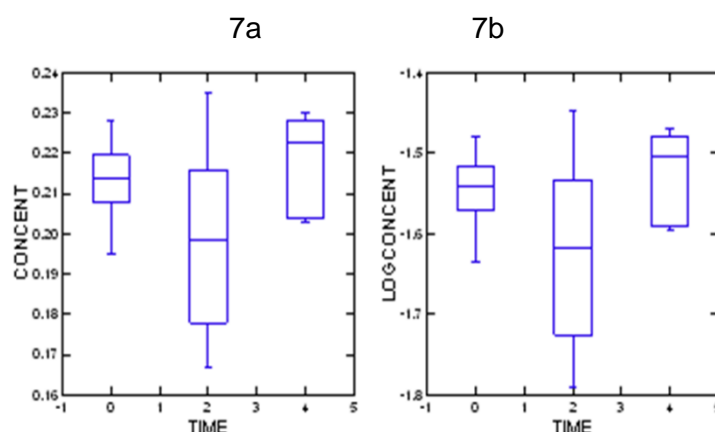


Figure 7 : Analyse des résultats du LNR et des LO ; Représentation graphique type Box-Plot

En conclusion, l'analyse est statistiquement non réalisable dû à un problème d'homogénéité des variances et de normalité. Il est donc impossible de déterminer statistiquement une durée de stabilité.

Analyse des données avec en T_{stab} les résultats seulement du LNR (Figure 8)

En préalable au calcul de la durée de conservation, la normalité de la distribution et l'analyse de la variance ont été étudiées.

La normalité de la distribution a été vérifiée avec le test de Anderson Darling et l'homogénéité de la variance a été vérifiée avec le test de Levène.

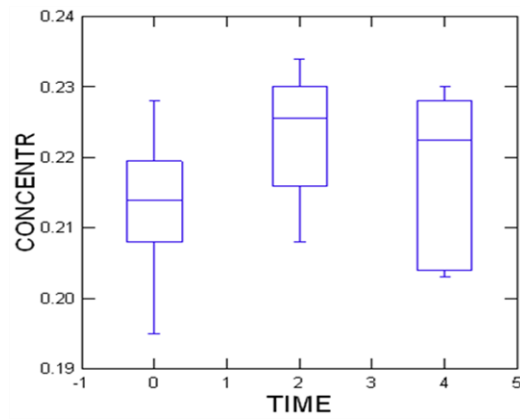


Figure 8 : Représentation graphique type Box-Plot des résultats du LNR seul

En conclusion, l'analyse statistique est réalisable avec les résultats du LNR seul.

Il est alors possible d'établir la régression linéaire et son intervalle de confiance entre les mesures obtenues à T_0 , T_{stab} et T_{sup} (**Figure 9**).

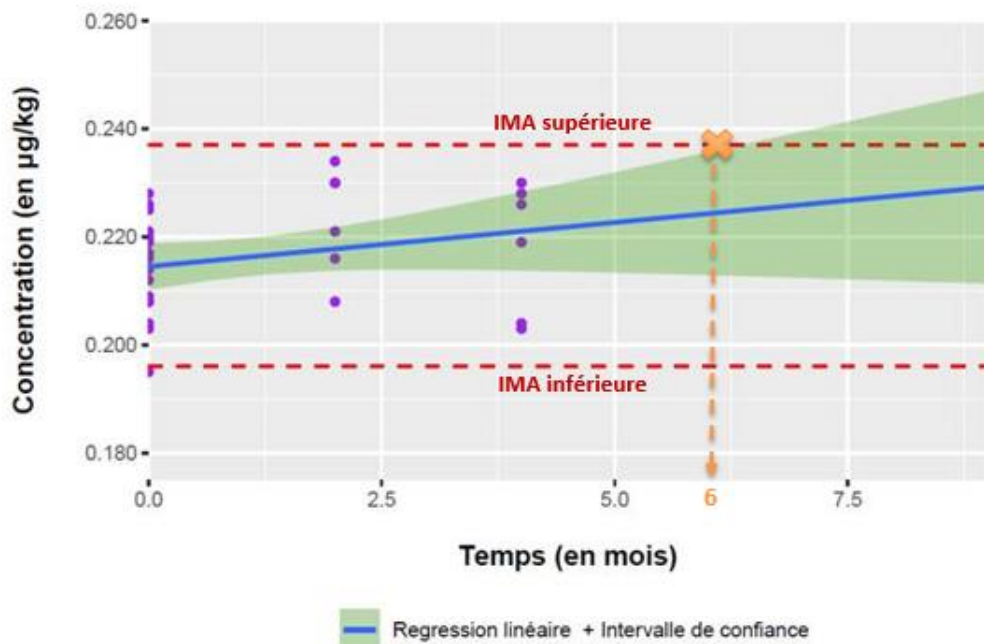


Figure 9 : Régression linéaire et intervalle de confiance obtenus pour le chloramphénicol dans le muscle de porc

La durée de conservation du MCQ chloramphénicol dans le muscle de porc est estimé à 6 mois en considérant une valeur d'IMA de 9,4 %.

A6.2. Exemple d'estimation d'une durée de conservation de matériaux de contrôle qualité avec un IMA défini par perception dans le domaine des biotoxines marines (cf. annexe 3 §A3.3)

Une étude de stabilité isochrone, menée par le LNR sur une durée de six semaines, a permis d'évaluer la stabilité de deux MCQ produits lors de l'EILA 2017 et de prédire leur durée de conservation. Le plan de stabilité retenu comprenait trois échéances (0, 3 et 6 semaines) avec à chaque fois, trois unités analysées en conditions de répétabilité (n=2). La température correspondant aux conditions de référence était de -80 °C et la température de stockage évaluée était de -20 °C. Au total, la stabilité de 11 toxines ou groupes de toxines contenues dans ces deux matériaux a été évaluée. Un IMA de 25 % a été défini par perception. 10 d'entre elles ont été déclarées stables au terme des 6 semaines. Après avoir vérifié la normalité et l'homogénéité de la variance des données, la durée de conservation a été prédite par extrapolation d'une régression linéaire modélisant la dégradation des composés d'intérêt (**Tableaux A6-1 et A6-2**).

Tableau A6-1 – Résultats en biotoxines marines pour le Matériau de Contrôle Qualité n°1

Toxine ou groupe de toxines	Valeur d'homogénéité (µg/kg)	Valeur moyenne stabilité à T0 (µg/kg)	Valeur moyenne stabilité à Tsup (µg/kg)	Valeur moyenne stabilité à Tstab (µg/kg)	Valeur assignée de l'EILA (µg/kg)	Limite basse IMA	Limite haute IMA	Conclusion stabilité à 6 semaines*	Durée de conservation prédite (semaines)
Acide okadaïque total	55,5	58,5	57,8	59,5	32,6	43,6	72,6	Stable	17
Somme acide okadaïque + dinophysistoxines + pecténotoxines	55,5	58,5	57,8	59,5	32,6	43,6	72,6	Stable	17
Yessotoxine	38,0	36,8	37,1	38,0	34,1	27,5	45,9	Stable	10
Somme des yessotoxines	38,0	36,8	37,1	38,0	34,1	27,5	45,9	Stable	10

*durée de la campagne EILA

Tableau A6-2 – Résultats en biotoxines marines pour le Matériau de Contrôle Qualité n°2

Toxine ou groupe de toxines	Valeur d'homogénéité (µg/kg)	Valeur moyenne stabilité à T0 (µg/kg)	Valeur moyenne stabilité à Tsup (µg/kg)	Valeur moyenne stabilité à Tstab (µg/kg)	Valeur assignée de l'EILA (µg/kg)	Limite basse IMA	Limite haute IMA	Conclusion stabilité à 6 semaines*	Durée de conservation prédite (semaines)
Acide okadaïque libre	31,6	19,6	19,6	20,7	25,1	14,6	24,3	Stable	10
Acide okadaïque total	275,7	188,7	187,1	199,6	185,0	139,8	233,0	Stable	12
Dinophysistoxine-2 libre	46,2	25,4	36,2	39,1	35,1	17,9	29,9	Instable	5
Dinophysistoxine-2 total	477,2	275,2	279,7	302,9	303,2	204,1	340,1	Stable	10
Somme acide okadaïque + dinophysistoxines + pecténotoxines	562,0	353,8	354,9	381,3	367,8	262,2	437,0	Stable	11
Yessotoxine	13,0	9,5	9,7	9,2	/(< LQ labos)	7,2	12,0	Stable	13
Somme des yessotoxines	13,0	9,5	9,7	9,2	/(< LQ labos)	7,1	11,9	Stable	13

*durée de la campagne EILA

Selon les toxines ou groupes de toxines, la durée de conservation était comprise entre 5 semaines (pour la toxine instable) et 17 semaines. À titre d'exemple, la **Figure 10** présente les résultats obtenus pour l'acide okadaïque total contenu dans le MCQ n°1.

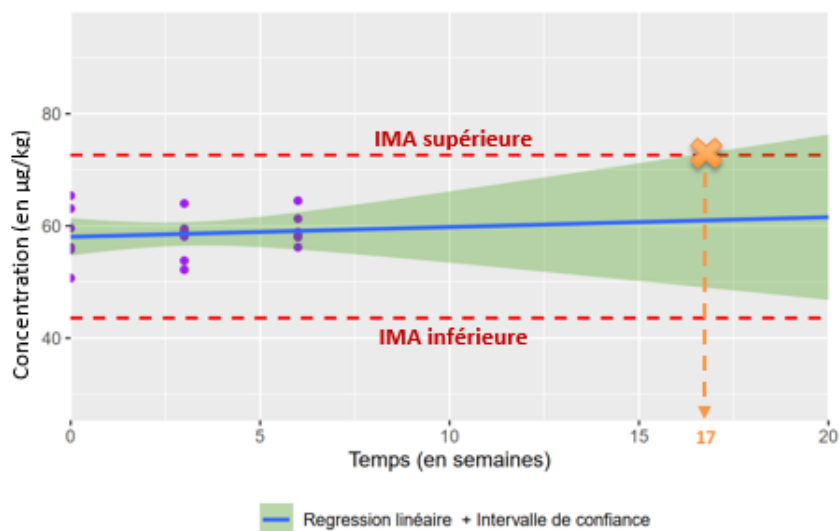


Figure 10 : régression linéaire obtenue à partir des résultats de stabilité isochrone pour l'acide okadaïque total présent dans le MCQ n°1 (points violets : données individuelles de stabilité ; trait bleu : régression linéaire ; zone verte : intervalle de confiance ; pointillés rouges : IMA ; croix orange : durée de conservation prédite).

Pour ce couple toxine/matériau de contrôle qualité, la durée de conservation prédite est de 17 semaines.

A6.3. Exemple d'estimation d'une durée de conservation de matériaux de contrôle qualité avec un IMA défini à partir du U_{mesure} de la méthode quantitative appliquée à la recherche des esters de stéroïdes dans la matrice poils (cf. annexe 3 §A3.1)

Contexte : Cet exemple d'estimation de la durée de conservation s'appuie sur les données de stabilité et d'homogénéité déterminées par le LNR pour l'essai d'aptitude réalisé fin 2015 pour la quantification des esters de stéroïdes dans la matrice poils. La testostérone benzoate et l'estradiol cypionate ont été ajoutés à une matrice exempte de promoteurs de croissance pour parvenir à des concentrations cibles de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ et $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ respectivement. L'analyse des esters de stéroïdes dans la matrice poils est réalisée par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide haute performance. Les valeurs des concentrations des deux analytes obtenues par le LNR aux trois échéances couvrant la durée de l'EILA ont permis de mettre en évidence la non stabilité de l'estradiol cypionate. Cet exemple se focalise donc sur la testostérone benzoate pour laquelle la stabilité et l'homogénéité ont pu être vérifiées.

Objectif : Il s'agit dans cet exemple d'estimer la durée de conservation du MCQ sur le paramètre de la testostérone benzoate à partir des données générées par l'EILA décrit ci-dessus en utilisant la fidélité intermédiaire obtenue lors de la validation de la méthode (équivalent au U_{mesure}) selon la décision 2002/657/CE [17]. Dans ce cas précis, la fidélité intermédiaire correspond à la valeur évaluée sur la première transition du composé lors de la validation de la méthode multi résidus.

Le CV de fidélité intermédiaire déterminé lors de la validation est égal à +9,4 % et correspond à l'IMA choisi. Les bornes de tolérances sont établies à partir de la valeur moyenne des concentrations mesurées à T_0 ($9,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$; $n=10$), pondérée par la valeur de la fidélité intermédiaire.

Les valeurs des concentrations en testostérone benzoate mesurées à T_0 , T_{stab} et T_{sup} sont présentées dans le **tableau A6-3**.

Tableau A6-3 – Concentrations en testostérone benzoate aux échéances T_0 , T_{stab} et T_{sup} dans les prélèvements de poils préparés dans le cadre de l'EILA en $\mu\text{g.kg}^{-1}$

T_0 Homogénéité (26/11/2015)		T_{stab} (21/12/2015)		T_{sup} (06/01/2016)	
Identification de l'échantillon	Concentration ($\mu\text{g/kg}$)	Identification de l'échantillon	Concentration ($\mu\text{g/kg}$)	Identification de l'échantillon	Concentration ($\mu\text{g/kg}$)
925	9,94	162	11,1	304	10,0
550	8,97	678	10,5	479	9,00
261	9,04	97	10,0	614	9,50
28	9,06	Moy (n=3)	10,5	Moy (n=3)	9,50
265	9,65	ET (n=3)	0,55	ET (n=3)	0,50
466	10,05				
353	10,05				
554	8,75				
216	9,65				
618	10,64				
Moy (n=10)	9,60				
ET (n=10)	0,60				

La représentation graphique présentée en **Figure 11** permet la détermination de la durée de conservation optimale des ESEA à partir de l'IMA, choisi ici comme étant égal à la fidélité intermédiaire déterminée lors de la validation de la méthode selon les critères de la décision 2022/657/CE.

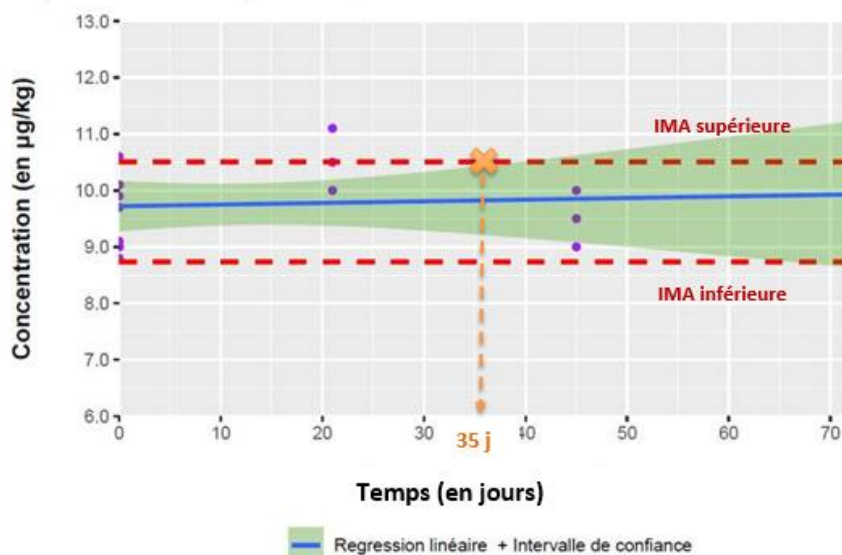


Figure 11 : Régression linéaire et intervalle de confiance obtenus pour la testostérone benzoate dans la matrice « poils » à partir de l'IMA= U_{mesure} de la méthode appliquée

Selon cette approche, en considérant comme IMA la fidélité intermédiaire déterminée lors de la validation de la méthode, la durée de conservation optimale des ESEA, préparés dans le cadre de l'EILA, pour la testostérone benzoate, est estimée à 35 jours.

Annexe 7 - Proposition de fiche descriptive d'un MCQ assorti d'une durée de conservation

MCQ « *Nom et numéro d'identification du MCQ* »

Produit par le LNR « *nom + adresse* »,

À partir d'ESEA issues de l'essai interlaboratoires « *nom de l'EILA* »

En date du « *jj/mm/aa* »

Caractéristiques du MCQ :

Matrice	
Analyte	
Valeur assignée (concentration de l'analyte)	
Incertitude élargie (optionnelle)	
Durée de conservation prédictive	
Commentaire	

La durée de conservation est une donnée prédictive qui n'engage pas la responsabilité du LNR.

A fortiori, le LNR décline toute responsabilité sur l'utilisation du MCQ au-delà de la durée de conservation.

Enfin, l'usage des MCQ avec durée de conservation est de la responsabilité de l'utilisateur et n'engage pas la responsabilité du LNR.

Bibliographie

- [1] JORF n°0086 du 12 avril 2023. Arrêté du 30 mars 2023 désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire. <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/jo/2023/04/12/0086>
- [2] ISO Guide 30:2015. Matériaux de référence - Termes et définitions choisis.
- [3] NF EN ISO/IEC 17025:2017. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
- [4] LAB REF 02 révision 14. Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/IEC 17025:2017. Comité Français d'Accréditation - Cofrac, Paris, France.
- [5] CE, 2004. Règlement (CE) n°882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux ; JOUE du 30.4.2004 ; L 165/1 (*abrogé par* Règlement (UE) 2017/625).
- [6] JO, 1979. Code Rural et de la Pêche Maritime ; articles R202-2 à 202-7 ; <https://www.codes-et-lois.fr/code-rural-et-de-la-peche-maritime/article-r202-2>
- [7] UE, 2017. Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques ; JOUE du 7.4.2017 ; L 95/1.
- [8] ISO Guide 80:2014 Lignes directrices pour la préparation interne des matériaux de référence utilisés pour le contrôle qualité.
- [9] NF ISO 13528:2022. Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires.
- [10] NF EN ISO 22117:2019. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Exigences spécifiques et recommandations relatives aux essais d'aptitude par comparaison interlaboratoires.
- [11] NF U47-400:2014. Méthodes d'analyse en santé animale - Guide pour l'organisation des essais interlaboratoires d'aptitude en santé animale.
- [12] ISO Guide 35:2017. Matériaux de référence - Lignes directrices pour la caractérisation et l'évaluation de l'homogénéité et la stabilité de la matière.
- [13] NF ISO 5725-2 :2020. Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 2 : méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.
- [14] Aquaref, 2006. Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau – Rapport AQUAREF 2006, 45 p. (Lardy-Fontan S. et al.). <https://www.aquaref.fr/lignes-directrices-conduite-validation-etudes-stabilite-parametres-physico-chimiques-domaine-eau>.
- [15] R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- [16] H. Wickham. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Second Edition. Springer, New York, USA. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>.
- [17] CE, 2002. Décision 2002/657/CE du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats ; JOUE du 17.8.2002 ; L 221/8 (décision abrogée, à partir d'avril 2021, pour partie, par le Règlement d'exécution (UE) 2021/808 du 22 mars 2021).