

RÈGLEMENT (UE) N° 519/2014 DE LA COMMISSION**du 16 mai 2014****modifiant le règlement (CE) n° 401/2006 en ce qui concerne les méthodes d'échantillonnage des grands lots, des épices et des compléments alimentaires, les critères de performance pour les toxines T-2 et HT-2 et pour la citrinine ainsi que les méthodes analytiques de dépistage****(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le 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 ⁽¹⁾, et notamment son article 11, paragraphe 4,

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (CE) n° 1881/2006 de la Commission ⁽²⁾ établit les limites maximales applicables à diverses mycotoxines dans certaines denrées alimentaires.
- (2) Le prélèvement d'échantillons a une influence essentielle sur la précision de la détermination des teneurs en mycotoxines, car celles-ci sont réparties de manière très hétérogène dans un lot. Il est par conséquent nécessaire d'établir les critères auxquels les modes de prélèvement d'échantillons doivent satisfaire.
- (3) Le règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission ⁽³⁾ établit les critères applicables au prélèvement d'échantillons pour le contrôle des teneurs en mycotoxines.
- (4) Il est nécessaire de modifier les règles relatives au prélèvement d'échantillons pour les épices afin de tenir compte des différences de dimension des particules, à l'origine d'une répartition hétérogène de la contamination aux mycotoxines des épices. En outre, il convient de fixer des règles pour l'échantillonnage des grands lots afin de garantir une application uniforme de la législation dans l'ensemble de l'Union. Il convient également de préciser quelle méthode de prélèvement d'échantillons doit être appliquée pour l'échantillonnage du jus de pomme.
- (5) Il est nécessaire de mettre à jour les critères de performance pour les toxines T-2 et HT-2 pour tenir compte des progrès scientifiques et technologiques. Il est nécessaire d'établir des critères de performance pour la citrinine, eu égard à la fixation d'une teneur maximale en citrinine pour les compléments alimentaires à base de riz fermenté avec de la levure rouge *Monascus purpureus*.
- (6) Les méthodes de dépistage sont de plus en plus utilisées pour l'analyse des mycotoxines. Il convient d'établir les critères auxquels les méthodes de dépistage doivent satisfaire pour être utilisées à des fins réglementaires.
- (7) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Le règlement (CE) n° 401/2006 est modifié comme suit:

1) l'annexe I est modifiée comme suit:

a) dans la partie B, la note de bas de page n° 1 est remplacée par le texte suivant:

«(1) L'échantillonnage de ce type de lots est effectué conformément aux règles énoncées dans la partie L. Des orientations sur l'échantillonnage des grands lots sont fournies dans un document qui est disponible sur le site web suivant: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>⁽¹⁾ JO L 165 du 30.4.2004, p. 1.⁽²⁾ Règlement (CE) n° 1881/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (JO L 364 du 20.12.2006, p. 5).⁽³⁾ Règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires (JO L 70 du 9.3.2006, p. 12).

Les règles d'échantillonnage prévues dans la norme ISO 24333:2009 ou celles de l'Association du commerce des grains et aliments du bétail ("GAFTA 124"), appliquées par les exploitants du secteur alimentaire pour assurer le respect des dispositions légales, équivalent aux règles d'échantillonnage énoncées dans la partie L.

En ce qui concerne l'échantillonnage de lots en vue du contrôle des toxines de *Fusarium*, les règles d'échantillonnage prévues dans la norme ISO 24333:2009 ou celles de l'Association du commerce des grains et aliments du bétail ("GAFTA 124"), appliquées par les exploitants du secteur alimentaire pour assurer le respect des dispositions légales, équivalent aux règles d'échantillonnage énoncées dans la partie B.»

b) dans la partie B.2, le tableau 1 est remplacé par le texte suivant:

«Tableau 1

Subdivision des lots en sous-lots en fonction du produit et du poids du lot

Produit	Poids du lot (en tonnes)	Poids ou nombre des sous-lots	Nombre d'échantillons élémentaires	Poids de l'échantillon global (en kg)
Céréales et produits céréaliers	> 300 et < 1 500	3 sous-lots	100	10
	≥ 50 et ≤ 300	100 tonnes	100	10
	< 50	—	3 - 100 (*)	1 - 10

(*) Selon le poids du lot — voir tableau 2.»

c) dans la partie B.3, la phrase suivante est ajoutée à la fin du premier tiret:

«Pour les lots de plus de 500 tonnes, le nombre d'échantillons élémentaires est déterminé à l'annexe I, partie L.2.»

d) dans la partie D.2, la phrase suivante est ajoutée après la première phrase:

«Ce mode de prélèvement est également à utiliser pour le contrôle officiel des teneurs maximales en ochratoxine A, en aflatoxine B1 et en aflatoxines totales fixées pour les épices à particules relativement grandes (d'une dimension comparable à celle des arachides ou d'une dimension supérieure, comparable à celle des noix muscades).»

e) dans la partie E, la première phrase est remplacée par le texte suivant:

«Ce mode de prélèvement est à utiliser pour le contrôle officiel des teneurs maximales en ochratoxine A, en aflatoxine B1 et en aflatoxines totales fixées pour les épices, sauf s'il s'agit d'épices à particules relativement grandes (répartition hétérogène de la contamination aux mycotoxines).»

f) dans la partie I, le titre et la première phrase sont remplacés par le texte suivant:

«I. MODE DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS POUR LES PRODUITS SOLIDES À BASE DE POMMES

Ce mode de prélèvement est à utiliser pour le contrôle officiel des teneurs maximales en patuline fixées pour les produits solides à base de pommes, y compris ceux destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge.»

g) dans la partie I.1, deuxième alinéa, les phrases suivantes sont supprimées:

«S'il s'agit de produits liquides, le lot est, dans la mesure du possible, soigneusement mélangé, soit par un procédé manuel, soit par un procédé mécanique, juste avant l'échantillonnage. Puisque, dans ce cas, la répartition de la patuline dans un lot donné peut être supposée homogène, il suffit dès lors de prélever trois échantillons élémentaires par lot pour constituer l'échantillon global.»

h) les parties L et M (nouvelles) figurant à l'annexe I du présent règlement sont ajoutées;

2) à l'annexe II, les points 4.2 «Exigences générales», 4.3 «Exigences spécifiques» et 4.4 «Estimation de l'incertitude de mesure, calcul du taux de récupération et enregistrement des résultats» sont remplacés par le texte figurant à l'annexe II du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Il s'applique à partir du 1^{er} juillet 2014.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 16 mai 2014.

Par la Commission
Le président
José Manuel BARROSO

ANNEXE I

«L. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE DES TRÈS GRANDS LOTS OU DES LOTS STOCKÉS OU TRANSPORTÉS DE TELLE MANIÈRE QU'IL EST IMPOSSIBLE DE PRÉLEVER DES ÉCHANTILLONS DANS L'ENSEMBLE DU LOT

L.1. **Principes généraux**

Si le mode de transport ou de stockage d'un lot ne permet pas que des échantillons élémentaires soient prélevés dans l'ensemble du lot, il est préférable que l'échantillonnage soit effectué lorsque le lot est en mouvement (échantillonnage dynamique).

Dans le cas des grands entrepôts destinés au stockage de denrées alimentaires, il convient d'encourager les opérateurs à installer dans l'entrepôt des équipements permettant de prélever (automatiquement) des échantillons dans l'ensemble du lot stocké.

Lorsque les procédures d'échantillonnage prévues dans la présente partie (partie L) sont appliquées, l'exploitant du secteur alimentaire ou son représentant devraient en être informés. Si l'exploitant du secteur alimentaire ou son représentant remettent en cause la procédure d'échantillonnage, ils doivent permettre à l'autorité compétente de prélever des échantillons dans l'ensemble du lot, à leurs propres frais.

L'échantillonnage d'une partie du lot est autorisé, à condition que la quantité de la partie échantillonnée représente au moins 10 % du lot à échantillonner. Si l'échantillonnage d'une partie d'un lot de denrées alimentaires appartenant à la même catégorie ou correspondant à la même description permet de constater que cette partie du lot ne satisfait pas aux exigences de l'Union, la totalité du lot est réputée non conforme, sauf si un examen plus poussé ne révèle aucun indice de non-conformité du reste du lot.

Les dispositions pertinentes concernant, par exemple, le poids de l'échantillon élémentaire, énoncées dans les autres parties de la présente annexe, s'appliquent à l'échantillonnage des très grands lots et des lots stockés ou transportés de telle manière qu'il est impossible de prélever des échantillons dans l'ensemble du lot.

L.2. **Nombre d'échantillons élémentaires à prélever dans le cas de très grands lots**

Dans le cas de portions échantillonnées de grande taille (> 500 tonnes), le nombre d'échantillons élémentaires à prélever = 100 échantillons élémentaires + $\sqrt{\text{tonnes}}$. Néanmoins, si le lot pèse moins de 1 500 tonnes et peut être subdivisé en sous-lots conformément au tableau 1 de la partie B et si les sous-lots peuvent être séparés physiquement, le nombre d'échantillons élémentaires à prélever est celui prévu dans la partie B.

L.3. **Grands lots transportés par navire**

L.3.1. *Échantillonnage dynamique de grands lots transportés par navire*

L'échantillonnage de grands lots transportés par navire est effectué de préférence lorsque le produit est en mouvement (échantillonnage dynamique).

L'échantillonnage doit être fait par cale (entité qui peut être physiquement séparée). Néanmoins, les cales sont vidées partiellement l'une après l'autre, de sorte que la séparation physique initiale n'existe plus après le transfert dans les installations de stockage. L'échantillonnage peut donc être réalisé sur la base de la séparation physique initiale ou sur la base de la séparation après transfert dans les installations de stockage.

Le déchargement d'un navire peut durer plusieurs jours. Normalement, l'échantillonnage doit être effectué à intervalles réguliers pendant la durée entière du déchargement. Toutefois, il n'est pas toujours possible ou opportun qu'un inspecteur officiel soit présent lors de l'échantillonnage pendant toute l'opération de déchargement. Par conséquent, la réalisation d'un échantillonnage sur une partie (portion échantillonnée) du lot est autorisée. Le nombre d'échantillons élémentaires est fonction de la taille de la portion échantillonnée.

Même si l'échantillon officiel est prélevé automatiquement, la présence d'un inspecteur est requise. Néanmoins, si l'échantillonnage automatique est effectué selon des paramètres préétablis qui ne peuvent être modifiés durant l'échantillonnage et si les échantillons élémentaires sont collectés dans un réceptacle scellé empêchant toute fraude, la présence d'un inspecteur n'est requise qu'au début de l'échantillonnage, chaque fois que le réceptacle contenant les échantillons doit être changé et à la fin de l'échantillonnage.

L.3.2. *Échantillonnage statique de lots transportés par navire*

Si l'échantillonnage est effectué de façon statique, la procédure prévue pour les installations de stockage (silos) accessibles par le haut doit être appliquée (voir le point L.5.1).

L'échantillonnage doit être effectué sur la partie accessible (par le haut) du lot/de la cale. Le nombre d'échantillons élémentaires est fonction de la taille de la portion échantillonnée.

L.4. Échantillonnage de grands lots stockés dans des entrepôts

L'échantillonnage doit être effectué sur la partie accessible du lot. Le nombre d'échantillons élémentaires est fonction de la taille de la portion échantillonnée.

L.5. Échantillonnage dans des installations de stockage (silos)**L.5.1. Échantillonnage dans des silos (facilement) accessibles par le haut**

L'échantillonnage doit être effectué sur la partie accessible du lot. Le nombre d'échantillons élémentaires est fonction de la taille de la portion échantillonnée.

L.5.2. Échantillonnage dans des silos inaccessibles par le haut (silos fermés)**L.5.2.1. Silos inaccessibles par le haut (silos fermés) d'une capacité supérieure à 100 tonnes**

Les denrées alimentaires entreposées dans des silos de ce type ne peuvent faire l'objet d'un échantillonnage statique. Par conséquent, lorsque les denrées alimentaires entreposées dans le silo doivent faire l'objet d'un échantillonnage et qu'il n'est pas possible de déplacer le lot, il doit être convenu avec l'opérateur qu'il informe l'inspecteur du moment où le silo sera déchargé, partiellement ou entièrement, afin de permettre l'échantillonnage des denrées alimentaires en mouvement.

L.5.2.2. Silos inaccessibles par le haut (silos fermés) d'une capacité inférieure à 100 tonnes

Contrairement à ce qui est prévu au point L.1 (partie échantillonnée d'au moins 10 %), la procédure d'échantillonnage consiste à transférer dans un réceptacle une quantité comprise entre 50 et 100 kg et à y prélever l'échantillon. La taille de l'échantillon global correspond au lot entier et le nombre d'échantillons élémentaires dépend de la quantité de denrées alimentaires transférée du silo vers le réceptacle en vue de l'échantillonnage.

L.6. Échantillonnage de denrées alimentaires en vrac dans de grands conteneurs fermés

Il est fréquent que de tels lots ne puissent faire l'objet d'un échantillonnage que quand ils sont déchargés. Dans certains cas, il est impossible de décharger ce type de conteneurs au point d'importation ou de contrôle; c'est pourquoi l'échantillonnage devrait avoir lieu lorsqu'ils sont déchargés. L'opérateur doit informer l'inspecteur du lieu et du moment du déchargement des conteneurs.

M. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE DES COMPLÉMENTS ALIMENTAIRES À BASE DE RIZ FERMENTÉ AVEC DE LA LEVURE ROUGE *MONASCUS PURPUREUS*

Ce mode de prélèvement est à utiliser pour le contrôle officiel de la teneur maximale en citrinine fixée pour les compléments alimentaires à base de riz fermenté avec de la levure rouge *Monascus purpureus*.

Procédure d'échantillonnage et taille de l'échantillon

La procédure d'échantillonnage est fondée sur la supposition que les compléments alimentaires à base de riz fermenté avec de la levure rouge *Monascus purpureus* sont commercialisés dans des emballages de vente contenant d'ordinaire de 30 à 120 capsules par emballage.

Taille de l'échantillon (nombre d'emballages de vente)	Nombre d'emballages de vente à prélever	Taille de l'échantillon
1 - 50	1	Toutes les capsules
51 - 250	2	Toutes les capsules
251 - 1 000	4	La moitié des capsules de chaque emballage de vente prélevé
> 1 000	4 + 1 emballages de vente par 1 000 embal- lages de vente, sans dépasser 25 emballages de vente	≤ 10 emballages de vente: la moitié des capsules de chaque emballage de vente > 10 emballages de vente: un nombre égal de capsules de chaque emballage de vente pour aboutir à un échan- tillon équivalant au contenu de 5 emballages de vente»

ANNEXE II

«4.2. Exigences générales

Les méthodes analytiques de confirmation utilisées pour le contrôle des denrées alimentaires doivent satisfaire aux dispositions de l'annexe III, points 1 et 2, du règlement (CE) n° 882/2004.

4.3. Exigences spécifiques

4.3.1. Exigences spécifiques pour les méthodes de confirmation

4.3.1.1. Critères de performance

L'utilisation de méthodes de confirmation entièrement validées (à savoir les méthodes validées au moyen d'études collaboratives portant sur les matrices pertinentes) est recommandée lorsque ces méthodes conviennent et sont disponibles. D'autres méthodes de confirmation validées et appropriées (telles les méthodes validées en interne sur des matrices pertinentes appartenant au groupe de produits considéré) peuvent également être utilisées, à condition qu'elles satisfassent aux critères de performance énoncés dans les tableaux figurant ci-après.

Si possible, la validation des méthodes validées en interne doit se faire au moyen d'un matériau de référence certifié.

a) Critères de performance pour les aflatoxines

Critère	Plage de concentration	Valeur recommandée	Valeur maximale autorisée
Valeurs à blanc	Toutes	Négligeable	—
Récupération — Aflatoxine M1	0,01 - 0,05 µg/kg	60 à 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 à 110 %	
Récupération — Aflatoxines B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50 à 120 %	
	1 - 10 µg/kg	70 à 110 %	
	> 10 µg/kg	80 à 110 %	
Reproductibilité RSD _R	Toutes	Dérivée de l'équation de Horwitz (*) (**)	2 × la valeur dérivée de l'équation de Horwitz (*) (**)

On peut calculer la répétabilité RSD_r en multipliant par 0,66 la reproductibilité RSD_R à la concentration présentant un intérêt.

Note:

- Valeurs à appliquer à la fois à B₁ et à la somme de B₁ + B₂ + G₁ + G₂.
- Si les sommes des différentes aflatoxines B₁ + B₂ + G₁ + G₂ doivent être enregistrées, la réponse de chacune d'elles au système d'analyse doit être connue ou équivalente.

b) Critères de performance pour l'ochratoxine A

Teneur µg/kg	Ochratoxine A		
	RSD _r %	RSD _R %	Récupération %
< 1	≤ 40	≤ 60	De 50 à 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	De 70 à 110

c) Critères de performance pour la patuline

Teneur µg/kg	Patuline		
	RSD _r %	RSD _R %	Récupération %
< 20	≤ 30	≤ 40	De 50 à 120
20 — 50	≤ 20	≤ 30	De 70 à 105
> 50	≤ 15	≤ 25	De 75 à 105

d) Critères de performance pour le désoxynivalénol

Teneur µg/kg	Désoxynivalénol		
	RSD _r %	RSD _R %	Récupération %
> 100 — ≤ 500	≤ 20	≤ 40	De 60 à 110
> 500	≤ 20	≤ 40	De 70 à 120

e) Critères de performance pour la zéaralénone

Teneur µg/kg	Zéaralénone		
	RSD _r %	RSD _R %	Récupération %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	De 60 à 120
> 50	≤ 25	≤ 40	De 70 à 120

f) Critères de performance pour les fumonisines B₁ et B₂ prises séparément

Teneur µg/kg	Fumonisines B ₁ et B ₂ prises séparément		
	RSD _r %	RSD _R %	Récupération %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	De 60 à 120
> 500	≤ 20	≤ 30	De 70 à 110

g) Critères de performance pour les toxines T-2 et HT-2 prises séparément

Teneur µg/kg	Toxines T-2 et HT-2 prises séparément		
	RSD _r %	RSD _R %	Récupération %
15-250	≤ 30	≤ 50	De 60 à 130
> 250	≤ 25	≤ 40	De 60 à 130

h) Critères de performance pour la citrinine

Teneur µg/kg	Citrinine			Récupération %
	RSD _r %	RSD _R recommandé %	RSD _R maximal autorisé %	
Toutes	0,66 × RSD _R	Dérivée de l'équation de Horwitz (*) (**)	2 × la valeur dérivée de l'équation de Horwitz (*) (**)	De 70 à 120

i) Notes concernant les critères de performance pour les mycotoxines:

- Les limites de détection des méthodes utilisées ne sont pas indiquées, étant donné que les valeurs relatives à la fidélité sont données pour les concentrations présentant un intérêt.
- Les valeurs relatives à la fidélité sont calculées à partir de l'équation de Horwitz, en particulier à partir de l'équation initiale de Horwitz (pour les concentrations $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) et à partir de l'équation modifiée de Horwitz (pour les concentrations $C < 1,2 \times 10^{-7}$) (**).

(*) Équation de Horwitz pour les concentrations $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

(réf.: W. Horwitz, L.R. Kamps et K.W. Boyer, *J. Assoc. Off. Analy. Chem.*, 1980, 63, 1344)

(**) Équation modifiée de Horwitz (*) pour les concentrations $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$RSD_R = 22 \%$$

(réf.: M. Thompson, *Analyst*, 2000, 125, p. 385-386)

équation dans laquelle:

- RSD_R est l'écart type relatif calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité $[(s_R) \times 100]$,
- C est le taux de concentration (c'est-à-dire 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Il s'agit d'une équation générale relative à la fidélité dont il a été constaté qu'elle est indépendante de l'analyte et de la matrice et uniquement dépendante de la concentration pour la plupart des méthodes d'analyse de routine.

4.3.1.2. Adaptation à l'usage prévu

Il est permis d'adopter une démarche fondée sur l'adaptation à l'usage prévu (***) pour évaluer si les méthodes validées en interne peuvent servir de méthodes de remplacement aux fins du contrôle officiel. Les méthodes retenues aux fins du contrôle officiel doivent produire des résultats dont l'incertitude de mesure normalisée (u) est inférieure à l'incertitude de mesure normalisée maximale, laquelle est calculée au moyen de la formule suivante:

$$Uf = \sqrt{(\text{LOD}/2)^2 + (\alpha \times C)^2}$$

où:

- Uf est l'incertitude de mesure normalisée maximale ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- LOD est la limite de détection que permet d'atteindre la méthode ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- α est un facteur numérique constant dépendant de la valeur de C. Les valeurs à utiliser sont indiquées dans le tableau ci-après,
- C est la concentration présentant un intérêt ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Si la méthode d'analyse donne des résultats présentant des mesures d'incertitude inférieures à l'incertitude normalisée maximale, la méthode est réputée aussi valable qu'une méthode satisfaisant aux critères de performance énoncés au point 4.3.1.1.

Tableau

Valeurs numériques correspondant à la constante α dans la formule énoncée au présent point, en fonction de la concentration présentant un intérêt

C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	α
≤ 50	0,2
51 - 500	0,18
501 - 1 000	0,15
1 001 - 10 000	0,12
$> 10 000$	0,1

(***) Réf. M. Thompson et R. Wood, *Accred. Qual. Assur.*, 2006, 10, p. 471-478.

4.3.2. Exigences spécifiques pour les méthodes de dépistage semi-quantitatives

4.3.2.1. Champ d'application

Les exigences s'appliquent aux méthodes bioanalytiques fondées sur l'immunorecognition ou la fixation à un récepteur (ELISA, bandelettes réactives, dispositifs à flux latéral, immunodétecteurs, etc.) et aux méthodes physico-chimiques fondées sur la chromatographie ou la détection directe par spectrométrie de masse (SM en milieu ambiant, par exemple). Les autres méthodes (telle la chromatographie sur couche mince) ne sont pas exclues si les signaux émis se rapportent directement aux mycotoxines considérées et permettent que le principe décrit ci-dessous soit applicable.

Les exigences spécifiques s'appliquent aux méthodes donnant comme résultat de la mesure une valeur numérique [réponse (relative) d'un lecteur de bandelettes réactives, signal du couplage de la chromatographie en phase liquide (CL) et de la spectrométrie de masse, etc.] et auxquelles s'appliquent les règles statistiques ordinaires.

Les exigences ne s'appliquent pas aux méthodes qui ne donnent pas des valeurs numériques (mais se limitent, par exemple, à signaler la présence ou l'absence), lesquelles requièrent d'autres modes de validation. Les exigences spécifiques applicables à ces méthodes sont énoncées au point 4.3.3.

Le présent document décrit les procédures de validation des méthodes de dépistage par validation interlaboratoire, de vérification de la performance d'une méthode validée au terme d'un exercice interlaboratoire et de validation monolaboratoire d'une méthode de dépistage.

4.3.2.2. Terminologie

Concentration cible du dépistage (STC): la concentration présentant un intérêt pour la détection de la mycotoxine dans un échantillon. Lorsqu'il s'agit de vérifier le respect des limites réglementaires, la STC est égale à la teneur maximale applicable. Si l'objectif est autre ou si aucune teneur maximale n'est fixée, la STC est prédéfinie par le laboratoire.

Méthode de dépistage: la méthode servant à sélectionner, avec un degré de certitude donné, les échantillons dont la teneur en mycotoxines dépasse la concentration cible du dépistage (STC). Pour le dépistage des mycotoxines, une certitude de 95 % est considérée comme adaptée à l'usage prévu. Le résultat du dépistage est soit "négatif", soit "suspect". Les méthodes de dépistage doivent offrir une grande capacité de traitement d'échantillons à la fois efficace et économique, augmentant les chances de découvrir de nouveaux cas d'exposition élevée des consommateurs et de risques pour leur santé. Ces méthodes sont fondées sur des méthodes de bioanalyse, de CL-SM ou de CLHP. Les résultats dépassant la valeur seuil doivent être vérifiés; à cet effet, l'échantillon original est soumis à une nouvelle analyse complète réalisée au moyen d'une méthode de confirmation.

Échantillon négatif: un échantillon dont la teneur en mycotoxine est inférieure à la STC avec une certitude de 95 % (ce niveau de certitude signifie qu'il y a 5 % de risque que l'échantillon ait été déclaré erronément négatif).

Échantillon faussement négatif ou faux négatif: un échantillon dont la teneur en mycotoxine est supérieure à la STC, mais qui a été déclaré négatif.

Échantillon suspect: un échantillon qui dépasse la valeur seuil (voir infra) et dont la teneur en mycotoxine peut être supérieure à la STC. Tout échantillon suspect est soumis à une analyse de confirmation qui doit permettre d'identifier et de quantifier avec précision la mycotoxine.

Échantillon faussement suspect: un échantillon négatif déclaré suspect.

Méthodes de confirmation: les méthodes qui fournissent des informations complètes ou complémentaires permettant l'identification de la mycotoxine et sa quantification univoque au niveau considéré.

Valeur seuil: la réaction, le signal ou la concentration, obtenus au moyen de la méthode de dépistage, au-dessus desquels l'échantillon est réputé suspect. Le seuil est déterminé pendant la validation, compte tenu de la variabilité de la mesure.

Échantillon témoin (blanc de matrice) négatif: un échantillon dont on sait qu'il est exempt ⁽¹⁾ de la mycotoxine à dépister à la suite, par exemple, d'une détermination antérieure réalisée au moyen d'une méthode de confirmation d'une sensibilité suffisante. Si aucun échantillon témoin ne peut être obtenu, le matériau présentant la teneur la plus basse possible peut être utilisé aussi longtemps que la teneur permet de conclure que la méthode de dépistage est adaptée à sa destination.

Échantillon témoin positif: un échantillon contenant la mycotoxine à la concentration cible du dépistage, par exemple un matériau de référence certifié, un matériau dont le contenu est connu (un matériau d'essai provenant d'essais d'aptitude, par exemple) ou un matériau ayant été suffisamment caractérisé au moyen d'une méthode de confirmation. Faute d'un tel échantillon, il s'agit d'un mélange d'échantillons présentant des niveaux de contamination différents ou d'un échantillon enrichi préparé en laboratoire et suffisamment caractérisé, à condition qu'il puisse être prouvé que le niveau de contamination a été vérifié.

4.3.2.3. Procédure de validation

La validation vise à démontrer que la méthode de dépistage est adaptée à l'usage auquel elle est destinée. Elle se fait par détermination de la valeur seuil et par détermination du taux d'échantillons faussement négatifs et d'échantillons faussement suspects. Des caractéristiques de la performance telles que la sensibilité, la sélectivité et la fidélité sont inhérentes à ces deux paramètres.

Les méthodes de dépistage peuvent faire l'objet d'une validation interlaboratoire ou monolaboratoire. Si les données d'une validation interlaboratoire d'une méthode sont déjà disponibles pour une combinaison mycotoxine/matrice/STC donnée, un laboratoire appliquant la méthode pourra se contenter de vérifier les performances de celle-ci.

4.3.2.3.1. Validation initiale par validation monolaboratoire

Mycotoxines

La validation doit être faite pour chaque mycotoxine concernée. Si des méthodes de bioanalyse produisent une réponse combinée pour un groupe donné de mycotoxines (les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ et les fumonisines B₁ et B₂, par exemple), leur applicabilité doit être démontrée et les limites de l'essai doivent être mentionnées dans la définition du champ d'application de la méthode. La réactivité croisée non souhaitée (réaction, par exemple, du déoxynivalénol-3-glycoside, du 3-acétyldéoxynivalénol ou du 15-acétyldéoxynivalénol aux méthodes immunologiques de dépistage du déoxynivalénol) ne devrait pas augmenter le taux d'échantillons faussement négatifs pour les mycotoxines ciblées, mais elle pourrait augmenter le taux d'échantillons faussement suspects. La réalisation d'analyses de confirmation visant à identifier et à quantifier précisément les mycotoxines devrait limiter cette augmentation indésirable.

Matrices

Une validation initiale devrait être réalisée pour chaque produit ou, lorsqu'il est avéré que la méthode est utilisable pour des produits multiples, pour chaque groupe de produits. Dans le second cas, un produit représentatif et présentant un intérêt est sélectionné dans le groupe concerné (voir ci-après tableau A).

Ensemble d'échantillons

Le nombre minimal d'échantillons requis en vue de la validation est fixé à 20 échantillons témoins négatifs homogènes et à 20 échantillons témoins positifs homogènes contenant la mycotoxine à la STC, analysés dans des conditions de fidélité intermédiaire (RSD_R) pendant une période s'étalant sur cinq jours. Facultativement, des ensembles supplémentaires de 20 échantillons dans lesquels la mycotoxine est présente à des teneurs différentes peuvent être ajoutés à l'ensemble constitué pour la validation, pour que l'on puisse se faire une idée de la plage dans laquelle la méthode permet de discriminer les différentes concentrations de la mycotoxine.

Concentration

La méthode doit être validée pour chaque STC à utiliser lors des applications de routine.

4.3.2.3.2. Validation initiale au moyen d'études collaboratives

La validation au moyen d'études collaboratives doit se faire conformément à un protocole des essais collaboratifs internationalement reconnu (par exemple la norme ISO 5725:1994 ou le protocole international harmonisé de l'UICPA) qui requiert l'utilisation des données valides d'au moins huit laboratoires. Par ailleurs, la seule différence par rapport aux validations monolaboratoires réside dans le fait que les ≥ 20 échantillons par produit/teneur peuvent être répartis également entre les laboratoires participants, chaque laboratoire recevant au minimum deux échantillons.

⁽¹⁾ Un échantillon est considéré comme exempt de l'analyte si la quantité présente dans l'échantillon ne dépasse pas un cinquième de la STC. Si la teneur peut être quantifiée au moyen d'une méthode de confirmation, elle doit être prise en compte lors de l'examen de validation.

4.3.2.4. Détermination de la valeur seuil et du taux de résultats faussement suspect des échantillons blancs

Les réponses (relatives) concernant les échantillons témoins négatifs et positifs servent de base de calcul des paramètres requis.

Méthodes de dépistage à réponse proportionnelle à la concentration de la mycotoxine

La formule suivante s'applique aux méthodes de dépistage à réponse proportionnelle à la concentration de la mycotoxine:

$$\text{Valeur seuil} = R_{\text{STC}} - \text{valeur } t_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

R_{STC} = réponse moyenne des échantillons témoins positifs (à la STC)

valeur t: valeur t unicaudale pour un taux de résultats faussement négatifs de 5 % (voir tableau B ci-après)

SD_{STC} = écart-type Méthodes de dépistage à réponse inversement proportionnelle à la concentration de la mycotoxine

Par analogie, pour les méthodes de dépistage à réponse inversement proportionnelle à la concentration de la mycotoxine, la valeur seuil est déterminée comme suit:

$$\text{Valeur seuil} = R_{\text{STC}} + \text{valeur } t_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

Si l'on utilise cette valeur t spécifique pour déterminer la valeur seuil, le taux de résultats faussement négatifs est fixé par défaut à 5 %.

Évaluation de l'adaptation à l'usage

Les résultats relatifs aux échantillons témoins négatifs servent à estimer le taux correspondant de résultats faussement suspects. La valeur t calculée correspond au cas où le résultat d'un échantillon témoin négatif est supérieur à la valeur seuil et donc erronément considéré comme suspect.

Valeur t = $\frac{\text{valeur seuil} - \text{moyenne}_{\text{blanc}}}{SD_{\text{blanc}}}$ dans les méthodes de dépistage à réponse proportionnelle à la concentration de la mycotoxine

ou

valeur t = $\frac{\text{moyenne}_{\text{blanc}} - \text{valeur seuil}}{SD_{\text{blanc}}}$ dans les méthodes de dépistage à réponse inversement proportionnelle à la concentration de la mycotoxine

À partir de la valeur t obtenue sur la base des degrés de liberté calculés à partir du nombre d'expériences, la probabilité d'échantillons faussement suspects dans une distribution unicaudale peut être calculée (fonction TDIST de la feuille de calcul, par exemple) ou trouvée dans un tableau relatif à la distribution de t.

La valeur correspondante de la distribution unicaudale de t indique le taux de résultats faussement suspects.

Ce concept est décrit en détail, exemple à l'appui, dans *Analytical and Bioanalytical Chemistry* DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5. Extension du champ d'application de la méthode

4.3.2.5.1. Extension du champ d'application à d'autres mycotoxines

Lorsque le champ d'application d'une méthode de dépistage existante est étendu à d'autres mycotoxines, la validité de la méthode doit être démontrée au moyen d'une validation complète.

4.3.2.5.2. Extension du champ d'application à d'autres produits

S'il est avéré ou probable que la méthode de dépistage est applicable à d'autres produits, sa validité doit être vérifiée pour ces autres produits. Si le nouveau produit appartient à un groupe de produits (voir tableau A ci-après) pour lequel la méthode a déjà fait l'objet d'une validation initiale, la réalisation d'une validation supplémentaire limitée est suffisante. À cet effet, un minimum de 10 échantillons témoins négatifs homogènes et de 10 échantillons témoins positifs homogènes (à la STC) doivent être analysés dans des conditions de fidélité intermédiaire. Les échantillons témoins positifs doivent tous présenter des valeurs dépassant la valeur seuil. Si ce critère n'est pas rempli, une validation complète est requise.

4.3.2.6. Vérification de méthodes déjà validées au moyen d'études collaboratives

La performance des méthodes de dépistage déjà validées au moyen d'une étude collaborative doit être vérifiée. À cet effet, un minimum de 6 échantillons témoins négatifs et de 6 échantillons témoins positifs (à la STC) doivent être analysés. Les échantillons témoins positifs doivent tous présenter des valeurs dépassant la valeur seuil. Si ce critère n'est pas rempli, le laboratoire doit réaliser une analyse des causes profondes de cette situation afin de déceler pourquoi il ne peut pas répéter le résultat obtenu lors de l'étude collaborative. Après avoir pris les mesures correctrices nécessaires, le laboratoire doit revérifier la performance de la méthode en interne. Si le laboratoire n'est pas capable de vérifier les résultats de l'étude collaborative, il doit établir sa propre valeur seuil dans le cadre d'une validation monolaboratoire complète.

4.3.2.7. Vérification/validation continue de la méthode

Après validation initiale de la méthode, le laboratoire collecte des données de validation supplémentaires en joignant au moins deux échantillons témoins positifs à chaque lot d'échantillons soumis à un dépistage. L'un des échantillons témoins positifs est un échantillon connu (un échantillon utilisé, par exemple, lors de la validation initiale) et l'autre provient d'un produit différent appartenant au même groupe de produits (si l'analyse porte sur un seul produit, l'échantillon consiste en un autre échantillon de ce produit). Un échantillon témoin négatif peut également être joint. Les résultats obtenus pour les deux échantillons témoins positifs sont ajoutés aux données de validation existantes.

La valeur seuil est reprécisée et la validité de la méthode est réexaminée au moins une fois par an. La vérification continue de la méthode vise plusieurs objectifs:

- assurer le contrôle qualité du lot d'échantillons soumis à un dépistage,
- fournir des informations sur la robustesse de la méthode dans les conditions prévalant dans le laboratoire appliquant la méthode,
- démontrer l'applicabilité de la méthode aux différents produits,
- permettre une adaptation des valeurs seuils en cas de dérive graduelle au fil du temps.

4.3.2.8. Rapport de validation

Le rapport de validation doit comporter:

- une partie consacrée à la STC,
- une partie consacrée à la valeur seuil atteinte,

Note: La valeur seuil doit comporter le même nombre de chiffres significatifs que la STC. Les valeurs numériques servant à calculer la valeur seuil doivent avoir au moins un chiffre significatif de plus que la STC.

- une partie consacrée au taux calculé d'échantillons faussement suspects,
- une partie portant sur la manière dont le taux d'échantillons faussement suspects a été établi.

Note: La partie du rapport consacrée au taux calculé d'échantillons faussement suspects mentionne si la méthode est adaptée à l'usage prévu alors qu'elle précise le nombre d'échantillons blancs (ou présentant un faible niveau de contamination) qui seront soumis à une vérification.

Tableau A

Groupes de produits entrant en considération pour la validation des méthodes de dépistage

Groupes de produits	Catégories de produits	Produits représentatifs de la catégorie
Forte teneur en eau	Jus de fruit	Jus de pomme, jus de raisin
	Boissons alcoolisées	Vin, bière, cidre
	Légumes-racines et légumes-tubercules	Gingembre frais
	Purées à base de céréales ou de fruits	Purées destinées aux nourrissons et aux enfants en bas âge

Groupes de produits	Catégories de produits	Produits représentatifs de la catégorie
Forte teneur en huile	Fruits à coque	Noix communes, noisettes, châtaignes
	Graines oléagineuses et produits dérivés	Graines de colza, graines de tournesol, graines de coton, fèves de soja, arachides, graines de sésame, etc.
	Fruits oléagineux et produits dérivés	Huiles et pâtes (beurre d'arachide et tahini, par exemple)
Forte teneur en fécule et/ou protéines et faible teneur en eau et en matières grasses	Céréales et produits dérivés	Froment (blé), seigle, orge, maïs, riz, avoine Pain complet, pain blanc, crackers, céréales pour petit déjeuner, pâtes
	Produits diététiques	Poudres sèches destinées à la préparation d'aliments pour nourrissons et enfants en bas âge
Forte teneur en acide et forte teneur en eau (*)	Agrumes	
"Produits difficiles ou uniques" (**)		Fèves de cacao et produits dérivés, copra et produits dérivés, café, thé Épices, réglisse
Forte teneur en sucre et faible teneur en eau	Fruits séchés	Figues, raisins, groseilles, sultanines
Lait et produits laitiers	Lait	Lait de vache, de chèvre et de bufflonne
	Fromage	Fromage de vache et de chèvre
	Produits laitiers (lait en poudre, par exemple)	Yaourt, crème

(*) Si l'on utilise un tampon pour stabiliser le pH dans la phase d'extraction, ce groupe de produits peut être incorporé dans le groupe "Forte teneur en eau".

(**) Les "Produits difficiles ou uniques" ne devraient faire l'objet d'une validation complète que s'ils sont fréquemment analysés. S'ils ne sont analysés qu'occasionnellement, la validation peut se limiter à un contrôle des seuils d'inscription au moyen d'extraits de blanc enrichis.

Tableau B

Valeur t unicaudale pour un taux d'échantillons faussement négatifs de 5 %

Degrés de liberté	Nombre d'identiques	Valeur t (5 %)
10	11	1,812
11	12	1,796
12	13	1,782
13	14	1,771
14	15	1,761
15	16	1,753
16	17	1,746
17	18	1,74
18	19	1,734

Degrés de liberté	Nombre d'identiques	Valeur t (5 %)
19	20	1,729
20	21	1,725
21	22	1,721
22	23	1,717
23	24	1,714
24	25	1,711
25	26	1,708
26	27	1,706
27	28	1,703
28	29	1,701
29	30	1,699
30	31	1,697
40	41	1,684
60	61	1,671
120	121	1,658
∞	∞	1,645

4.3.3. Exigences pour les méthodes de dépistage qualitatives (méthodes ne donnant pas de valeurs numériques)

Plusieurs organismes de normalisation (tels que l'AOAC et l'ISO) s'occupent actuellement de l'élaboration de lignes directrices pour la validation de méthodes d'essai binaires. Très récemment, l'AOAC a rédigé une ligne directrice concernant cette question. Ce document peut être considéré comme celui qui contient les orientations les plus modernes dans le domaine. Par conséquent, les méthodes donnant des résultats binaires (le contrôle visuel de bandelettes réactives, par exemple) devraient être validées conformément à cette ligne directrice.

http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ISPAM/Qual_Chem_Guideline_Final_Approved_031412.pdf

4.4. Estimation de l'incertitude de mesure, calcul du taux de récupération et enregistrement des résultats ⁽¹⁾

4.4.1. Méthodes de confirmation

Le résultat de l'analyse doit être enregistré comme suit:

- corrigé au titre de la récupération, le taux de récupération étant indiqué. La correction de la récupération n'est pas nécessaire lorsque le taux de récupération est compris entre 90 et 110 %;
- sous la forme "x +/-U", où x est le résultat de l'analyse et U l'incertitude de mesure élargie, calculée à l'aide d'un coefficient de couverture 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %.

Pour les denrées alimentaires d'origine animale, il est aussi possible de prendre en compte l'incertitude de mesure en établissant la limite de décision (CC_α), conformément à la décision 2002/657/CE de la Commission ⁽²⁾ (point 3.1.2.5 de l'annexe I — cas de substances pour lesquelles une limite autorisée est fixée).

Néanmoins, si le résultat de l'analyse est nettement (> 50 %) inférieur à la teneur maximale ou beaucoup plus élevé que la teneur maximale (à savoir plus de cinq fois supérieur à la teneur maximale), et à condition que les procédures appropriées en matière de qualité aient été suivies et que l'analyse vise uniquement à contrôler si les dispositions légales sont respectées, ce résultat peut être mentionné sans correction de la récupération, et la mention du taux de récupération et de l'incertitude de mesure peut être omise dans ce cas.

⁽¹⁾ De plus amples détails sur les procédures relatives à l'estimation de l'incertitude de mesure et à l'évaluation du taux de récupération sont disponibles dans le rapport intitulé *Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation* (rapport sur la relation entre les résultats d'analyse, l'incertitude de mesure, les facteurs de récupération et les dispositions de la législation de l'Union relative aux denrées alimentaires et aux aliments pour animaux) — http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf

⁽²⁾ Décision 2002/657/CE de la Commission du 14 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 (JO L 221 du 17.8.2002, p. 8).

Les présentes règles d'interprétation du résultat d'analyse en vue de l'acceptation ou du rejet du lot s'appliquent au résultat de l'analyse de l'échantillon destiné au contrôle officiel. En cas d'analyse à des fins de défense ou d'arbitrage, les règles nationales s'appliquent.

4.4.2. *Méthodes de dépistage*

Le résultat du dépistage est déclaré "conforme" ou "suspecté d'être non conforme".

Est "suspecté d'être non conforme" l'échantillon qui dépasse la valeur seuil et dont la teneur en mycotoxine peut être supérieure à la STC. Tout échantillon suspect est soumis à une analyse de confirmation qui doit permettre d'identifier et de quantifier avec précision la mycotoxine.

Est "conforme" l'échantillon dont la teneur en mycotoxine est inférieure à la STC avec une certitude de 95 % (ce niveau de certitude signifie qu'il y a 5 % de risque que l'échantillon ait été déclaré erronément négatif). Le résultat de l'analyse est enregistré comme étant "inférieur à la concentration cible du dépistage (< STC)" et le niveau de la STC est indiqué.»
