



HAL
open science

Caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires

Valérie Gaudin

► **To cite this version:**

Valérie Gaudin. Caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1B006 . tel-01439202

HAL Id: tel-01439202

<https://theses.hal.science/tel-01439202v1>

Submitted on 18 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie, Agro, Santé

présentée par

Valérie Gaudin

Préparée à l'unité de recherche AB2R
Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance
Anses, Laboratoire de Fougères

**Caractérisation de la
performance et
validation des
méthodes de
dépistage des
résidus
d'antibiotiques dans
les denrées
alimentaires**

**Thèse soutenue à Rennes
le 08 juin 2016**

devant le jury composé de :

Bruno LE BIZEC

Professeur ENV Directeur du LABERCA, Oniris
Nantes / *rapporteur*

Karin KRAEHENBUEHL

Chef de groupe Centre de recherche Nestlé
Lausanne / *rapporteur*

Gwennola ERMEL

Professeur d'université Rennes 1 / *examineur*

Bertrand LOMBARD

Chef de mission LRUE Anses (IRHC) Maisons-Alfort
/ *examineur*

Eric LE DREAN

Directeur Santé Animale ISAE Laboceva Fougères /
examineur

Michel LAURENTIE

Chef d'unité EMAD (DR) Anses Fougères / *directeur
de thèse*

A mes parents

A mes sœurs

A Michel et Manon

Remerciements

Cette thèse s'appuie sur les travaux réalisés au laboratoire de l'Anses Fougères, au sein de l'unité Antibiotiques Biocides, Résidus et Résistance (AB2R).

Je remercie chaleureusement Michel Laurentie, chef de l'unité EMAD, qui a accepté d'être mon directeur de thèse, pour ses conseils, ses nombreuses lectures du manuscrit, ses encouragements et sa bonne humeur.

Merci au docteur Karin Kraehenbuehl du centre de recherche de Nestlé (Suisse) et au professeur Bruno Le Bizec de l'ONIRIS, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci pour leur lecture attentive et leurs commentaires précieux, qui vont me permettre d'améliorer ce manuscrit. Merci aussi au docteur Gwennola Ermel, professeur à l'université de Rennes 1, au docteur Bertrand Lombard, collègue de l'Anses Maisons-Alfort et au docteur Eric Le Dréan de l'ISAE Laboceca Fougères) d'avoir accepté d'être membres du jury.

Merci à Pascal Sanders, directeur du laboratoire Anses Fougères, qui m'a encadré pendant mon stage de DESS sur la détermination du temps d'attente de la fluméquine chez les ovins, il y a un peu plus de 20 ans dans l'unité Pharmacocinétique. Il m'a transmis beaucoup de connaissances et m'a donné l'envie de continuer à travailler dans ce domaine. Il m'a depuis toujours encouragé à me lancer dans une thèse.

Merci à Pierre Maris, chargé de mission Biocides, qui m'a engagé en 1997 dans l'unité ITCMD (Innovation Technique en Contaminants Médicamenteux et Désinfectants), dans le cadre du Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE). Il m'a confié à l'époque mon premier beau « joujou » (et pas le dernier !!!), mon premier biocapteur, le Biacore® X, qui m'a accompagné pendant 10 ans.

Merci à Christophe Soumet, mon ancien collègue de bureau et mon chef d'unité à présent (AB2R Antibiotiques Biocides Résidus Résistance), pour ses encouragements, son soutien et sa compréhension. Merci à lui de m'avoir permis de dégager du temps ces derniers mois et d'aménager mon temps de travail, pour préparer cette thèse.

Merci à Eric Verdon, chargé de mission du LRUE, qui a été mon chef dans l'unité Résidus de Médicaments Vétérinaires (RMV), et m'a fait confiance. En de nombreuses occasions, il me pousse à me surpasser et à intégrer différents groupes de travail ou réseaux professionnels.

Merci à Jean-Pierre Morétain, un retraité heureux de l'Anses, qui m'a permis d'intégrer les groupes de travail et le bureau technique agro-alimentaire à l'AFNOR (Association Française de Normalisation), ainsi que la Fédération Internationale du lait (FIL).

Merci aux analystes avec qui je travaille depuis plus ou moins 15 ans (Annie Rault, Céline Hédou, Anne de Courville) et Nathalie Cadieu avec qui j'ai travaillé quelques années, avant qu'elle parte vers d'autres fonctions. Sans ces analystes, une grande partie de ces travaux n'auraient pu être réalisés. Grace à leurs compétences techniques et leur autonomie, nombre de projets ont été développés et

menés à bien pour la validation des méthodes de dépistage. Je remercie tout particulièrement Annie et Céline pour ces derniers mois, pendant lesquels elles m'ont laissée me consacrer presque entièrement à la rédaction de cette thèse.

Merci à ma collègue de bureau Catherine Creff-Froger d'avoir supporté mes longs silences et mon besoin de calme, pendant ces semaines de rédaction.

Il aura fallu 20 ans pour que l'envie me prenne de me lancer dans cette grande aventure. Un jour est venue l'envie de valoriser mon expérience dans le domaine des méthodes de dépistage et de la validation. Je suis sûre de ne pas avoir encore fait tout le tour de ce vaste sujet et que de nombreux développements sont encore à venir dans le domaine des biocapteurs. Je crois fortement que ces biocapteurs représentent l'avenir du dépistage des résidus d'antibiotiques. De même, je suis sûre que nous pouvons encore faire évoluer la validation des méthodes, pour améliorer la caractérisation de leurs performances et accompagner ainsi l'évolution technologique des méthodes.

Ma deuxième motivation, et non des moindres, est de faire la fierté de mes parents et de ma famille parce qu'ils m'ont toujours soutenue dans mes études et dans ma vie personnelle. Je tiens à les remercier car sans eux je n'en serais pas là aujourd'hui.

Merci à Michel, mon conjoint, qui m'a soutenue pendant ces mois d'écriture, quand je passais de très longues journées au labo. Merci de t'être occupé de Manon matin et soir, pendant cette période chargée. Sans cela, je n'aurais pas pu me consacrer autant à ma thèse. Merci à Manon qui a été patiente pendant ces quelques mois de rédaction. Je sais qu'elle attend de pied ferme que je puisse de nouveau aller l'emmenner à l'école le matin ou la chercher le soir. La construction de ma famille est ma première fierté, cette thèse sera la deuxième.

Merci à mes copines de tous les jours, Nathalie et Murielle, qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans ma démarche. Elles savent le travail réalisé et l'aboutissement que représente cette thèse pour moi.

J'ai appris beaucoup en rédigeant ce manuscrit, à plusieurs points de vue :

- Grâce à la bibliographie, j'ai encore beaucoup appris sur les biocapteurs et les innovations parfois surprenantes qui les concernent. Ces biocapteurs peuvent se transformer d'un système imposant sur une paillasse de laboratoire à un outil miniaturisé du quotidien, dont les résultats peuvent être déchiffrés avec un smartphone !!! Les perspectives entraperçues à travers cette thèse me laissent présager d'avoir encore du travail pour au moins 20 ans !!!
- J'ai aussi beaucoup appris sur moi-même, sur mon parcours au laboratoire qui constitue l'essentiel de mon expérience professionnelle. Parfois, le nez dans le guidon, nos objectifs premiers sont perdus de vue. Rédiger et soutenir une thèse m'a permis de remettre en ordre et en perspective mon parcours. Le fil conducteur de ces presque 20 années m'apparaît à présent plus clairement et orientera les années à venir vers de belles perspectives.

Ce travail de rédaction est un peu différent du travail plus courant de rédaction de rapports ou même d'articles scientifiques. J'ai beaucoup appris en réalisant cet exercice et cela m'a beaucoup plu. Je

n'étais pas une étudiante comme les autres, avec quelques années en plus, mais surtout forte de mon expérience. Pourtant, comme tous les étudiants, j'ai fait face à de gros moments de doute pendant la rédaction, des moments où j'avais l'impression désagréable de tourner en rond et où je me noyais dans l'information. Mais quand je reposais les choses à plat et retrouvais le fil de mon histoire, les idées coulaient à nouveau de source, quel plaisir de finir ce genre de journée où tout est clair !!!

J'ai aimé revenir à l'université de Rennes 1, sur les bancs de laquelle j'ai commencé mes études il y a 25 ans. Je suis fière aujourd'hui d'y revenir pour ce doctorat.

Caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires

L'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire peut entraîner la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. Ces résidus peuvent présenter des risques (eg. toxicologiques, allergies, antibiorésistance) pour la santé du consommateur. La fixation de limites réglementaires pour ces résidus et un contrôle adapté sont primordiaux pour garantir la sécurité des consommateurs. Les méthodes de dépistage sont utilisées en première intention et représentent donc l'étape critique du contrôle. La validation d'une méthode va permettre de garantir qu'elle est adaptée à l'usage souhaité, aux attentes réglementaires et attester de sa performance. La validation constitue une exigence normative (ie. ISO 17025) et réglementaire (ie. Décision européenne 2002/657/CE).

Dans une première partie, la diversité des méthodes de dépistage est présentée. Les méthodes dites conventionnelles de type microbiologique ou immunologique, développées dans les années 1980, sont toujours couramment utilisées, en raison de leur faible coût. Des méthodes innovantes, appelées biocapteurs, sont constituées d'un biorécepteur (eg. anticorps, aptamère) et d'un transducteur (eg. électrochimique, optique, massique, calorimétrique) pour la détection du signal. Ces méthodes sont en développement permanent et les progrès technologiques permettent de développer des méthodes de plus en plus sensibles, portables, parfois économiques. Dans une deuxième partie, différentes approches de validation, sous forme de réglementations, de lignes directrices ou de normes, sont discutées. La validation d'une méthode comporte deux étapes : tout d'abord la caractérisation des performances, puis la validation proprement dite par rapport à des critères préétablis. Les approches peuvent être absolue (une seule méthode) ou relative (comparaison de méthodes), globale (combinaison de plusieurs caractéristiques en une seule) ou critère par critère.

L'objet de cette thèse est de comparer ces différentes approches de validation, afin de statuer sur leur application possible aux différentes méthodes de dépistage des résidus et déterminer si leurs conclusions sont équivalentes ou non. Différentes approches ont été testées en les appliquant pour valider des méthodes de dépistage de différents types : conventionnelles microbiologique et immunologique, innovantes par biocapteurs optiques. L'approche par comparaison de méthodes n'est pas adaptée aux méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques. En effet, le choix de la méthode de référence est compliqué car il n'existe pas de méthodes normalisées. De plus, les méthodes de référence choisies ont souvent des principes très différents de la méthode alternative et sont le plus souvent moins performantes. L'approche globale, telle que la Probabilité de détection (POD) et le profil d'exactitude sont applicables aux méthodes de dépistage. Ces approches récentes sont de plus en plus utilisées dans d'autres domaines et présentent un intérêt à être développées pour les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques. Enfin, l'approche critère par critère de la décision européenne 2002/657/CE et du guide de validation européen de 2010, couramment appliquée aux résidus d'antibiotiques, comporte une caractéristique majeure et une avancée dans la validation qui est la capacité de détection (CC β).

En conclusion, les méthodes de dépistage sont en constante évolution, grâce au développement des biocapteurs. L'amélioration de leurs performances permet de répondre de mieux en mieux à la problématique du contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. La validation des méthodes est primordiale pour garantir un contrôle efficace. Nous avons pu observer l'évolution de la validation ces 20 dernières années, à travers les travaux de cette thèse. Cette évolution doit continuer et des perspectives d'évolution des référentiels de validation sont présentées dans cette thèse.

Mots clés: résidus, antibiotiques, méthodes de dépistage, biocapteur, caractérisation, performance, validation.

Performance characterization and validation of screening methods for antibiotic residues in food of animal origin

The use of antibiotic residues for animal treatment could lead to the presence of antibiotic residues in food of animal origin. The consumer could face some risks (*eg.* toxicological, allergies, bacterial resistance), due to these residues. The setting of regulatory limits on these residues and an adapted control of food products are thus essential to guarantee the safety of the consumers. Screening methods are used in first intention and represent the critical stage of the control. The validation of a method will guarantee that the method is fitted for purpose, adapted to the regulatory expectations and give evidence of its performance. The validation is mandatory due to international standards (*ie.* ISO 17025) and regulatory requirements (*ie.* European decision 2002/657/EC).

In a first part, the diversity of screening methods is presented. The conventional methods, microbiological or immunological types, developed in the 1980s, are always used, because of their moderate cost. Innovative methods, called biosensors, consist of a bioreceptor (*eg.* antibody, aptamer) and a transducer (*eg.* electrochemical, optical, mass sensitive, calorimetric) for the detection of the signal. These methods are in continuous development and the technological progress allows developing more, more sensitive, portable and sometimes economic methods. In a second part, various approaches of validation, in the form of regulations, guidelines or standards, are discussed. The validation of a method contains two stages: first of all the characterization of the performances, then the validation itself with regard to preestablished criteria. The approaches can be absolute (a single method) or relative (comparison of methods), global (combination of several characteristics in only one) or criterion by criterion.

The object of this thesis is to compare these various approaches of validation, to conclude on their potential application for different residue screening methods and to determine if their conclusions are equivalent or not. Various approaches have been tested by applying them to the validation of screening methods of various types: conventional methods (microbiological and immunological) and innovative optical biosensors. The approach by comparison of methods is not fitted to screening methods for antibiotic residues. Indeed, the choice of the reference method is complicated because there are no standardized methods. Furthermore, the chosen reference methods often have very different principles from the alternative method and are less sensitive most of the time. The global approach, such as the Probability of detection (POD) and the accuracy profile are applicable to the screening methods. These recent approaches are more and more used in other fields and present an interest to be developed for the screening methods for antibiotic residues. Finally, the criterion by criterion approach of the European decision 2002/657/EC and the European guideline for the validation of screening methods of 2010, usually applied to the screening methods for antibiotic residues, introduced a major characteristic and an improvement in the validation which is the detection capability (CC β).

In conclusion, the screening methods are constantly evolving, thanks to the development of new biosensors. The improvement of their performances allows answering better and better to the issue of the control of antibiotic residues in foodstuffs. The validation of the methods is essential to guarantee an effective control. We were able to observe the evolution of the validation these last 20 years, through the works of this thesis. This evolution has to continue and perspectives of evolution of guidelines, regulations and standards of validation are presented in this thesis.

Keywords: residues; antibiotics; screening methods; biosensor; characterization; performance; validation.

Liste des communications

Communications affichées (2010-2016)

- **V. Gaudin**, C. Hedou, A. Rault, E. Verdon. Validation of 2 microbiological tube tests for the screening of antibiotic residues in fish according to the European decision EC/2002/657. Sixth International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Ghent, Belgium, Juin 2010.
- **V. Gaudin**, A. Rault, A. De Courville, C. Hedou, S. Diomandé, C. Creff-Froger, E. Verdon. Validation of 2 microbiological tests for the screening of antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. Euroresidue VII, Egmond aan zee (The Netherlands), Mai 2012.
- **V. Gaudin**, C. Hedou, E. Verdon. Evaluation and Validation of a Biochip Multi-Array technology for the screening of antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. II International Symposium on Bee Products, Braganca, Portugal, Septembre 2012.
- **V. Gaudin**, C. Hedou, A. Rault, A. de Courville, E. Dubreil, Y. Pirotais, C. Soumet, E. Verdon. Comparison study of classical ELISA and receptor tests with a microbiological screening test and a multi-biochip array system for the screening of antibiotic residues in honey. Apimondia, Kiev, Ukraine, 29 septembre – 03 octobre 2013.
- **V. Gaudin**, C. Hedou, E. Verdon, C. Soumet. Evaluation and validation of a biochip multi-array technology for the simultaneous detection of aminoglycosides, macrolides, lincosamides and other antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. International Symposium on Bee products 3rd edition and Annual meeting of the International Honey Commission (IHC) - Opatja (Croatie), 27 septembre-1er octobre 2014.

Communications écrites (2010-2016)

- **Gaudin V**, Hedou C, Rault A, Verdon E. 2010. Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. Food Additives and Contaminants. 27:935–952.
- Fabre JM, Bosquet G et **Gaudin V**. 2010. Plan de surveillance des résidus dans la viande et autocontrôles bulletin des gtv - n°55, 109-118.
- Proceeding : **V. Gaudin**, A. Rault, A. De Courville, C. Hedou, S. Diomandé, C. Creff-Froger, E. Verdon. Validation of 2 microbiological tests for the screening of antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. Euroresidue VII, Egmond aan zee (The Netherlands), Mai 2012.
- **Gaudin V**, Rault A, Verdon E. 2012. Validation of a commercial receptor kit Sulfasensor® Honey for the screening of sulfonamides in honey according to the Commission Decision 2002/657/EC. Food Additives & Contaminants: Part A. 29:942-950.

- **Gaudin V**, De Courville A, Hedou C, Rault A, Diomandé SE, Creff-Froger C, Verdon E. 2013. Evaluation and validation of two microbiological tests for the screening of antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 30:234-243.
- **Gaudin V**, Hedou C, Verdon E. 2013. Validation of 2 ELISA kits for the screening of tylosin and streptomycin in honey according to the European decision EC/2002/657. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 30:93-109.
- **Gaudin V**, Rault A, Verdon E. 2013. Validation of a commercial receptor kit for tetracycline residues in honey according to the European guideline for screening methods. *Food and Agricultural Immunology*. 24:111-128.
- **Gaudin V**, Hedou C, Soumet C, Verdon E. 2014. Evaluation and validation of a biochip multi-array technology for the screening of 14 sulphonamide and trimethoprim residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for veterinary medicines. *Food and Agricultural Immunology*. 26:477-495.
- **Gaudin V**, Hedou C, Soumet C, Verdon E. 2014. Evaluation and validation of biochip multi-array technology for the screening of six families of antibiotics in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 31:1699-1711.
- **Gaudin V**, Hedou C, Soumet C, Verdon E. 2016. Evaluation and validation of a multi-residue method based on biochip technology for the simultaneous screening of six families of antibiotics in muscle and aquaculture products. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 33:403-419.

Communications orales (2010-2016)

- **Gaudin V**. Certification AFNOR du Delvotest® T - 1ère réunion du réseau des laboratoires reconnus pour le contrôle des critères sanitaires du lait cru - Maisons-Alfort – 3/4 Décembre 2013.
- **Gaudin V**. Présentation du système Evidence® (Randox, RU) - 1ère réunion du réseau des laboratoires reconnus pour le contrôle des critères sanitaires du lait cru - Maisons-Alfort – 3/4 Décembre 2013.
- **Gaudin V**. Groupe de travail du CEN/TC275/TAG 10 (Utrecht, 10-11 janvier 2013) (organisé par l'agence de sécurité sanitaire des Pays-Bas)
- **Gaudin V**. Methodologies to control veterinary drugs in honey by screening rapid testing. 128th AOAC International annual meeting & and exposition, Boca Raton, Florida, USA, 7-10 September 2014.
- **Gaudin V**. An overview of new technologies in veterinary chemical residues control in food by rapid methods: from classical to innovative technologies. Future challenges in food analyses. AOAC Europe - NMKL - NordVal International Symposium 2015, Stockholm, Sweden, 21-22 May 2015.
- **Gaudin V**. Follow-up on works of CEN/TC275/TAG 10 "Microbiological screening methods for antibiotics residues", Delft, Pays-Bas, 22-23 June 2015.

Liste des abréviations

AESA	Autorité européenne de sécurité des aliments
AFNOR	Association Française de Normalisation
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ADME	Absorption, distribution, métabolisme et déplétion
BIA	Biomolecular Interaction Analysis
CC β	Capacité de détection
CCM	Chromatographie couche mince
CE	Communauté Européenne
CEN	Comité européen de normalisation
CFIA	Immunoessai en cytométrie de flux
CG/SM-SM	Chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse tandem
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLIA	Immunoessai par chimiluminescence
CL/SM-SM	Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse tandem
DD(CS)PP	Direction départementale (de la cohésion sociale et) de la protection des populations
DG SANTE	Direction Générale de la Santé et des Consommateurs
DJA	Dose Journalière Admissible
DOT	Diffraction Optics Technology (Technologie d'optique diffractive)
EFSA	European Agency for Food Safety
EILV	Essai inter-laboratoires de validation
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
FIL	Fédération internationale du lait
FN	Faux-négatifs
FP	Faux-positifs
ISO	International Standard Organisation
iSPR	Résonance plasmonique de surface par imagerie
LMR	Limite maximale de résidus
LNR	Laboratoire National de Référence
LOC	Lab on a chip (Laboratoire sur puce)
LOD	Limite de détection
LPMR	Limite de performance minimale requise
LRUE	Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
MA	Méthode alternative
MR	Méthode de référence
NF	Norme française

NP	Nanoparticules
PIF	Poste d'inspection frontalier
POD	Probabilité de détection
PSPC	Plans de surveillance et plans de contrôle
QCM	Microbalance à cristal de quartz
RLOD	Limite de détection relative
RPA	Reference Point for Action (Limite d'action de référence)
SAW	Transducteur à onde acoustique de surface
SFSTP	Société française des sciences et techniques pharmaceutiques
SPR	Résonance plasmonique de surface
TRFIA	Time-resolved fluoroimmunoassay

Liste des figures

Figure 1. Du traitement des animaux à la présence de résidus.....	2
Figure 2. Répartition des prélèvements par famille de contaminant et par filière (DGAI 2013) [3].....	4
Figure 3. Principe du contrôle des résidus dans les aliments.	4
Figure 4. Chronologie des principales réglementations concernant les résidus de médicaments vétérinaires.....	7
Figure 5. Les différents types de méthodes appelées conventionnelles.	10
Figure 6. Les différents types de méthodes microbiologiques et l'interprétation des résultats.	12
Figure 7. Principe d'un immuno-essai compétitif : diminution du signal avec l'augmentation de la concentration en résidus.	18
Figure 8. Illustration des résultats des tests récepteurs.	18
Figure 9. Les avantages et les inconvénients des différents formats de méthodes immunologiques.	22
Figure 10. Principe d'un biocapteur.	24
Figure 11. Les différents types de biocapteurs.	24
Figure 12. Les différents types de biorécepteurs immobilisés sur les surfaces des biocapteurs.....	26
Figure 13. Evolution du nombre d'articles (Scopus) concernant les biorécepteurs de 2000 à 2015.	26
Figure 14. Processus de fabrication d'un MIP (extrait de http://www.icoa.fr/fr/).	28
Figure 15. Processus de fabrication d'un aptamère.....	28
Figure 16. L'évolution du nombre annuel de publications sur les biocapteurs dans la base de données Scopus de 2000 à 2015.....	33
Figure 17. Différentes classes et sous-classes de biocapteurs, en fonction du type de transducteur.	33
Figure 18. Classification des biocapteurs massiques.....	39
Figure 19. Représentation schématique d'un immunoessai basé sur l'utilisation d'un biocapteur de type cantilever (Lin et al. 2006) [136].	39
Figure 20. Représentation schématique d'un immunoessai développé sur un biocapteur SAW (Sang et al. 2013) [148].	42
Figure 21. Les principes de mesure des différents types de transducteurs optiques.....	44
Figure 22. Le principe schématique de la SPR (Cooper 2002) [171].	46
Figure 23. Principe d'un immunoessai basé sur la chimiluminescence pour le dépistage du chloramphénicol (Yu et al. 2014) [182].	49
Figure 24. Avantages et inconvénients des différents types de transducteurs optiques.....	50
Figure 25. Limites de détection et temps d'analyse, en fonction des technologies multiplex utilisées, dans les domaines des analyses de l'alimentation et de l'environnement [190].	52
Figure 26. Les nanotechnologies et leurs impacts sur les développements de biocapteurs.....	56
Figure 27. Cycle de vie d'une méthode analytique.	64
Figure 28. Caractéristiques de performance à déterminer lors de l'étude préliminaire.....	69
Figure 29. Construction du plan d'expérience pour la détermination de la spécificité et de la limite de détection.	70
Figure 30. Participation de la répétabilité, de la fidélité intermédiaire et de la reproductibilité dans la détermination de la fidélité.....	75
Figure 31. Profil d'exactitude extrait de la publication de Hubert et al. [253].	82
Figure 32. Les deux modèles théoriques de courbes de POD (Wehling et al. [270]).	85
Figure 33. Courbe POD pour un test immunochromatographique pour la détection du gluten dans le pain [280].	87
Figure 34. Comparaison de l'approche classique de validation et de l'approche globale du profil d'exactitude (Feinberg et al. 2007) [271].	90
Figure 35. Les différentes étapes de la validation suivant l'approche critère par critère.....	94

Figure 36. Les deux approches critère par critère en fonction de la réglementation.	94
Figure 37. Caractéristiques de performance à déterminer pour une méthode de dépistage,.....	98
Figure 38. Diagramme du plan de validation initiale pour une méthode de dépistage.	100
Figure 39. Construction du plan d'expérience pour la détermination du CC β	102
Figure 40. Représentation graphique des résultats des échantillons blancs et des supplémentés, pour une méthode immunologique, en lien avec les valeurs seuils T et Fm.	104
Figure 41. Protocole de détermination de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire.	107
Figure 42. Détermination de l'applicabilité de la méthode : deux approches.	110
Figure 43. Logigramme : conclusions de la détermination du CC β	114
Figure 44. La sensor chip.	130
Figure 45. Le sensorgramme.	130
Figure 46. Protocole expérimental de l'étude préliminaire.	141
Figure 47. Profils d'exactitude obtenus à partir de la mesure de la concentration de nicarbazine dans les œufs (a) avec une régression quadratique pondérée (1/X) sans correction et (b) le modèle corrigé. Les lignes pleines rouges sont les biais relatifs, les lignes pointillées noires sont les limites de tolérance (intervalles de tolérance β), les courbes bleues avec des tirets représentent les limites d'acceptabilité, les points représentent the concentrations relatives calculées des standards de validation.....	162
Figure 48. Organisation de la préparation des échantillons pour la validation de la méthode STAR dans le muscle.	171
Figure 49. Relation entre les CC β et les LMR respectives pour 16 antibiotiques représentatifs.	173
Figure 50. Protocole expérimental réalisé pour la validation du kit AM II dans le miel.	196
Figure 51. Distribution des résultats (signaux en RLU) pour les 60 échantillons de miel blancs et les 60 échantillons supplémentés avec la sarafloxacine et le thiamphénicol (TAF).	198
Figure 52. L'évolution des technologies pour le développement de biocapteurs moins couteux et plus performants.	215
Figure 53. Combinaison de 3 facteurs pour l'amélioration des performances des biocapteurs : les tendances actuelles.	215
Figure 54. Perspectives de développement et d'évaluation de biocapteurs au laboratoire de l'Anses Fougères.	218
Figure 55. Perspectives d'évolution de la validation des méthodes de dépistage pour les résidus d'antibiotiques.	224

Liste des tableaux

Tableau 1. Limites réglementaires européennes.....	7
Tableau 2. Exemples de tests commerciaux en ampoule et/ou en microplaques.....	14
Tableau 3. Exemples de méthodes boîtes intra-laboratoire.....	15
Tableau 4. Exemples de méthodes immunologiques, commerciales ou intra-laboratoire.....	20
Tableau 5. Avantages et inconvénients des différents types de biorécepteurs.....	30
Tableau 6. Les différentes techniques d'immobilisation des biorécepteurs sur les surfaces.....	32
Tableau 7. Principes, avantages et inconvénients des différents types de transducteurs électrochimiques.....	35
Tableau 8. Exemples de biocapteurs électrochimiques pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.....	37
Tableau 9. Principes, avantages et inconvénients des différents types de transducteurs sensibles à la masse. ..	40
Tableau 10. Les biocapteurs thermiques.....	54
Tableau 11. Les différents types de nanomatériaux, principes et intérêts, à travers leurs applications récentes pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.....	57
Tableau 12. Les attentes par rapport à une méthode de dépistage efficace et comment y répondent chaque type de transducteur.....	59
Tableau 13. Protocoles de validation au niveau national, européen et international.....	66
Tableau 14. Couples de résultats des méthodes de référence et alternative.....	72
Tableau 15. Construction des plans d'expérience (étalonnage et validation).....	78
Tableau 16. Choix des analytes en fonction du type de méthode.....	102
Tableau 17. Détermination de la stabilité des analytes en solution et dans la matrice [13].....	110
Tableau 18. Critères de validité pour estimer la fidélité de la méthode [13].....	114
Tableau 19. Caractéristiques de performance pour les méthodes qualitatives de dépistage, en fonction de l'approche de validation.....	122
Tableau 20. Caractéristiques de performance pour les méthodes quantitatives de dépistage, en fonction de l'approche de validation.....	124
Tableau 21. Indices correspondant aux différents modèles de régression testés, classés selon l'indice d'Exactitude (I_A).....	160

Sommaire

Introduction	1
Etude bibliographique	5
I. Les résidus d'antibiotiques	5
1. Contexte	5
2. Législation européenne et internationale	6
II. L'évolution des méthodes (biologiques) de dépistage	9
1. Historique des méthodes analytiques.....	9
2. Méthodes conventionnelles	9
2.1. Méthodes microbiologiques	11
2.2. Méthodes immunologiques	16
2.2.1. Test récepteurs.....	17
2.2.2. Radioimmunoessais (RIA).....	19
2.2.3. Méthode immunoenzymatique (ELISA) et méthode immunoenzymatique par fluorescence (FLISA)	19
2.2.4. Méthode immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA)	21
3. Méthodes innovantes :	23
3.1. Les biocapteurs	23
3.1.1.1. Biorécepteurs	25
3.1.1.2. Transducteurs.....	34
3.1.1.3. Nanotechnologies.....	55
3.1.1.4. Conclusions sur les biocapteurs	58
3.2. Combinaison de méthodes biologiques et physico-chimiques	60
3.2.1 La combinaison BIA/SM.....	60
3.2.2. CCM – Bioluminescence	60
3.2.3. L'électrophorèse capillaire couplée à un biocapteur	61
III. Partie recherche : Les différentes approches d'évaluation des performances des méthodes de dépistage	62
3.1. Exigences pour les méthodes de dépistage des résidus de médicaments vétérinaires ...	62
3.2. Caractérisation des performances et validation des méthodes de dépistage	63
3.2.1.1. La comparaison de méthodes :	67
3.2.1.1.1. Etude préliminaire.....	68
3.2.1.1.2. Etude collaborative	74
3.2.1.1.3. Conclusions sur l'approche comparaison de méthodes	76
3.2.1.2. L'approche globale : le profil d'exactitude :	77

3.2.1.2.1. Le profil d'exactitude :.....	77
3.2.1.2.2. La POD :	84
3.2.1.2.3. Conclusions sur l'approche globale.....	88
3.2.1.3. Les approches critère par critère :	93
3.2.1.3.3. Les approches critère par critère en fonction de la réglementation :	93
3.2.1.3.4. Caractéristiques de performance à déterminer:.....	97
3.2.1.3.5. Critères de performance :	111
3.2.1.3.6. Utilisation de la méthode en routine après la validation :	116
3.2.1.3.7. Conclusions sur l'approche critère par critère	117
3.3. CONCLUSION GENERALE SUR LES APPROCHES DE VALIDATION	121
Problematique et objectifs	125
Résultats.....	127
I. ARTICLE 1.....	128
Development of an immunoassay for the detection of sulfamethazine in milk using an optical biosensor: Influence of flow rate and antibody on the performance of the assay	128
II. ARTICLE 2.....	138
AFNOR validation of Premi [®] Test, a microbiological-based screening tube test for the detection of antimicrobial residues, in muscles from different animal origins	138
III. ARTICLE 3.....	158
Application of total error approach in validation of a biological method (ELISA) to detect residues of nicarbazine in eggs.....	158
IV. ARTICLE 4.....	169
Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to the European decision 2002/657/EC.....	169
V. ARTICLE 5.....	194
Evaluation and validation of a multi-residue method based on biochip technology for the simultaneous screening of six families of antibiotics in muscle and aquaculture products.....	194
Discussion et perspectives	214
I. Perspectives et nouveaux développements pour les méthodes	214
II. Perspectives et nouveaux développements pour l'évaluation des performances	219
Pourquoi avait-on plusieurs approches d'évaluation de la performance coexistantes ?	219
Est-ce que la validation des méthodes de dépistage a évolué ces dernières années?.....	219
Perspectives	222
Conclusion générale.....	227
Références	229

INTRODUCTION

Les matrices alimentaires d'origine animale (lait, viande, œufs, miel, etc) sont susceptibles de contenir des résidus de médicaments vétérinaires et plus particulièrement des résidus d'antibiotiques suite à des traitements préventif ou curatif sur des animaux. Les résidus sont définis comme des substances pharmacologiquement actives, persistant dans les denrées alimentaires après l'administration à un animal (principe actif, métabolite, excipient, etc) et pouvant présenter un danger pour la santé humaine (**Figure 1**) [1].

L'impact de la présence de ces résidus est de plusieurs ordres :

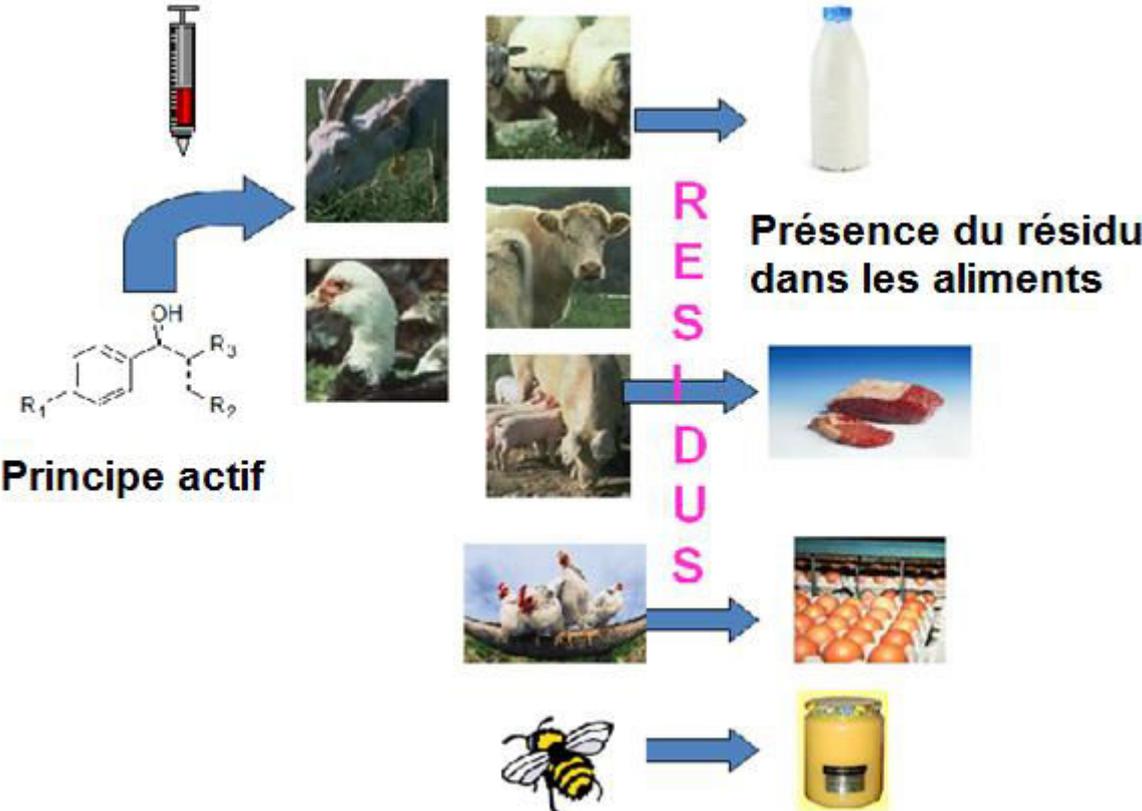
- impact sur la santé du consommateur : risques toxicologiques (par exemple allergies, antibiorésistance),
- impact économique : problèmes de transformation dans l'industrie.

Les allergies, liées à la présence de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments, ont été établies pour les pénicillines. En ce qui concerne l'antibiorésistance, les résidus d'antibiotiques contribuent à son développement via l'alimentation ou par la sélection de bactéries zoonotiques résistantes. La présence de résidus peut poser des problèmes de transformation dans l'industrie, par exemple dans industrie laitière en inhibant la fermentation (*eg.* yaourt, fromage).

La surveillance et le contrôle des denrées sont réalisés sous la forme de plans de surveillance et plans de contrôle (PSPC) nationaux, dans chaque état membre de l'Union Européenne. En France, la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) prend en charge l'organisation des PSPC. Les procédures d'échantillonnage (niveaux et fréquence d'échantillonnage), ainsi que les résidus à contrôler en fonction des espèces animales et des denrées produites par les animaux, sont décrits dans la directive européenne 96/23/CE [2]. Le nombre d'échantillons à contrôler est lié au volume de la production nationale pour chaque matrice (*eg.* nombre d'animaux abattus par an) (**Figure 2**). Les prélèvements sont effectués par les services vétérinaires de chaque département (Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations (DDCSPP)). Les plans de surveillance sont des plans organisés de façon aléatoire, non ciblée, dans une population définie. Leur objectif est d'évaluer la prévalence d'un contaminant, et donc, l'exposition du consommateur à ce danger. Les plans de contrôle (contrôle orienté, contrôle renforcé) sont des plans ciblés, qui ont pour objectif de détecter des anomalies, des non-conformités, voire des fraudes. En parallèle de ces plans officiels, la directive 96/23/CE demande aux filières de garantir l'absence de résidus dans les denrées ou les animaux, par exemple grâce à l'autocontrôle.

Les analyses des PSPC sont réalisées soit par des laboratoires agréés (les laboratoires vétérinaires départementaux (LVD)), soit au Laboratoire National de Référence (LNR), choisi par chaque état membre, pour les résidus concernés. Les missions des LNR sont définies dans la directive CE/96/23 [2]. De plus, quatre Laboratoires de Référence de l'Union Européenne (LRUE) ont été nommés dans cette directive, afin de piloter le réseau des LNR européens. Le laboratoire de l'Anses Fougères a été nommé LRUE pour les résidus d'antibiotiques et de colorants. Les contrôles sont généralement réalisés sous forme d'une première étape appelée dépistage, et éventuellement d'une deuxième étape de confirmation en cas de résultat positif lors du dépistage (**Figure 3**).

Figure 1. Du traitement des animaux à la présence de résidus.



Les méthodes de dépistage peuvent être qualitatives ou quantitatives. Une méthode qualitative permet la détection de la présence d'un analyte et donne un résultat sous forme de présence/absence. Une méthode quantitative permet de quantifier l'analyte présent et donne un résultat sous forme de concentration en analyte. Suite à un résultat de dépistage positif, une confirmation physico-chimique (identification et quantification du résidu de médicament) est obligatoire. Les méthodes d'analyse utilisées en dépistage doivent être des méthodes performantes pour protéger la santé du consommateur, pour obtenir une estimation la plus exacte possible du nombre de denrées contenant des résidus de médicaments vétérinaires, et, pour réduire au maximum le nombre de confirmation.

Dans un premier temps, la partie bibliographique présentera le contexte de l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires. Puis nous ferons un état de l'art des méthodes de dépistage à notre disposition, des plus conventionnelles aux plus innovantes.

La validation intervient après le développement d'une nouvelle méthode analytique, avant son application en routine. Elle permet de répondre à la question suivante : est-ce que la méthode développée et/ou le kit commercialisé est adaptée à l'utilisation que nous voulons en faire en routine ? Ses performances sont-elles conformes aux attentes réglementaires ? La validation est généralement basée sur des exigences scientifiques et réglementaires, et doit permettre d'évaluer les performances de la méthode par l'étude de critères appelés « critères de validation » au moyen d'outils statistiques appropriés. Dans la littérature et dans la pratique, plusieurs approches de validation analytique sont décrites et mises en pratique. Dans ce contexte, ce travail a été entrepris afin d'évaluer et de comparer différentes approches de validation et de déterminer les avantages et les inconvénients de chacune des approches.

Dans un deuxième temps, la partie bibliographique traitera des exigences pour les méthodes de dépistage et des différentes approches d'évaluation des performances des méthodes de dépistage et les protocoles expérimentaux mis en œuvre en présentant les démarches méthodologiques et les approches statistiques qui peuvent être utilisées. Nous montrerons l'évolution dans le temps de la validation des méthodes biologiques de dépistage des résidus de médicaments vétérinaires, les avantages et les inconvénients des différentes démarches présentées.

Figure 2. Répartition des prélèvements par famille de contaminant et par filière (DGAI 2013) [3].

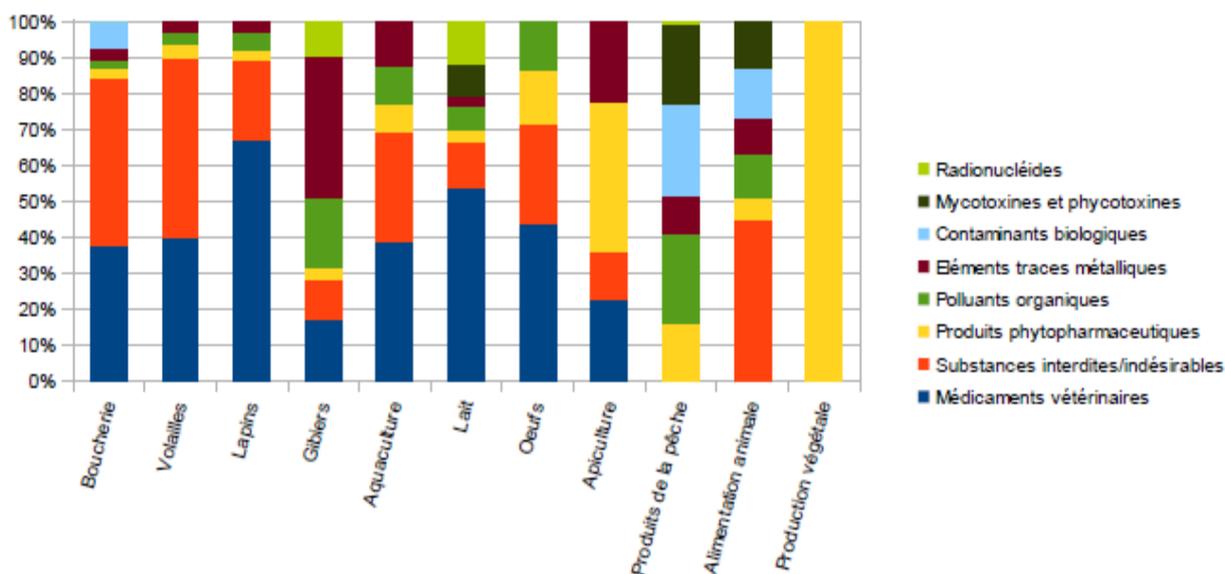
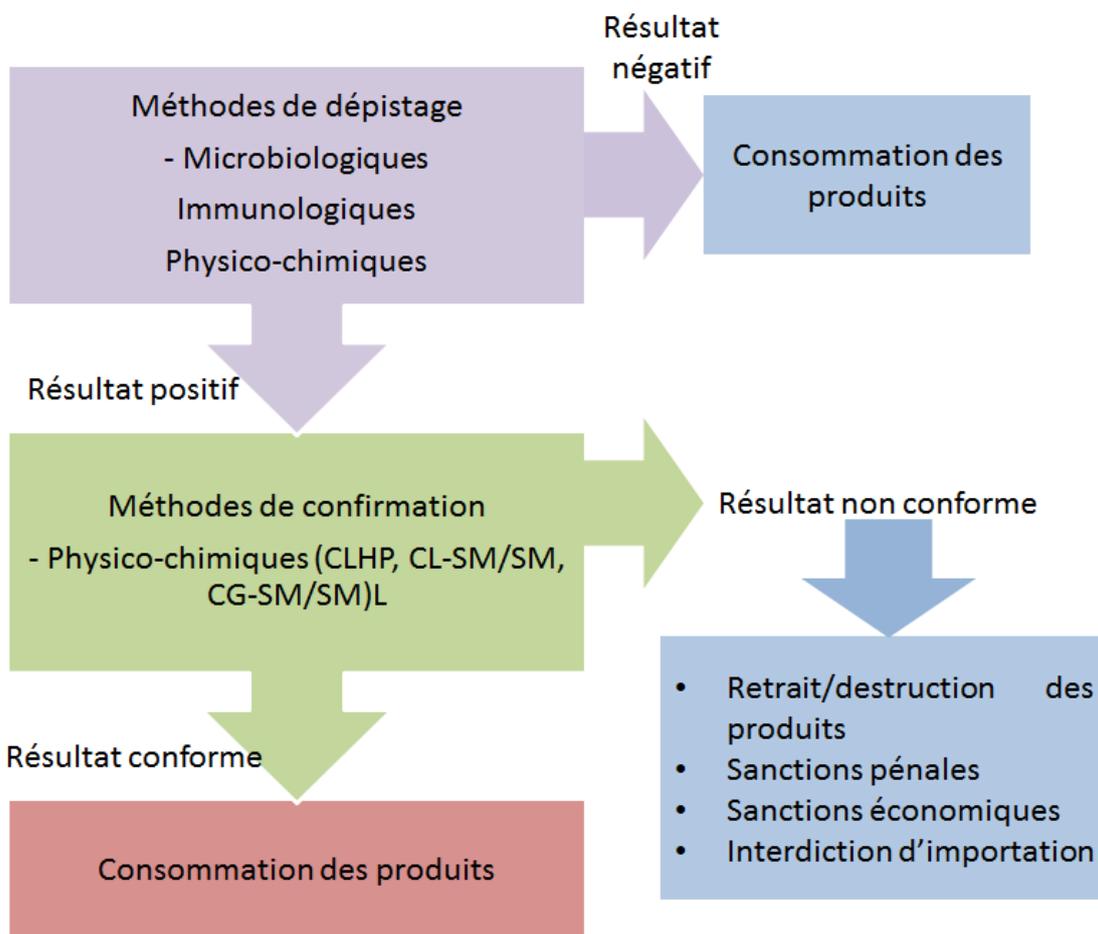


Figure 3. Principe du contrôle des résidus dans les aliments.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

1. Contexte

Les contaminants alimentaires chimiques sont des substances qui peuvent se retrouver, de façon non intentionnelle, sauf en cas de fraude, dans les denrées alimentaires ou dans les aliments pour animaux. Ces substances peuvent être présentes dans les aliments à différents stades de la production, de la transformation ou du transport. Ces substances peuvent aussi résulter d'une contamination de l'environnement. De nombreux produits chimiques d'origines anthropiques (*eg.* polluants organiques (*e.g.* dioxine), produits pharmaceutiques humains et vétérinaires, pesticides, biocides) et naturelles (métaux lourds (*e.g.* plomb, cadmium, mercure, uranium), métalloïdes (*e.g.* arsenic), toxines naturelles produites par les bactéries, protozoaires, algues, champignons et plantes) peuvent entrer dans l'alimentation animale, l'alimentation humaine et l'eau [4]. La présence de ces contaminants peuvent présenter un risque pour la santé animale et humaine. Les produits administrés de façon intentionnelle, font donc l'objet d'une évaluation du risque avant leur mise sur le marché.

Dans le cas des résidus de médicaments vétérinaires, ils se trouvent présents dans les denrées d'origine animale, suite aux traitements préventif ou curatif des animaux par ces médicaments. L'exposition aux résidus de médicaments vétérinaires dans les produits animaux doit tenir compte de la consommation des médicaments dans les productions animales. Les principaux résidus de médicaments vétérinaires dans l'Union Européenne sont les antibiotiques et les antiparasitaires. Deux types de résidus de médicaments vétérinaires susceptibles d'être présents sont : les résidus de principes actifs autorisés pour le traitement de maladies infectieuses chez les animaux de rente et les résidus de principes actifs interdits, en raison de problèmes de toxicité. De plus, les traitements réalisés sur les produits alimentaires, type stérilisation ou pasteurisation du lait, ne détruisent pas forcément les principes actifs. Ces traitements peuvent même engendrer des produits de dégradation qui, comme les molécules mères ou les métabolites, peuvent présenter des risques pour la santé des consommateurs [5].

Les risques liés à la présence de résidus de médicaments vétérinaires dans les produits alimentaires d'origine animale sont les suivants :

- Les risques technologiques : la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait a pour effet de bloquer ou ralentir les fermentations microbiennes (bactéries lactiques) et donc la transformation (coagulation du lait) est perturbée, voire impossible.
- Les risques pour le consommateur :
 - o Les allergies : la présence de résidus d'antibiotiques dans l'alimentation humaine peut engendrer des réactions allergiques chez des personnes sensibles [6],
 - o Les risques toxicologiques aigus, à court terme et à long terme (*eg.* effets sur la reproduction, sur le développement foetal, effets mutagènes, effets cancérogènes, immunotoxicité, etc),
 - o Les risques de contamination environnementale,
 - o La survenue de bactéries résistantes aux antibiotiques : les graves problèmes causés par l'émergence et la propagation de la résistance aux antimicrobiens ont abouti à l'interdiction dans

l'Union Européenne (EU) de l'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'alimentation animale [7, 8]. Le nombre d'articles publiés sur le thème de la résistance aux antimicrobiens est en constante augmentation (moins de 1000 articles par an avant les années 2000). Cette résistance aux antibiotiques peut se propager à d'autres populations bactériennes et des vecteurs de maladies infectieuses devenus résistants aux traitements antimicrobiens peuvent présenter une menace pour la santé humaine et animale [9, 10].

2. Législation européenne et internationale

En raison de ces préoccupations, de nombreux pays ont interdit ou restreint l'utilisation de composés antimicrobiens chez les animaux producteurs d'aliments. Une législation spécifique protège les consommateurs contre l'exposition aux résidus de médicaments vétérinaires, de pesticides et de contaminants environnementaux potentiellement dangereux dans les aliments d'origine animale. Depuis le début des années 1990, la commission européenne a mis en place progressivement des textes afin de protéger la santé du consommateur (**Figure 4**). Les différentes législations ont été publiées en fonction du type de contaminants alimentaires (par exemple la directive 96/23/CE pour les médicaments vétérinaires, les pesticides et les contaminants environnementaux [2]).

Des limites maximales de résidus (LMR) ont été définies pour les résidus de médicaments vétérinaires, de pesticides et de contaminants environnementaux, en premier lieu dans le règlement 2377/90/CE [11] (**Tableau 1**). Des LMR définitives ou provisoires étaient fixées pour les substances autorisées. Ce règlement a été abrogé par les règlements 470/2009/CE [1] et 37/2010/CE [12], qui déterminent la liste des substances autorisées et des substances interdites. La définition des LMR n'a pas été modifiée. Il s'agit de « la concentration maximale d'un résidu d'une substance pharmacologiquement active qui peut être autorisée dans les aliments d'origine animale ». Une évaluation scientifique des risques est menée pour fixer les LMR. Cette évaluation porte sur la pharmacocinétique de la substance pharmacologiquement active (absorption, distribution, métabolisme et déplétion (ADME)), le type de résidu et la Dose Journalière Admissible (DJA). La DJA est la quantité de résidus qui peut être ingérée chaque jour par des êtres humains, sans présenter de risque pour la santé du consommateur. Les risques toxicologiques, pharmacologiques ou microbiologiques chez les êtres humains sont donc pris en compte de la fixation de cette LMR [1].

Figure 4. Chronologie des principales réglementations concernant les résidus de médicaments vétérinaires.

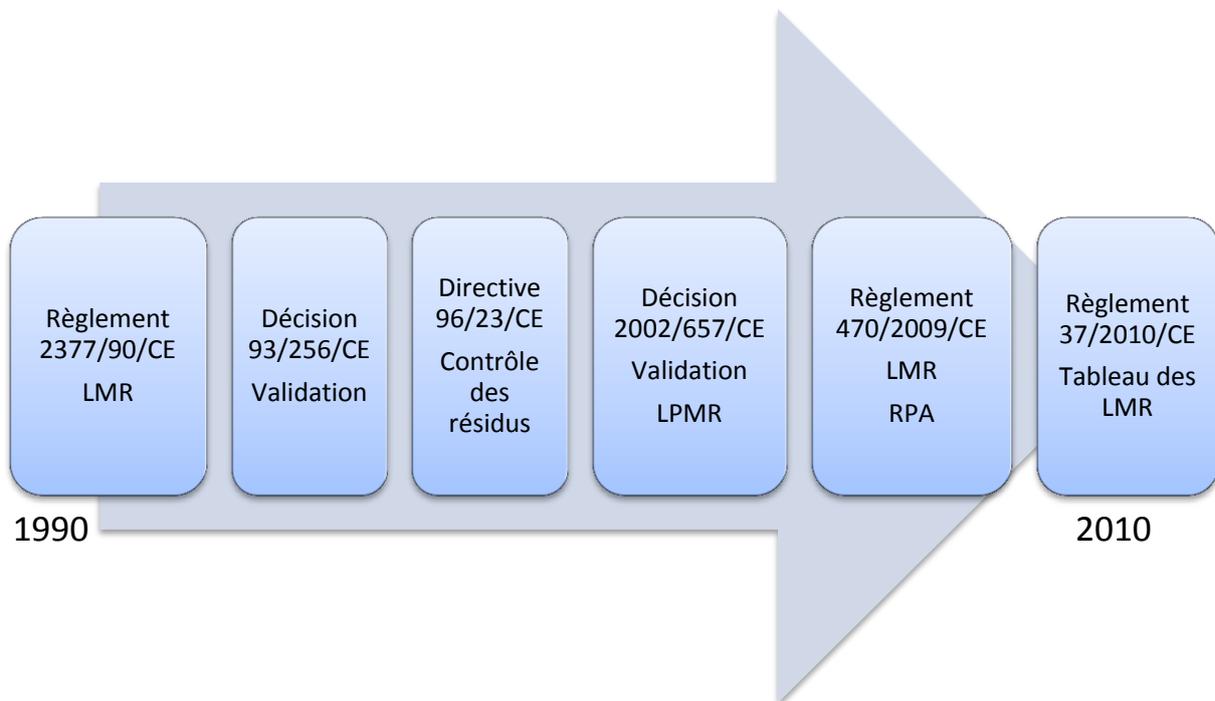


Tableau 1. Limites réglementaires européennes.

Limites réglementaires		Références
Substance autorisée	Limite maximale de Résidu (LMR)	Règlement 2377/90/CE (abrogé) Règlements 470/2009/CE [1] et 37/2010/CE [12]
	Limite de performance minimale requise (LPMR)	Décision européenne 2002/657/CE [13]
Substance interdite	Valeur de référence ou « Reference Point for Action » (RPA)	Règlement 470/2009/CE [1]
	Niveau d'Action Différentiel (NAD)	Groupe Consultatif sur les résidus de médicaments vétérinaires (Advisory Group for Veterinary Residues (AGVR)) pour le Veterinary Medicine Directorate (VMD), Royaume-Uni

Les LMR constituent des valeurs de référence pour la détermination du temps d'attente dans les autorisations de mise sur le marché (AMM) de médicaments vétérinaires destinés aux animaux producteurs de denrées alimentaires. Les LMR servent en outre de référence pour le contrôle des résidus dans les aliments d'origine animale au sein des États membres et aux postes d'inspection frontaliers (PIF).

Avec le règlement 2377/90/CE, les substances pour lesquelles aucune LMR ne pouvait être fixée, car elles constituaient un risque pour la santé du consommateur, étaient classées en annexe IV. Elles devaient être détectées à un niveau le plus faible possible. Ensuite, la décision européenne 2002/657/CE a défini pour ces mêmes substances, la Limite de Performance Minimale Requise (LPMR) comme « la teneur minimale en analyte dans un échantillon qui doit être au moins détectée et confirmée » [13]. La LPMR est une limite qui a pour objectif d'harmoniser les performances analytiques des méthodes applicables aux substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée. Elle est basée sur des critères analytiques, pas sur des dangers toxicologiques comme la LMR. La LPMR est donc un objectif de performance à atteindre, mais ne constitue pas un seuil au-dessus duquel on doit déclarer la non-conformité d'un échantillon. Un résultat doit être déclaré non conforme si la limite de décision ($CC\alpha$) de la méthode de confirmation est dépassée [13].

Depuis, le règlement 470/2009/CE a établi des procédures pour fixer des valeurs de référence (« reference point for action ») (RPA) [1]. Ces RPA vont remplacer à terme les LPMR. Une RPA est le niveau de résidus d'une substance pharmacologiquement active, fixé dans l'objectif de contrôler certaines substances pour lesquelles aucune LMR n'a été fixée. Les RPA sont fixées en fonction de « la concentration en résidus la plus faible pouvant être quantifiée grâce à une méthode d'analyse validée conformément aux exigences communautaires ». Le laboratoire de référence de l'Union Européenne (LRUE) compétent peut renseigner la commission européenne sur les performances des méthodes d'analyse. Contrairement à la LPMR, la RPA est un seuil de déclaration de non-conformité d'un résultat. L'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (European Food Safety Agency (EFSA)) a délivré des avis scientifiques sur les méthodes et les procédures à suivre pour établir des RPA [14]. A la demande de la commission européenne, l'EFSA a publié des avis scientifiques sur les risques pour la santé humaine et animale, liés à la présence de certains résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Des RPA ont été fixées pour le chloramphénicol [15], les nitrofuranes [16] et le vert de malachite. Ces valeurs de référence sont applicables aux productions dans les pays tiers [17], mais aussi applicables aux productions dans l'Union Européenne [1].

Enfin, pour les médicaments vétérinaires qui n'ont pas de LMR (*eg.* nicarbazine), certains états membres ont pu fixer leurs propres seuils de décision, au-dessus desquels une action est intentée. Dans le cas de la nicarbazine par exemple, le Royaume-Uni a fixé un Niveau d'Action Différentiel (NAD) de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en 1998. Un échantillon contenant de la nicarbazine au-dessus de cette limite est déclaré positif.

Aux États-Unis, le terme «niveau d'action» se réfère aux niveaux recommandés par l'Agence de protection environnementale (Environmental Protection Agency (EPA)) pour application par la FDA (Food and Drug Administration) et le ministère américain de l'Agriculture (USDA) (par exemple,

lorsque les résidus de pesticides se retrouvent dans l'alimentation humaine ou animale, pour des raisons autres que l'application directe du pesticide). Par opposition aux « tolérances » qui sont établies pour les résidus survenant comme une conséquence directe de l'utilisation appropriée, les seuils d'intervention sont fixés pour les résidus résultant d'une autorisation d'utilisation juridique antérieure ou de contamination accidentelle. Au Canada, les limites maximales sont établies par Santé Canada et sont exécutoires par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). Certaines teneurs maximales apparaissent dans le Règlement sur les aliments et drogues, où ils sont considérés comme des «tolérances». Il y a aussi un certain nombre de limites maximales qui n'apparaissent pas dans le Règlement; ceux-ci sont considérés comme des «normes».

II. L'ÉVOLUTION DES MÉTHODES (BIOLOGIQUES) DE DÉPISTAGE

1. **Historique des méthodes analytiques**

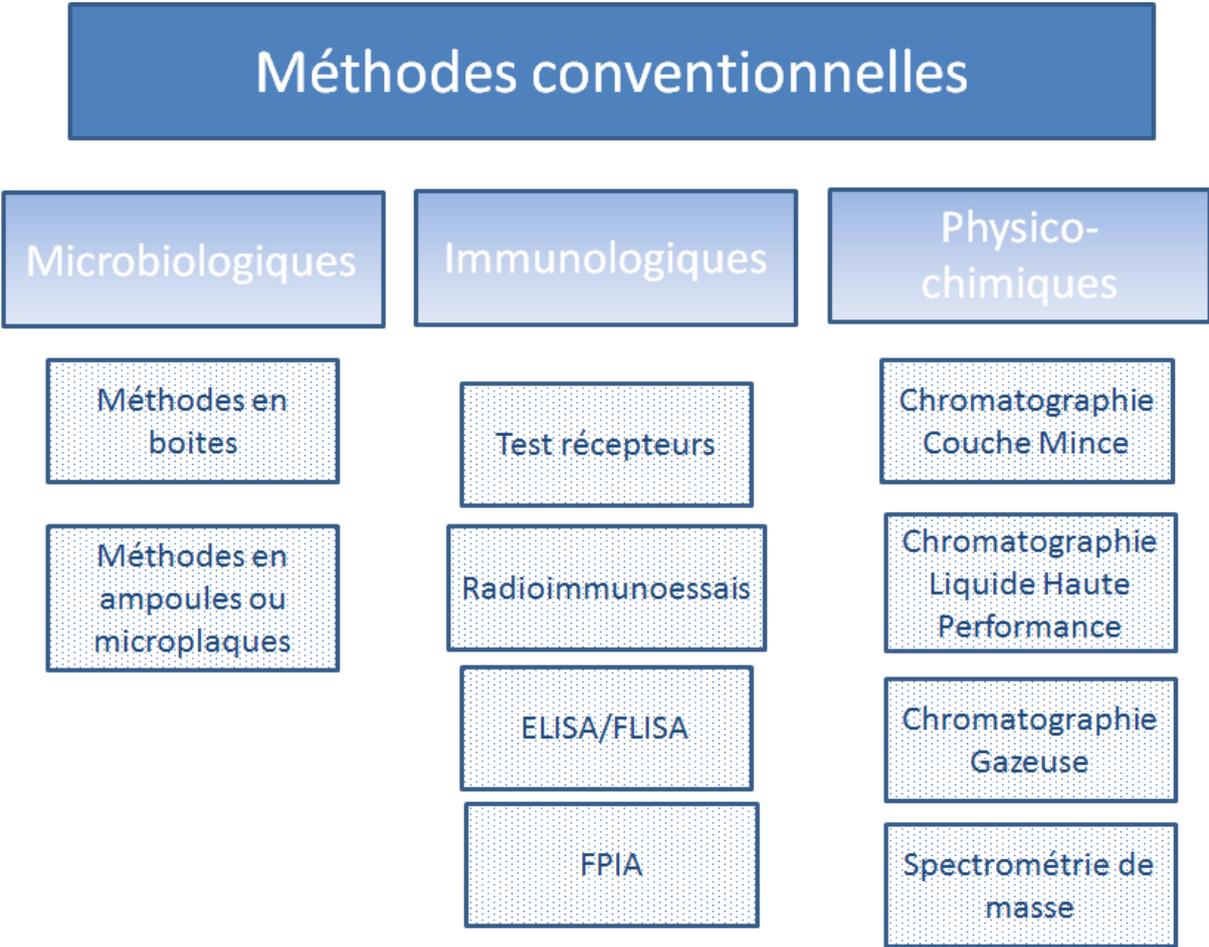
Les premières méthodes biologiques qui ont été développées pour la détection des résidus de médicaments vétérinaires ont été des méthodes microbiologiques [18-20]. Ces méthodes sont basées sur des tests de diffusion en gélose ou sur l'inhibition de la production d'acide par des bactéries (« méthode d'acidification »). Le principe est basé sur la sensibilité des bactéries à l'action des antibiotiques. Ces méthodes sont simples et peu coûteuses. Ensuite, des méthodes immunologiques ont été développées sur la base de la reconnaissance anticorps - antigène. Ces méthodes sont plus spécifiques en raison du principe de l'interaction anticorps - antigène. Ainsi, ces méthodes sont plus ciblées. Dans le même temps, des techniques ont été mises au point utilisant les propriétés physico-chimiques des antibiotiques (chromatographie en couche mince (CCM), chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)).

2. **Méthodes conventionnelles**

Nous allons différencier les méthodes dites conventionnelles (c'est-à-dire classiquement utilisées, car plus anciennes), des méthodes innovantes (nouvelles technologies, nouveaux outils de reconnaissance et/ou de détection). Trois grands types de méthodes conventionnelles utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires sont présentés dans la **Figure 5**.

Des méthodes physico-chimiques peuvent parfois être utilisées pour le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. Ce type de méthode de dépistage ne rentre pas dans le sujet de cette thèse et ne sera donc pas développé. Les méthodes conventionnelles pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale s'appuient essentiellement sur des méthodes microbiologiques et biochimiques. Les principes et caractéristiques des méthodes biologiques conventionnelles vont être développés ci-après.

Figure 5. Les différents types de méthodes appelées conventionnelles.



2.1. Méthodes microbiologiques

Les méthodes microbiologiques sont principalement utilisées pour la détection de deux types de contaminants alimentaires; les organismes pathogènes alimentaires et les résidus d'antibiotiques. Pour la détection des pathogènes alimentaires, les méthodes sont généralement constituées d'une étape d'enrichissement (la mise en culture sur des boîtes de gélose sélectives afin d'isoler l'organisme pathogène), suivie par une analyse phénotypique. Pour le dépistage des résidus d'antibiotiques, les méthodes microbiologiques sont basées sur la sensibilité des souches bactériennes à l'action des antibiotiques et sur la spécificité d'action des antibiotiques. Généralement un milieu gélosé est inoculé avec une bactérie sensible et les résidus d'antimicrobiens vont diffuser dans la gélose, à partir de l'échantillon. L'inhibition de la croissance bactérienne indique la présence de composés antimicrobiens. Les méthodes microbiologiques sont capables de détecter une large gamme de résidus d'antibiotiques et les principales classes d'antibiotiques. Ces méthodes de dépistage possèdent un large spectre de détection.

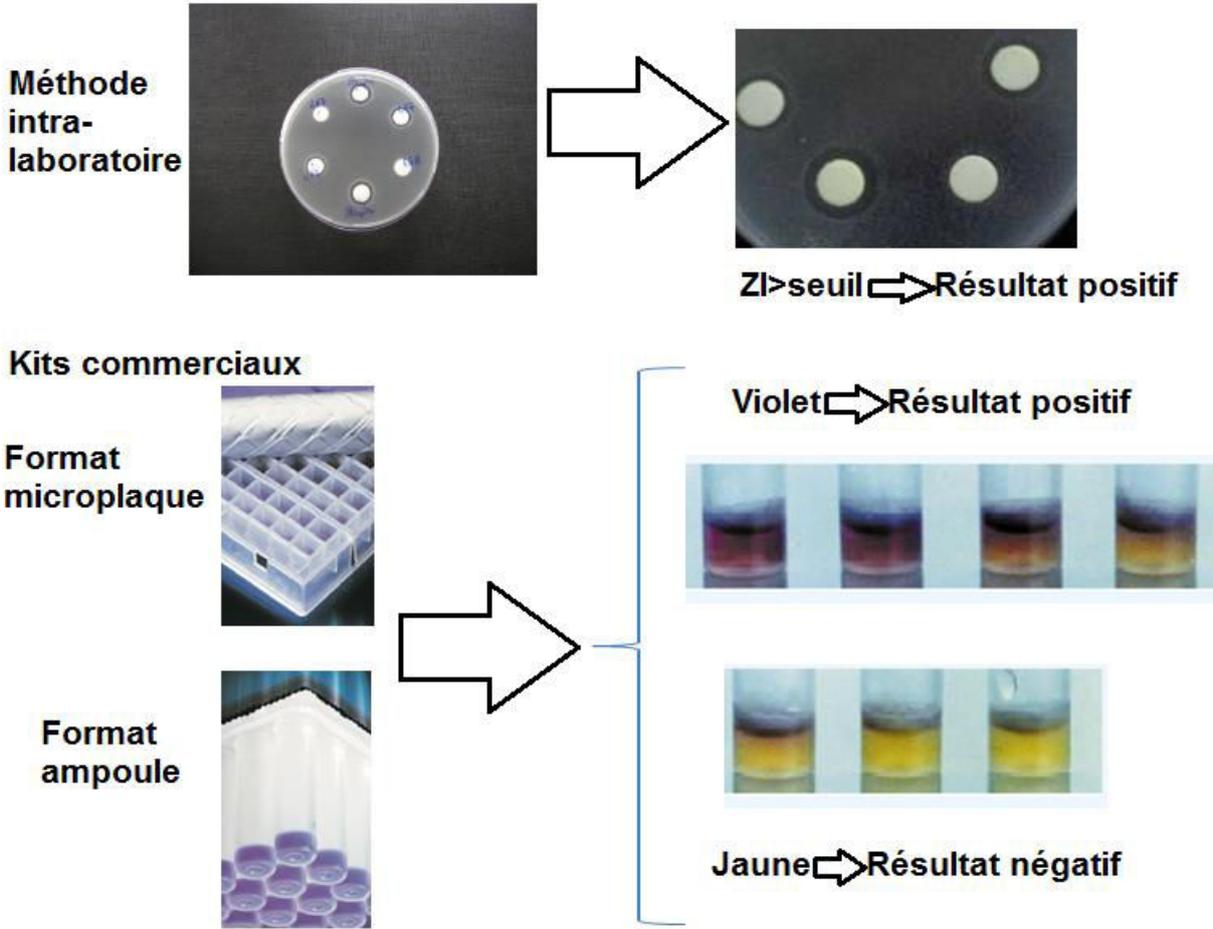
Les méthodes microbiologiques peuvent être classées en deux catégories (**Figure 6**):

- Les méthodes intra-laboratoire sont le plus souvent des méthodes en boîtes, à l'exception d'un test intra-laboratoire en tubes pour le contrôle officiel des antibiotiques dans le lait en France (test d'acidification [21]), qui n'est plus utilisé.
- Les kits commerciaux sont le plus souvent des tests en ampoules et/ou en microplaques, commercialisés prêts à l'emploi. Un seul germe est ensemencé dans le milieu, le plus souvent *Bacillus stearothermophilus* (**Tableau 2**).

Le temps d'incubation est généralement compris entre 2h15 et 3 heures pour les tests commerciaux, contre 12 à 24 heures pour les méthodes en boîtes. Les tests microbiologiques au format microplaque sont des méthodes de criblage à haut débit parce l'automatisation des analyses et des lectures est simple et très fréquente, ce qui n'est pas le cas des méthodes microbiologiques au format boîtes. Seulement 20 à 60 échantillons peuvent être analysés par des méthodes boîtes en fonction de la matrice et du nombre de boîtes. De même, un maximum de 40 à 60 échantillons peut être analysé par des tests en tubes (eg. Premi®Test). Par contre, dans le domaine du paiement à la qualité du lait, plusieurs centaines d'échantillons peuvent être analysés en une journée sur des tests microbiologiques au format microplaque.

L'avantage des méthodes en boîtes se situe dans la capacité à orienter vers l'identité de la famille d'antibiotiques présente dans l'échantillon. En effet, le choix d'une bactérie particulière et d'un milieu adapté permet d'orienter la détection plus spécifiquement vers une famille d'antibiotiques. La composition du milieu et son pH vont être favorables à la culture de la bactérie en question, mais aussi favoriser l'action d'une famille d'antibiotiques en particulier. Les tests commerciaux étant basés sur l'utilisation d'un seul germe, la famille de la substance donnant un résultat positif ne peut être identifiée.

Figure 6. Les différents types de méthodes microbiologiques et l'interprétation des résultats.



ZI = zone d'inhibition

La préparation de l'échantillon varie en fonction du format de la méthode et de la matrice. Pour les méthodes en boîte, le plus souvent le lait est déposé sur des disques de papier filtre, eux-mêmes déposés sur la gélose. Les matrices solides comme le muscle sont « carottées » dans un échantillon de muscle congelé. Puis des rondelles de 2 mm environ d'épaisseur sont préparées et déposées directement sur les boîtes. Pour les œufs, il est possible de faire des trous dans le milieu gélosé, puis d'y déposer la coule d'œuf (c.-à-d. mélange blanc et jaune). La préparation de l'échantillon est donc nulle ou très réduite. Pour les méthodes au format ampoules ou microplaques, le lait est aussi déposé sans préparation. Pour le muscle par exemple, l'échantillon peut être pressé ou passé au four à micro-ondes, pour en extraire le jus, qui sera ensuite déposé sur le milieu gélosé.

De nombreuses méthodes microbiologiques ont été rapportées pour l'analyse des résidus d'antibiotiques, que ce soient des tests commerciaux [22-28] ou des méthodes « maison » [28-34]. Ces méthodes peuvent s'appliquer à différentes matrices alimentaires : viande, lait, œufs, miel, etc. Les **Tableaux 2 et 3** présentent des exemples de méthodes microbiologiques utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale.

Tableau 2. Exemples de tests commerciaux en ampoule et/ou en microplaques.

Nom du test	Fournisseur	Souche bactérienne	Matrice	Durée d'analyse (heures (h))	Références
Delvotest® P, SP, MCS, T, Accelerator	DSM, Delft, Pays-Bas	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Lait	2,5-3	[23]
CMT® (COPAN Lait Test)			Lait	2,5-3	/
Eclipse® 3G	Zeu		Lait	2,5-3	/
Eclipse® 100	Inmunotech, Sarragose, Espagne		Lait de brebis	2,5-3	[22]
Blue Yellow Test®	Charm Sciences, Etats-Unis		Lait	2,5-3	/
Charm AIM® 96			Lait	2,5-3	/
BRT-AIM®	AIM, Allemagne		Lait	2,5-3	/
Premi® test	DSM, Delft, Pays-Bas		Viande, œufs	2,5-3	[25]
Explorer® test	Zeu Inmunotech, Sarragose, Espagne))		Viande, œufs	3-4	[24] [26]
Kidney inhibition swab (KIS®) test,	Charm Sciences, Etats-Unis		Jus de rein de bovin et serum	3-4	[27]
Equinox®	Zeu Inmunotech, Sarragose, Espagne	<i>Escherichia coli</i>	Lait, viande, œufs	18	[35]

Tableau 3. Exemples de méthodes boîtes intra-laboratoire.

Nom de la méthode	Souche bactérienne	Matrice	Durée d'analyse (h)	Références
Méthode une boîte	<i>Bacillus subtilis</i>	Muscle	18	[28]
Méthode une boîte	<i>Bacillus megaterium</i>	Muscle	6	[36]
FAST test	<i>Bacillus megaterium</i>	Rein	7	[27]
Méthode des 4 Boîtes (FPT)	<i>Bacillus subtilis</i> (3 boîtes), <i>Micrococcus luteus</i> (1 boîte) dans 4 milieux différents	Muscle	18-24	[19] [37]
Méthode STAR	5 souches bactériennes dans 4 milieux différents	Lait, muscle	18-24	[29] [30]
NAT screening 5 boîtes	5 souches bactériennes dans 5 milieux différents	Muscle et rein	16-18	[38] [34]
Méthode 6 boîtes	6 souches bactériennes dans 4 milieux différents	Muscle	18-24	[33]
Méthode 7 boîtes	7 souches bactériennes dans 7 milieux différents	Muscle	18-24	[31]

Screening Test for Antibiotic Residues (STAR); Nows antibiotic test (NAT) screening); Fast Antimicrobial Screening Test (FAST).

Une revue assez complète des méthodes microbiologiques utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les tissus animaux a été publiée en 2009 [39]. En raison de leur faible coût et de leur large spectre, les méthodes d'inhibition microbiennes sont privilégiées pour mettre en place les programmes de surveillance à grande échelle des résidus de médicaments vétérinaires, tels que les plans de surveillance et plans de contrôle (PSPC) des Etats Membres de l'Union Européenne. Toutefois, ces méthodes de dépistage microbiologiques présentent le plus souvent des limites de détection trop élevées par rapport aux LMR pour certaines familles d'antibiotiques. Généralement, la famille des bêta-lactamines est correctement détectée, mais d'autres familles comme les sulfamides sont mal détectées. En outre, les temps d'incubation des méthodes en boîtes sont généralement longs (de 12 à 24 heures), avant d'obtenir le résultat. Pour cette raison, des méthodes de dépistage multi-résidus par CL-SM/SM (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) sont en cours d'élaboration [40-42]. Même si le coût des analyses est beaucoup plus élevé, les méthodes de dépistage par CL-SM/SM ont déjà remplacé les méthodes microbiologiques en routine, dans certains états membres Européens.

2.2. Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques sont largement utilisées dans le domaine du dépistage des résidus de médicaments vétérinaires. Le principe commun à tous les tests immunologiques est la détection de l'interaction entre un anticorps et un antigène. Les composés de faible poids moléculaire, appelés haptènes en immunologie, ne sont pas immunogènes. Les médicaments vétérinaires en général et les antibiotiques en particulier sont de faible poids moléculaires. La préparation d'anticorps dirigés contre des haptènes nécessite la liaison covalente de l'haptène à une protéine support et l'immunisation des animaux par les immunogènes ainsi synthétisés. Le mode de liaison chimique de l'haptène à une protéine détermine la spécificité de l'anticorps [43]. Les anticorps peuvent être polyclonaux, monoclonaux ou recombinants, en fonction de leurs propriétés sélectives et la façon dont ils sont synthétisés. Les anticorps polyclonaux sont produits en utilisant des procédures de vaccination traditionnelles, à savoir chez les lapins, les chèvres, les moutons et les porcs. Les anticorps polyclonaux présentent deux inconvénients : un problème de reproductibilité (il n'est pas possible de produire des anticorps de spécificité identique, même chez deux animaux de la même espèce), et la quantité d'anticorps produite est limitée. D'autre part, le développement d'anticorps monoclonaux est limité, d'une part par le coût plus élevé de production et d'autre part parce que la technologie des hybridomes est plus complexe et risquée. C'est pourquoi les anticorps polyclonaux sont les réactifs les plus largement utilisés dans les analyses immunochimiques à ce jour. Cependant l'ingénierie des anticorps et la production d'anticorps recombinants est un domaine de développement très prometteur pour le développement de nouvelles méthodes d'immunoanalyse.

En raison de la petite taille des molécules d'antibiotiques, le principe d'immunoessai sandwich n'est pas applicable. En conséquence, toutes les méthodes développées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires sont basées sur un immunoessai compétitif, c'est-à-dire

que le signal est inversement proportionnel à la concentration en antibiotiques dans l'échantillon (**Figure 7**). Les molécules d'analytes non marqués dans l'échantillon entrent en compétition avec l'analyte marqué (ou conjugué) pour un nombre limité de sites de liaison des anticorps (ou des récepteurs). Si l'analyte est présent dans l'échantillon, il y aura moins d'analyte marqué qui se liera à l'anticorps, de sorte que le signal va diminuer. Au contraire, s'il n'y a pas d'analyte dans l'échantillon, rien ne viendra empêcher l'analyte marqué de se lier avec l'anticorps et alors le signal sera maximum. Ainsi, le signal est inversement proportionnel à la concentration en antibiotique dans un l'échantillon.

Les méthodes immunologiques conventionnelles peuvent être divisées en 4 groupes principaux, dans le domaine du dépistage des résidus.

2.2.1. Test récepteurs

Les tests récepteurs utilisent une bandelette réactive sur laquelle un ligand récepteur est fixé sur une bande de membrane. L'échantillon à analyser est appliqué sur la bandelette et laissé en contact pour interagir avec le récepteur. La **Figure 8** présente l'interprétation des résultats de ce type de test. La ligne contrôle (CTRL) doit apparaître dans tous les cas pour que l'essai soit valide. Comme il s'agit d'un immunoessai compétitif, le signal (intensité de la ligne TEST) diminue quand la concentration en résidus dans l'échantillon augmente. Un échantillon négatif présente une ligne TEST d'intensité égale ou supérieure à la ligne CTRL. Un échantillon est déclaré positif quand l'intensité de la ligne TEST est plus faible que celle de la ligne CTRL. Les résultats peuvent être interprétés par observation visuelle directe des lignes de test et de contrôle, mais les fabricants proposent parfois un lecteur optique dédié, ce qui élimine la subjectivité de l'utilisateur. La couleur développée peut également être quantifiée soit par rapport à une échelle de couleurs standard ou en mesurant par spectrophotométrie [44-46].

Figure 7. Principe d'un immuno-essai compétitif : diminution du signal avec l'augmentation de la concentration en résidus.

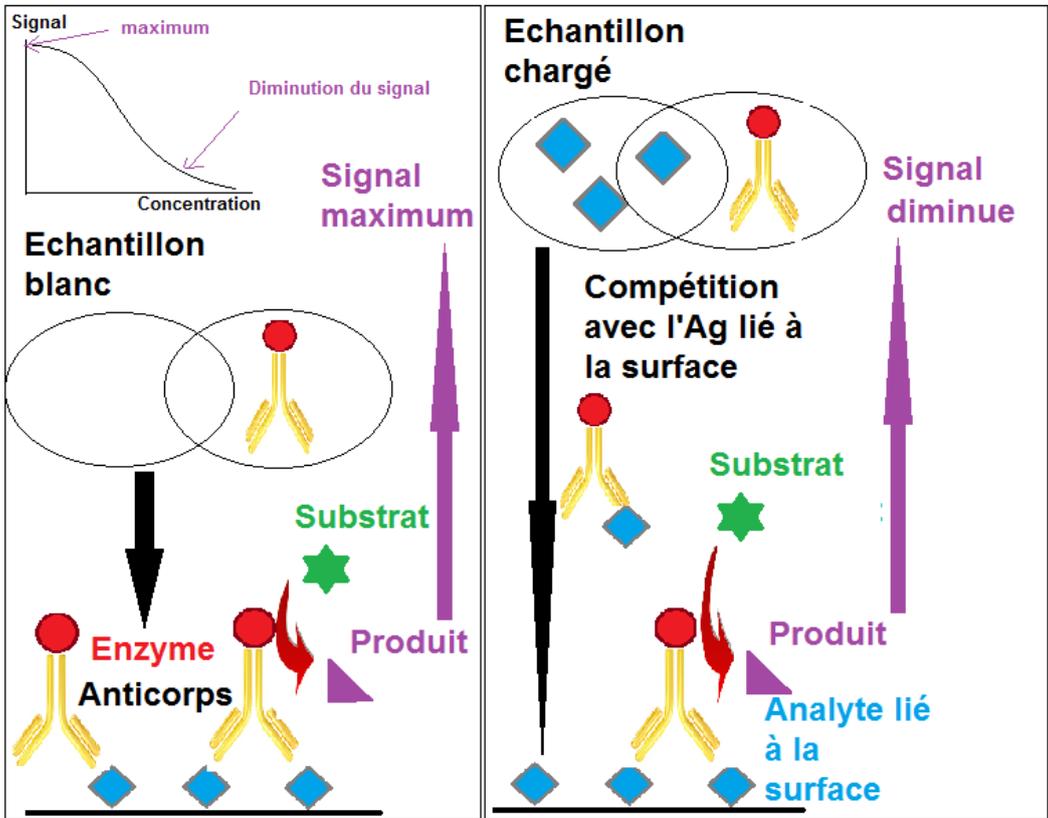
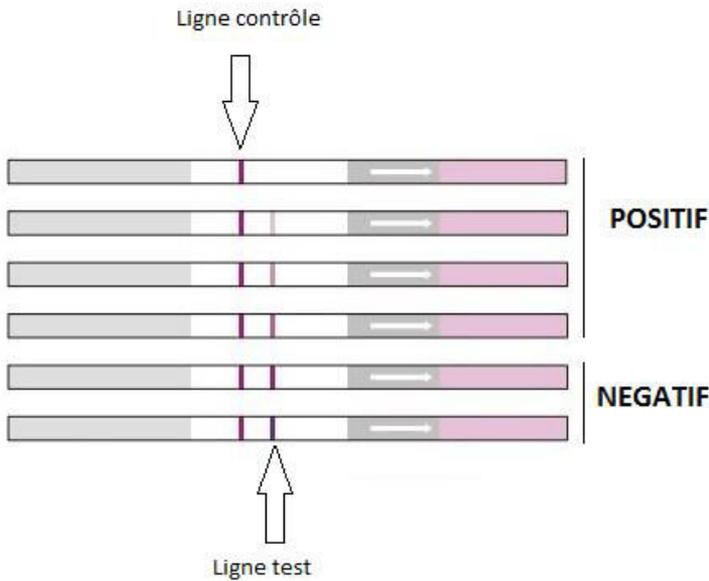


Figure 8. Illustration des résultats des tests récepteurs.



La particularité des tests récepteurs pour la détection des résidus d'antibiotiques est que de nombreux tests sont disponibles dans le commerce, en particulier pour le dépistage des bêta-lactamines dans le lait (**Tableau 4**). Ces tests sont généralement conformes aux LMR de la plupart des antibiotiques cibles dans les matrices concernées. Les résultats sont généralement disponibles entre 2 et 8 minutes après le début de l'analyse, à l'exception d'un temps plus long nécessaire pour l'analyse du miel (environ 30 minutes) [47, 48].

Les nouveaux développements de tests récepteurs pour les résidus antibiotiques sont axés sur le multiplexage, qui permet la détection de plusieurs familles d'antibiotiques simultanément, sur la même bandelette, avec plusieurs lignes (eg. Twinsensor BT®, Unisensor (Angleur, Belgique) pour les bêta-lactamines et les tétracyclines ; Quadrisensor®, Unisensor (Angleur, Belgique) pour les bêta-lactamines, les tétracyclines, la dihydrostreptomycine, la streptomycine et le chloramphénicol ; Charm Rosa® Charm Sciences, Lawrence, MA, Etats-Unis pour les bêta-lactamines et les tétracyclines).

2.2.2. Radioimmunoessais (RIA)

Les radioimmunoessais (RIA) utilisant des marqueurs radioactifs étaient la méthode d'analyse la plus répandue en termes d'immunoessais pendant des décennies. Les RIA ont été appliqués à de nombreux domaines, y compris la chimie clinique, la pharmacologie, et la surveillance de l'environnement. Cette technique nécessite un marquage préalable de l'analyte avec une molécule radioactive.

Dans le domaine de la détection des résidus d'antibiotiques dans les aliments, le test Charm II® (Charm Sciences, USA) est reconnu et encore utilisé pour le dépistage des antibiotiques. Le test Charm II® est un compteur à scintillation liquide qui permet de tester un large éventail de résidus d'antibiotiques dans les tissus, les produits laitiers, les produits d'aquaculture, les œufs, le miel, etc. Le test Charm II® en fonction des kits permet soit le dépistage spécifique d'un seul résidu, soit un dépistage multi-résidus (**Tableau 4**).

2.2.3. Méthode immunoenzymatique (ELISA) et méthode immunoenzymatique par fluorescence (FLISA)

Les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (méthode immunoenzymatique) sont aussi basés sur l'interaction d'un anticorps avec un analyte. La technique ELISA nécessite la production préalable d'un conjugué qui consiste en une enzyme couplée à un analyte. Ensuite, la détection se fait en ajoutant un substrat, qui va être transformé en un produit coloré sous l'action de l'enzyme. Les tests ELISA peuvent être développés «maison» (intra-laboratoire) ou il s'agit de kits commerciaux. Parmi les méthodes immunologiques, l'ELISA au format microplaque (96 puits) est fréquemment utilisé pour le dépistage rapide d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. De nombreux kits ELISA sont disponibles dans le commerce. La préparation de l'échantillon peut varier d'une simple dilution à une extraction liquide/liquide ou même en phase solide, en fonction des matrices et des tests.

Tableau 4. Exemples de méthodes immunologiques, commerciales ou intra-laboratoire.

Nom du test, Fournisseur		Analyte/Matrices	Références
Tests récepteurs	Beta-star®, Neogen Corporation, Etats-Unis)	Béta-lactamines/Lait	[49]
	SNAP® test, Iddex, Etats-Unis		[50]
	ROSA BL-TET®, Charm Sciences, Etats-Unis		/
	Charm MRL-3, Charm Sciences, Etats-Unis		[51]
	Delvotest BLF®, DSM, Pays-Bas		AFNOR (2012)
	Tetrasensor®, Unisensor, Belgique	Tétracyclines/Lait, miel, tissus	[48]
	Sulfasensor®, Unisensor, Belgique	Sulfamides/Lait, miel, tissus	[47]
Radio immunoessais	Charm II, Charm Sciences, Etats-Unis	Béta-lactamines/Lait	[52]
		Tétracyclines/Lait /Miel	[53] [54]
		Macrolides/Viande	[55]
		Aminosides, sulfamides/Miel	[56]
		Chloramphénicol/Miel	[57]
		Béta-lactamines, macrolides, sulfamides, aminosides, et tétracyclines/Œufs /Crevettes	[58] [59]
ELISA	Europroxima, Pays-Bas	Chloramphénicol/Muscle, œufs, lait, miel	[60]
	TECNA, Italie	Tylosine, tilmicosine/Miel	[61]
	RIDASCREEN®, r-Biopharm, Allemagne	Aminosides/Lait	[62]
	Intra-laboratoire	Métabolites de nitrofuranes/Muscle, œufs, miel, lait Muscle, chair de poissons	[63] [64]
		Sulfamides/Foie de poulet /Lait	[65] [66]
		Quinolones/Rein, produits de la mer, œufs, muscle	[67]
		Béta-lactamines/Lait	[68]
		Tétracyclines/Poissons	[69]
FPIA	Intra-laboratoire	Sulfanilamide/Lait	[70]
		Sulfaméthoxy-pyridazine et Sulfachloropyridazine/Lait	[71]
		Chloramphénicol/Lait	[72]
		Fluoroquinolones/lait	[73]

Les matrices ciblées sont nombreuses, y compris le lait, le muscle, le foie, le miel et les produits de l'aquaculture (**Tableau 4**).

Dans la majorité des cas, les tests ELISA sont ciblés sur la détection d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques. Toutefois, Adrian et al. ont développé une méthode ELISA multi-analytes pour la détection simultanée de 3 familles d'antibiotiques (sulfamides, fluoroquinolones et bêta-lactamines) dans le lait [74]. Pour cela, la microplaque a été divisée en trois sections. Dans chaque section, les puits sont greffés avec l'antibiotique spécifique (couplé à une protéine). Ensuite, le mélange des trois biorécepteurs est déposé sur toute la microplaque, avec les échantillons. Comme chaque section de la microplaque est spécifique d'une famille, le test permet d'identifier la famille d'antibiotiques présente dans l'échantillon.

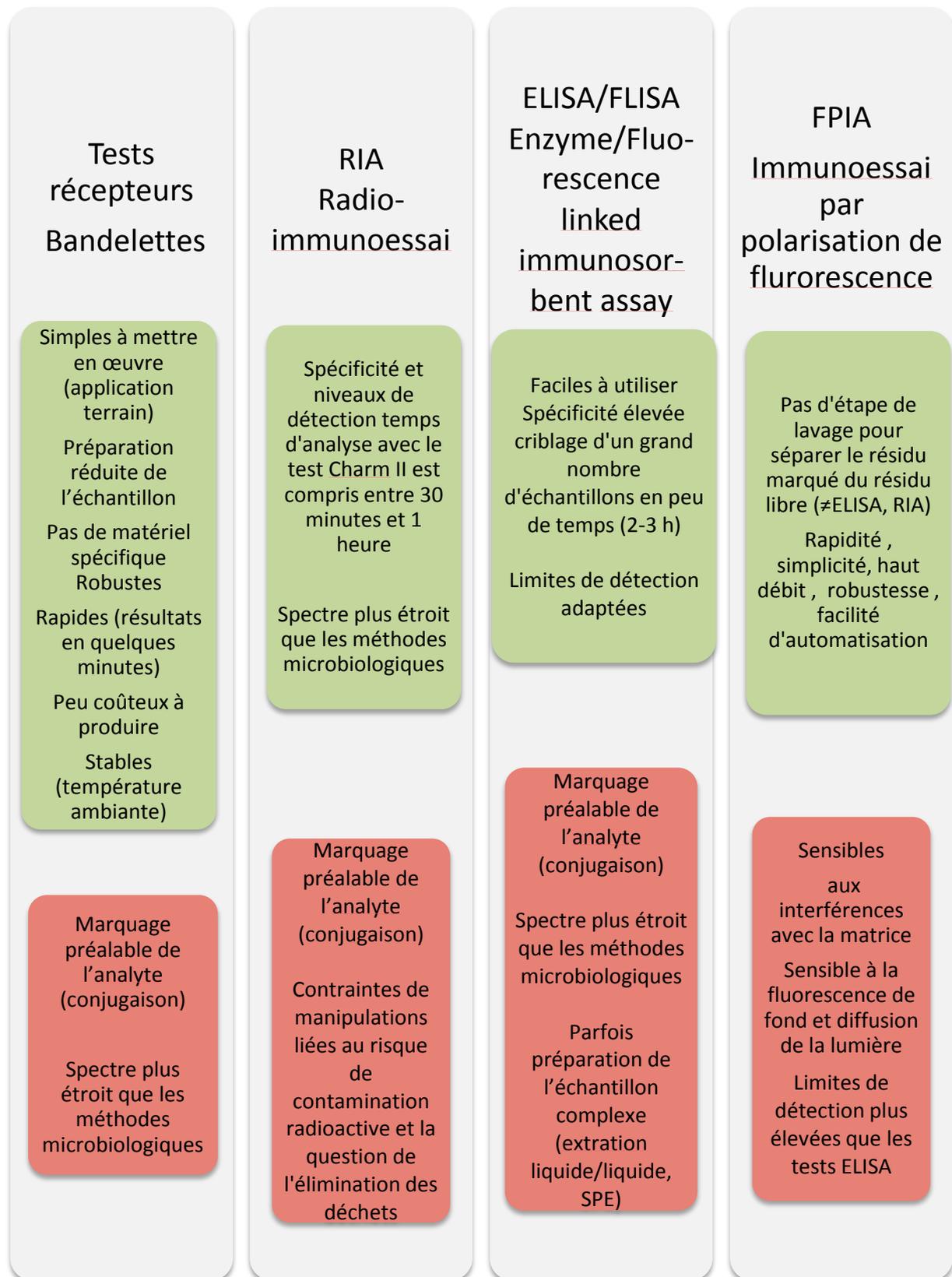
Les tests FLISA sont des dérivés de la technique ELISA. Un nouveau type d'immunoessai a été développé en utilisant deux types de capteurs (une enzyme et des boîtes quantiques (Quantum Dots (QD)) pour détecter 6 sulfamides et 11 quinolones dans le lait [75]. Les boîtes quantiques sont des nanocristaux inorganiques qui sont utilisés comme fluorophores. Elles ont été utilisées récemment comme marqueurs fluorescents dans des dosages immunologiques [76]. Les limites de détection de ces méthodes semblent satisfaisantes et l'utilisation des QD a permis de simplifier le prétraitement de l'échantillon.

2.2.4. Méthode immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA)

Le principe de détection de la FPIA est basé sur les différences de polarisation de la fluorescence de l'analyte marqué dans les fractions libres et ou les fractions liées (liaison anticorps/analyte). La première étape est le marquage de l'analyte avec un marqueur fluorescent (fluorescéine). Le résidu et le résidu marqué entrent en compétition dans le mélange réactionnel. Le degré de polarisation de la lumière fluorescente est mesuré et peut être corrélé à la quantité de résidu dans l'échantillon inconnu. Cependant, les méthodes de fluorescence peuvent être sensibles aux interférences avec la matrice. Dans ce cas, une préparation des échantillons doit normalement être réalisée, suivie d'une séparation avant la détection du fluorophore. Le premier article concernant l'application de FPIA à la détection de résidus d'antibiotiques [77].

En conclusion, les méthodes immunologiques conventionnelles de dépistage sont applicables à de nombreuses matrices, mais pour une variété d'analytes réduite. De plus, leur simplicité et leur rapidité est contrebalancée par le marquage nécessaire de l'analyte avec une enzyme ou un fluorophore (conjugaison) et souvent une trop grande spécificité (**Figure 9**).

Figure 9. Les avantages et les inconvénients des différents formats de méthodes immunologiques.



En effet, la spécificité des méthodes immunologiques par rapport aux méthodes microbiologiques, en raison de l'interaction antigène / anticorps est un avantage dans le cas de substances interdites, mais peut être un inconvénient dans le cas de substances à LMR pour laquelle un grand nombre de molécules doivent être détectées. Par exemple, concernant le dépistage des 4 métabolites de nitrofuranes (AOZ, AMOZ, SEM et AHD), 4 kits ELISA différents doivent être mis en œuvre en parallèle (un kit par métabolite), tandis qu'une méthode CL-SM/SM peut détecter les 4 résidus simultanément [78]. Le contrôle officiel est principalement réalisé par des méthodes CL-SM/SM.

En ce qui concerne le contrôle officiel des substances autorisées (substances LMR), une méthode de dépistage doit détecter une large gamme d'antibiotiques, à faible coût, et pouvoir analyser un nombre élevé d'échantillons. Par conséquent, une méthode microbiologique est finalement plus rapide et moins coûteuse que la mise en œuvre d'une série de kits ELISA pour détecter toutes les substances autorisées.

3. Méthodes innovantes :

3.1. Les biocapteurs

La technologie d'analyse basée sur des capteurs possède un champ d'application extrêmement large, dans les grands secteurs industriels, y compris les produits pharmaceutiques, les produits de santé, l'alimentation, l'agriculture, l'environnement et l'eau. En lien avec les inconvénients des méthodes conventionnelles, il y a un besoin croissant de développer des biocapteurs hautement sélectifs et efficaces pour le contrôle rapide, simple et économique d'une large gamme de molécules dans de nombreux domaines tels que l'industrie alimentaire, le diagnostic médical et la recherche. Les biocapteurs peuvent permettre de répondre à certaines de ces attentes : rapidité, fiabilité, faible coût, bon rapport qualité - prix, et simples à mettre en œuvre par du personnel peu qualifié.

Les biocapteurs sont en plein développement depuis de nombreuses années. Le champ d'application des biocapteurs d'affinité a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Le nombre de publications concernant les biocapteurs augmente chaque année. L'utilisation de biocapteurs dans le domaine du contrôle des aliments a commencé à apparaître dans la littérature vers 1980 [79-82]. Dans le domaine de la détection des résidus d'antibiotiques dans l'alimentation, les premières publications datent des années 1980 à 1990 [83-85]. Les progrès dans la conception et la fabrication de biocapteurs pour la détection des contaminants alimentaires sont présentés ici.

Les biocapteurs se composent de deux éléments principaux: un élément biorécepteur ou de biorecognition (par exemple, des anticorps), qui reconnaît l'analyte cible, et un élément de transduction de signal (par exemple, un transducteur optique) pour convertir une réponse biologique en un signal électrique [86] (**Figure 10**).

Chacun des éléments du biocapteur et chacune des étapes de la méthode a une influence sur la performance du biocapteur. Les biocapteurs peuvent être classés soit selon le type de biorécepteur, soit selon le type de transducteur (**Figure 11**).

Figure 10. Principe d'un biocapteur.

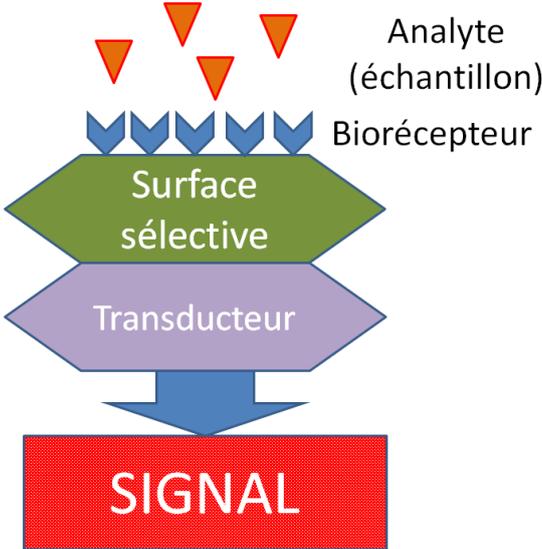
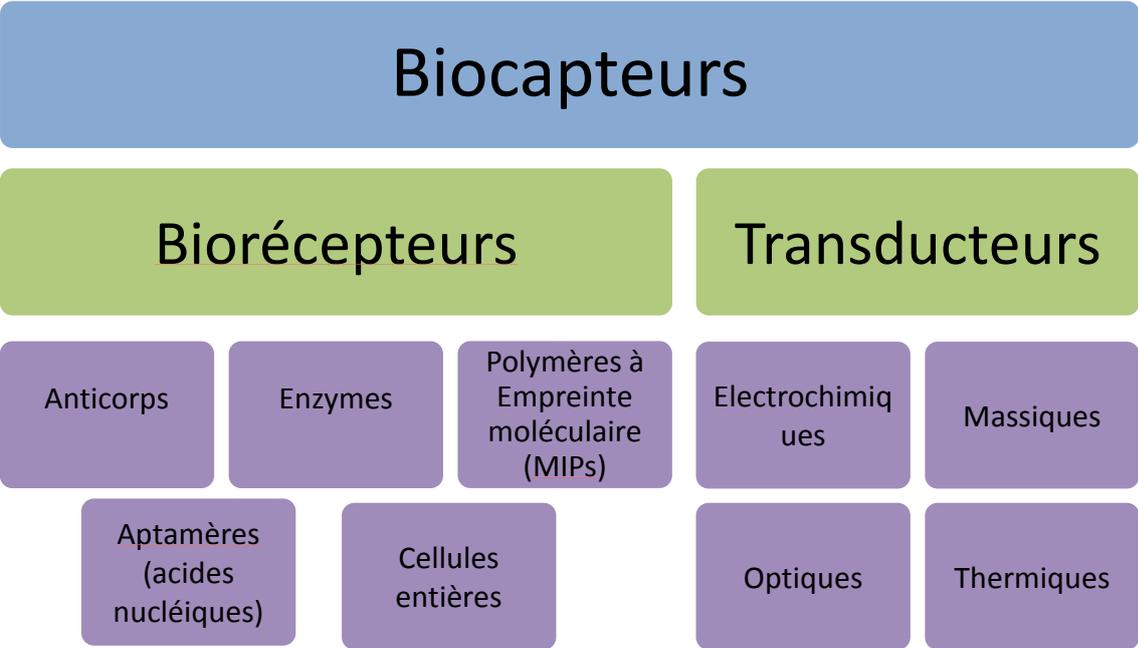


Figure 11. Les différents types de biocapteurs.



3.1.1.1. Biorécepteurs

Un biorécepteur est une espèce moléculaire biologique (par exemple un anticorps, un enzyme, une protéine, ou un acide nucléique) ou un système biologique vivant (par exemple, des cellules, des tissus ou des organismes entiers) qui utilise un mécanisme de reconnaissance biochimique [87] (**Figure 12**). Dans la base de données Scopus, le mot-clé « biosensor » a été combiné avec chaque type de biorécepteur afin d'obtenir le nombre de publications, qui est représenté dans la **Figure 13**.

3.1.1.1.1. *Anticorps*

Les anticorps sont des biorécepteurs couramment utilisés dans le développement des biocapteurs. Un anticorps spécifique correspond à son antigène unique, d'une manière hautement spécifique. Dans les biocapteurs, ils sont généralement immobilisés sur un substrat, qui agit comme la surface du détecteur. Les immunocapteurs basés sur des anticorps sont souvent décrits en combinaison avec des éléments de transduction piézo-électrique, électrochimique, ou optique. Les anticorps restent pour le moment les biorécepteurs les plus couramment utilisés pour le développement de biocapteurs, dans de nombreux domaines d'analyse, et particulièrement pour le dépistage des résidus d'antibiotiques. Différents anticorps contre les antibiotiques et autres médicaments vétérinaires sont aujourd'hui disponibles commercialement. Cependant, il n'y a aucune garantie que ces anticorps commerciaux, même les anticorps monoclonaux, seront toujours disponibles sur une longue période, avec la même qualité et en quantité suffisante. Ainsi, les méthodes développées avec ces anticorps pourraient devenir obsolètes.

3.1.1.1.2. *Enzymes*

Bien que les enzymes soient l'un des éléments de biorecognition, ils sont principalement utilisés pour fonctionner comme des marqueurs plutôt que comme l'élément de biorecognition en tant que tel. Les biocapteurs basés sur des enzymes reposent principalement sur deux mécanismes pour la détection. Le premier mécanisme implique la transformation catalytique d'un analyte par l'enzyme (généralement d'une forme non détectable à une forme détectable). Le second mécanisme implique la détection d'analytes qui inhibent ou modèrent l'activité de l'enzyme. Les biocapteurs enzymatiques utilisent des enzymes spécifiques pour la capture et la production catalytique du produit, qui est alors directement déterminé en utilisant un transducteur (*eg.* électrochimique, optique). Le biocapteur enzymatique le plus répandu aujourd'hui est le biocapteur pour la détection du glucose dans le sang. Son application pour les patients diabétiques a été l'élément déclencheur et moteur pour la recherche sur ce type de capteur.

Dans l'analyse des contaminants, les biocapteurs enzymatiques pour l'analyse des herbicides sont les plus courants, avec moins d'applications signalées pour les antibiotiques. Un biocapteur enzymatique a été développé pour détecter la pénicilline [88]. La pénicillinase est produite par des bactéries transformées (*Escherichia coli* JM109), qui ont été immobilisées sur une l'électrode d'un pH-mètre. Ce biocapteur répondait à des concentrations de pénicilline faibles (10^{-1} à 10^{-4} M) en solution. Ce biocapteur n'a pas été appliqué à des matrices alimentaires, plus complexes.

Figure 12. Les différents types de biorécepteurs immobilisés sur les surfaces des biocapteurs.

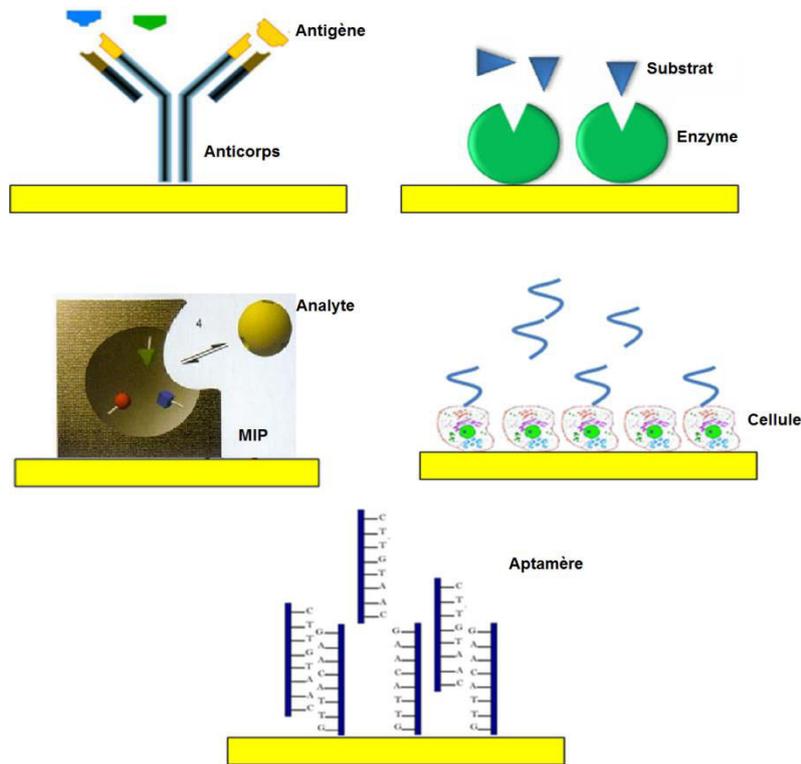
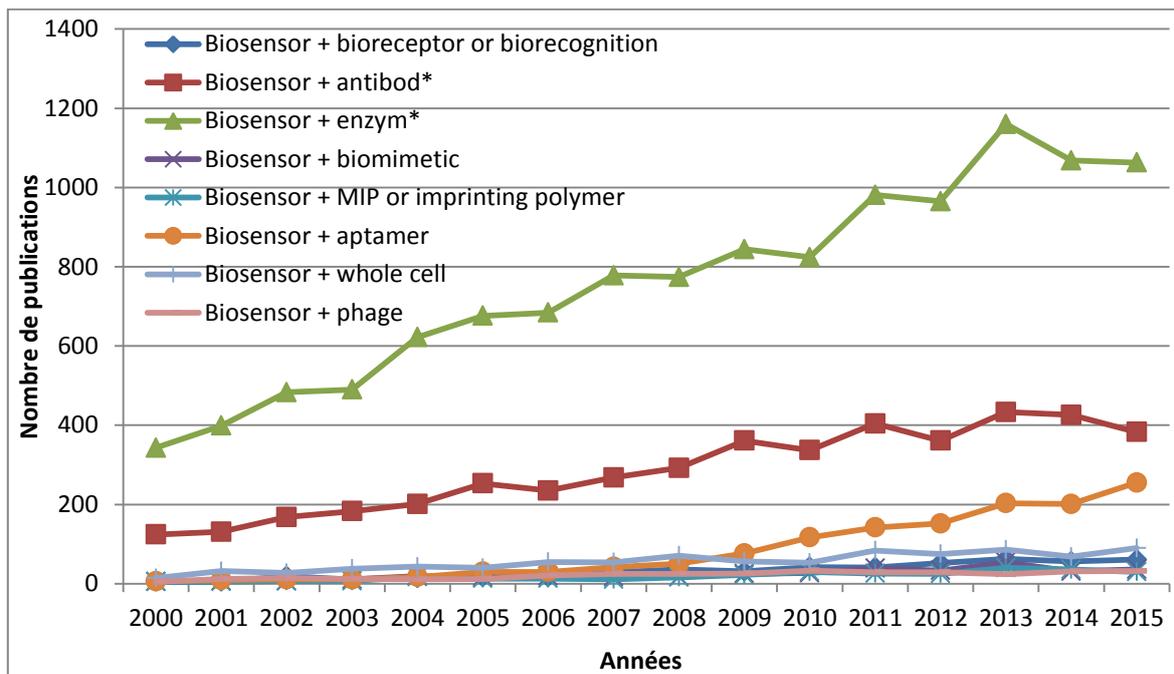


Figure dérivée de https://radium.net.espci.fr/esp/CONF/2006/C06_01/conf01_2006.htm et de Perumal & Haschim [89].

Figure 13. Evolution du nombre d'articles (Scopus) concernant les biorécepteurs de 2000 à 2015.



3.1.1.1.3. Récepteurs biomimétiques

Un récepteur qui est conçu pour imiter un récepteur biologique naturel est appelé un récepteur biomimétique. Les récepteurs biomimétiques artificiels, tels que les aptamères et les polymères à empreinte moléculaire, montrent des propriétés proches de celles des anticorps telles qu'une affinité élevée et la sélectivité.

Les récepteurs biomimétiques sont une classe prometteuse de récepteurs synthétiques pour le dépistage des résidus d'antibiotiques en particulier. Dans la bibliographie, ils font l'objet d'un nombre croissant d'articles depuis les années 2000 dans plusieurs domaines, tels que la recherche de bactéries pathogènes, de contaminants environnementaux ou dans le diagnostic clinique (**Figure 13**).

Polymères à empreinte moléculaire (Molecular Imprinting Polymer ou MIP)

Une molécule empreinte (« template ») est la molécule qu'on introduit dans le mélange de prépolymérisation pour la synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire (MIP) [90] (**Figure 14**). Elle correspond à la molécule cible du biorécepteur. Le site de reconnaissance pour la molécule cible, formé dans la cavité du MIP, est libéré par l'élimination de la molécule empreinte. Les MIP sont principalement utilisés pour la détection de petites molécules, telles que les antibiotiques. Depuis une dizaine d'années, les MIP sont développés pour différents contaminants alimentaires et en particulier les antibiotiques [91-93].

Aptamères (acides nucléiques)

Les aptamères sont des ligands d'ARN ou d'ADN simple brin qui sont sélectionnés pour reconnaître différentes cibles à partir d'une immense bibliothèque de molécules contenant des séquences créées au hasard. La production d'aptamères a été décrite pour la première fois au début des années 1990. La technologie de sélection des aptamères appelée SELEX (Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel ; Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) est une technologie intégrée basée sur la chimie combinatoire, la technique de PCR (réaction en chaîne par polymérase ; Polymerase Chain Reaction), et le séquençage de gènes [94] (**Figure 15**). Des cycles répétés sont effectués de sorte que les séquences spécifiques augmentent de façon exponentielle et que les séquences ayant une faible affinité sont éliminées. Les aptamères sont adaptés pour la reconnaissance de petites molécules, mais aussi de composés de poids moléculaire élevé et même de cellules entières. Les aptamères sont stables, réutilisables, facilement modifiables pour l'immobilisation sur une surface, avec une bonne affinité. De plus, ils sont très spécifiques de l'analyte cible et sont produits *in vitro*.

Les biocapteurs utilisant un aptamère comme élément de reconnaissance sont appelés « aptasensors ». Les applications en matière de sécurité alimentaire sont très diverses. Certains « aptasensors » ont été développés pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale (*eg.* aminosides [95], chloramphénicol [96], oxytétracycline [97]), ampicilline [98], sulfadiméthoxine [99], colorants organiques (vert de malachite) [100]).

Figure 14. Processus de fabrication d'un MIP (extrait de <http://www.icoa.fr/fr/>).

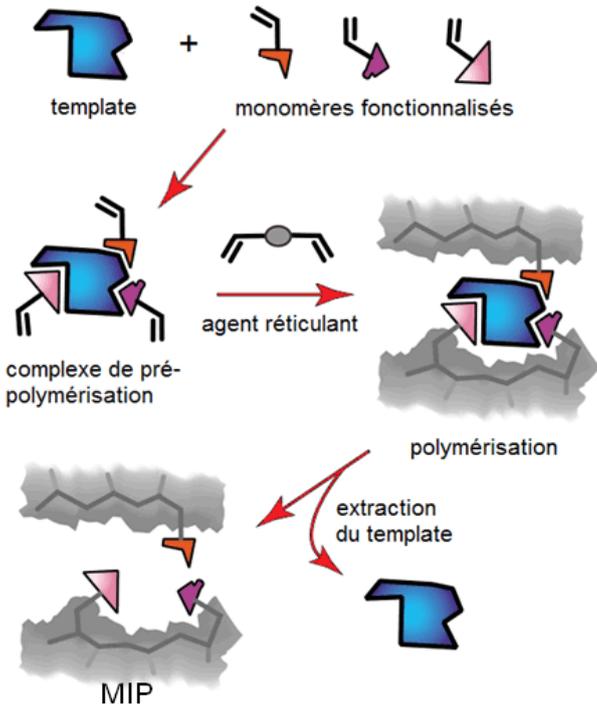
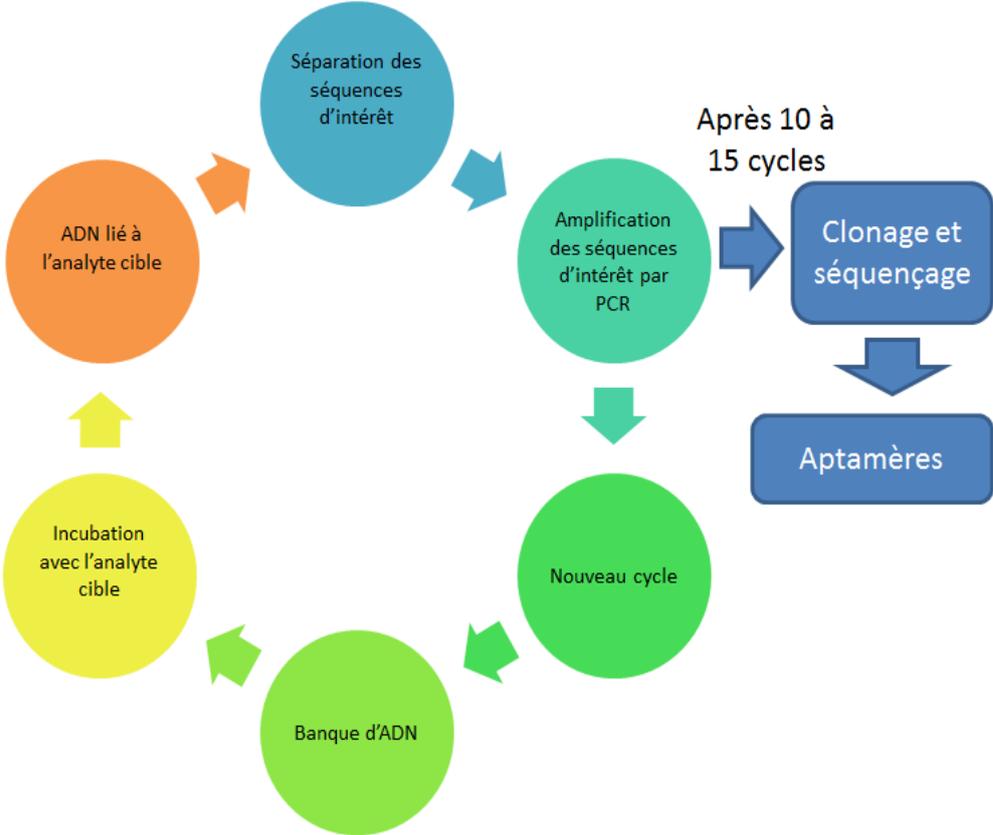


Figure 15. Processus de fabrication d'un aptamère.



Les biorécepteurs alternatifs, de type MIP et aptamères, présentent l'avantage de pouvoir être préparés *in vitro*, évitant ainsi de travailler sur des animaux, et permettant de produire des outils de reconnaissance pour des molécules non immunogènes et toxiques. Les aptamères et les MIP sont plus stables que les anticorps dans des conditions environnementales parfois drastiques, ce qui est important si on veut faire du contrôle *in situ*. De plus, le coût de l'analyse est réduit du fait de la durée de vie longue du biocapteur.

La marge de progression la plus visible parmi les récepteurs biomimétiques est celle du développement des aptamères, sans doute grâce à leurs nombreux avantages. L'inconvénient majeur des MIP et des aptamères est que le développement commercial de ces biorécepteurs en est encore à ses débuts [101-103]. Des colonnes de préparation des échantillons, pour extraction en phase solide SPE (Solid Phase Extraction) sont commercialisées, pré-greffées avec des MIP pour la détection de résidus d'antibiotiques (*eg.* Sigma-Aldrich (France) pour le chloramphénicol, les quinolones), mais les MIP seuls ne sont pas disponibles commercialement.

3.1.1.1.4. Le type cellulaire

Un biocapteur microbien est constitué d'un transducteur en liaison avec des cellules microbiennes immobilisées, viables ou non viables. Les biocapteurs cellulaires utilisent la réponse de cellules entières pour la détection d'agents biologiquement actifs. Une revue de l'utilisation de cellules microbiennes comme éléments de détection biologique dans les biocapteurs a été publiée en 2001 [104]. Les biocapteurs microbiens sont un domaine de recherche en plein essor. Actuellement, différentes espèces microbiennes contenant des gènes appelées rapporteur (« reporter ») et qui sont spécifiquement induits par des promoteurs sélectionnés sont utilisées dans le développement de biocapteurs cellulaires. En présence de l'analyte cible, le gène inductible est activé et active ou réprime l'expression d'un gène rapporteur qui est responsable de la production d'un signal optique qui est donc mesurable. Par conséquent, les biocapteurs cellulaires microbiens basés sur une détection optique sont particulièrement intéressants dans le criblage à haut débit, car ils peuvent être utilisés pour contrôler simultanément plusieurs analytes.

La sélection d'une culture bactérienne appropriée est essentielle, comme dans les méthodes microbiologiques conventionnelles, puisque les bactéries spécifiques utilisées dans des biocapteurs ont des spectres caractéristiques qui peuvent ou peuvent ne pas correspondre avec le spectre de composés qu'on souhaite détecter.

Une revue a été publiée sur les progrès récents dans la fabrication et l'application des biocapteurs microbiens basés sur différents types de transducteurs pour la détection d'une large gamme d'analytes dont le glucose, les herbicides, et les antibiotiques [105]. Des biocapteurs cellulaires ont été développés pour la détection des résidus d'antibiotiques (tétracyclines [106, 107], bêta-lactamines [107-111], quinolones [110], chloramphénicol et quinolones [111]). La plupart des biocapteurs cellulaires présentés récemment la détection des résidus d'antibiotiques permettent la détection simultanée de plusieurs analytes en 30 minutes à 3 heures. Les avantages et les inconvénients de ces différents types de biorécepteurs sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Avantages et inconvénients des différents types de biorécepteurs.

		Avantages	Inconvénients
Anticorps	Monoclonaux	Spécificité large Quantité illimitée et reproductibilité Fortes affinités	Coût élevé Fortes affinités
	Polyclonaux	Coût faible	Spécificité trop forte Quantité limitée et manque de reproductibilité
Enzymes		Généralement plus précis Réponses plus rapides (courts trajets de diffusion) que les capteurs utilisant des cellules comme biorécepteur	Instabilité intrinsèque Coût de production > anticorps Performance variable (eg. pH, température, épaisseur de la couche d'enzyme sur le capteur)
B I O R E C E P T E U R S	MIP	Affinités et spécificités équivalentes ou ↑ /aux anticorps, thermostabilité Sensibilité↑ Réutilisable Production : coût ↓/anticorps, simple, rapide, reproductible	Risque de relargage de la molécule empreinte Insolubilité Peu de cavités imprimées du MIP correspondent vraiment à la molécule empreinte Pas commercialisés
	Aptamères	Fortes affinités Spécificité ↑, sensibilité↑ Stabilité (molécule, surfaces immobilisées (> anticorps > enzymes)) Réutilisable Production : coût ↓/anticorps, simple, reproductible, automatisable	Fortes affinités Très peu commercialisés
Cellules		Plusieurs analytes simultanément Sélectivité ↑ Capacité à métaboliser une large gamme de composés chimiques Capacité d'adaptation (conditions défavorables) Modifications génétiques (eg. mutation), Source économique d'enzymes intracellulaires Limites de détection faibles Potentiel haut débit d'analyses	Sélection, culture et entretien complexe Parfois problème de sélectivité (réponse cellulaire non spécifique (eg. réactions secondaires, catalysées par d'autres enzymes)) Spécificité ↓ / enzymes pures Temps de réponse lents / biocapteurs enzymatiques (Diffusion du substrat et des produits à travers la paroi cellulaire)

3.1.1.1.5. Immobilisation des biorécepteurs sur les surfaces d'interaction

De cette immobilisation et de la préparation de la surface du transducteur dépendent la spécificité, les limites de détection atteintes par le biocapteur ainsi fabriqué et sa stabilité. En effet, le biorécepteur doit être accessible pour l'interaction et actif biologiquement (non dénaturé). Tous ces biorécepteurs sont immobilisés sur le transducteur de différentes manières (**Tableau 6**).

3.1.1.1.6. Les nouveaux biorécepteurs

Les éléments de reconnaissance peuvent constituer le facteur limitant dans les développements de nouveaux biocapteurs. C'est pourquoi de nombreuses recherches sont ciblées sur le développement de nouveaux éléments de bio reconnaissance, qui doivent être spécifiques ou sélectifs, très stables, peu coûteux à fabriquer, et reproductibles. Les tendances futures sont le développement de nouveaux biorécepteurs ou l'amélioration de biorécepteurs existants. Des exemples de nouveaux biorécepteurs récemment mis au point sont donnés ci-dessous :

- Les afficorps (ou « affibodies ») sont des protéines de liaison synthétiques qui présentent des caractéristiques intéressantes (*eg.* petite taille, robustesse, stabilité, forte spécificité), par rapport aux anticorps classiques [112]. A ce jour, les afficorps sont utilisés principalement dans le domaine de l'imagerie et du diagnostic médical (*eg.* cancer) et pour des applications thérapeutiques, et très récemment pour le développement de biocapteurs [113].
- Des liposomes couplés à une surface de polydiacétylène (PDA) ont été conçus pour le dépistage des aminosides. Le mécanisme de détection imite les interactions membranaires cellulaires entre la néomycine et les phospholipides [114].
- Un aptamère développé pour la reconnaissance de résidus d'aminosides a été modifié grâce à différentes approches [115]. L'objectif était de travailler sur la structure des aptamères afin que la reconnaissance aptamère-analyte conduise à des changements de conformation plus importants et donc plus faciles à détecter. Les biocapteurs ainsi développés, en combinant l'amélioration de la partie transduction électrochimique et celle de l'aptamère ainsi modifié, ont permis de diminuer les limites de détection par 100.
- Selon un principe similaire, un MIP permettant la détection du métronidazole a été modifié afin d'être à la fois l'outil de reconnaissance de l'analyte, mais aussi l'enzyme pour la détection du signal électrochimique [116].
- Les nanozymes [117] combinent le développement de nouveaux biorécepteurs et les nanotechnologies [117-119]. Les nanozymes qui miment l'activité de l'enzyme, sont plus robustes, plus stables et moins coûteuses à produire que les enzymes naturelles. A ce jour, les nanozymes ont été développées principalement pour des applications biomédicales (*eg.* glucose) et environnementales (*eg.* pesticides [120]).

Tableau 6. Les différentes techniques d'immobilisation des biorécepteurs sur les surfaces.

	Principe	Avantages	Inconvénients
Adsorption	Forces de Van der Waals	Simplicité, non dénaturation du biorécepteur	Instabilité (pH, force ionique, température, solvant)
Inclusion	Immobilisation physique au sein d'une matrice polymère (eg. polyacrylamide)	Activité enzymatique préservée (pas de liens chimiques)	Risque d'altération des biorécepteurs Risque de gêner l'accessibilité du site actif du biorécepteur
Confinement	En solution derrière une membrane sélective (eg. membrane à dialyse)	Biodégradation ou contaminations limitées	Complexe à mettre en œuvre Risque de gêner l'accessibilité du site actif du biorécepteur
Immobilisation covalente	Couplage covalent (support préalablement activé)	Grande stabilité Contraintes diffusionnelles réduites	Risque d'altération des biorécepteurs Technique laborieuse
Immobilisation par réticulation	Fabrication de membranes insolubles dans l'eau et qui s'adsorbent sur une surface solide	Stabilité (relargage du ligand difficile)	Risque de perturber la cinétique enzymatique (problèmes de diffusion dans la membrane) Risque d'altération des biorécepteurs
Immobilisation par affinité	Affinité entre deux molécules (eg. streptavidine/biotine ($k_d \sim 10^{-15}M$), presque autant qu'une liaison covalente)	Stabilité Conditions de régénération plus drastiques (à partir du moment où le biorécepteur ne perd pas son activité) Même orientation pour tous les biorécepteurs	Interférence potentielle entre le biorécepteur modifié (eg. biotinylé) et des composants naturels (eg. Biotine naturellement présente dans certains tissus (eg. lait, foie, œufs, ...)) Interférence potentielle entre la molécule de liaison (eg. avidine ou streptavidine) et des composants naturels (eg. œufs)

Constante de dissociation : k_d .

Figure 16. L'évolution du nombre annuel de publications sur les biocapteurs dans la base de données Scopus de 2000 à 2015.

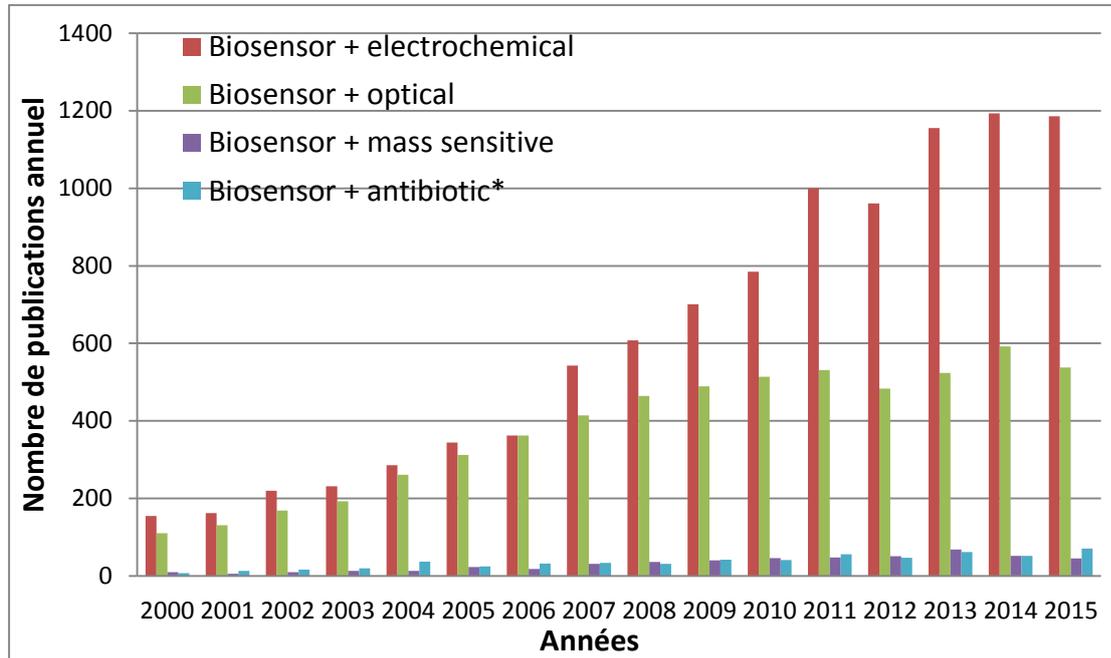
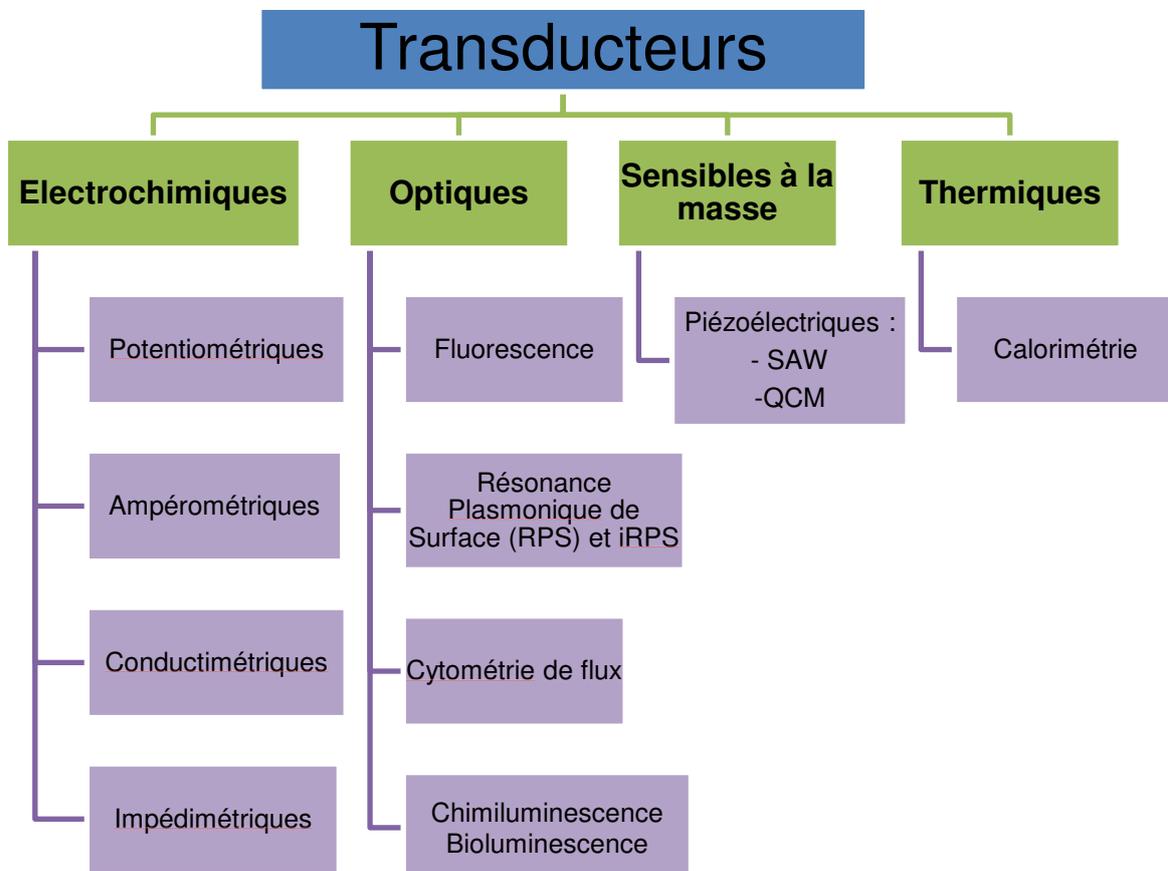


Figure 17. Différentes classes et sous-classes de biocapteurs, en fonction du type de transducteur.



3.1.1.2. Transducteurs

Dans cette section, la classification est basée sur le type de transducteur. De nombreux modes de transduction ont été développés dans la dernière décennie. Bien qu'il existe des développements constants de nouveaux types de transducteurs, les transducteurs optiques, électrochimiques et ceux basés sur le changement de masse sont présentés ici car ce sont les méthodes les plus populaires et fréquemment citées dans le domaine du dépistage des contaminants alimentaires et plus particulièrement des résidus d'antibiotiques (**Figure 16**). Chacune de ces trois classes principales contient de nombreuses sous-classes différentes (**Figure 17**).

Les différents types de transducteurs présentent chacun des avantages et des inconvénients qui vont être discutés ci-dessous.

3.1.1.2.1. *Transducteurs électrochimiques*

Le principe des biocapteurs électrochimiques repose sur l'immobilisation de biorécepteurs sur une électrode. Des réactions chimiques entre les biorécepteurs immobilisés au contact direct d'un élément de transduction électrochimique et des analytes cibles produisent ou consomment des ions ou des électrons. Les propriétés électriques de la solution sont affectées et un signal est mesuré, par exemple un courant électrique (ampérométrie) ou un potentiel (potentiométrie) [121, 122]. Ce type de biocapteur est un système capable de fournir une détection spécifique quantitative [122]. L'élément de reconnaissance biologique, est très souvent une enzyme (parfois immobilisée sur l'électrode, mais pas nécessairement), ou parfois une membrane ou une surface sensible à une espèce électrochimique donnée.

Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques pour convertir l'information chimique en un signal électrique mesurable [121, 122] (**Tableau 7**).

La technique de détection électrochimique a commencé son développement au début des années 1950. Aujourd'hui, cela reste le procédé le plus populaire pour détecter l'oxygène et les gaz toxiques tel que le monoxyde de carbone. Les dispositifs potentiométriques les plus courants sont les électrodes de pH. Le premier article concernant le développement d'un biocapteur électrochimique pour la détection de résidus d'antibiotiques (l'amphotéricine B et la nystatine) a été publié en 1979 [84]. Depuis, de nombreux articles ont été publiés concernant la production de biocapteurs électrochimiques, parmi les différents types présentés. Des exemples fournis dans le **Tableau 8** illustrent quelques applications de ces biocapteurs pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.

Tableau 7. Principes, avantages et inconvénients des différents types de transducteurs électrochimiques.

	Principe	Avantages	Inconvénients
Ampérométrie	Electrodes (Au, C, Pt) aux enzymes Oxydation ou réduction électrochimique d'une espèce électro-active => Mesure du courant résultant	Simplicité Automatisation Miniaturisation Très sensibles Coût ↓ Plus adaptés à la production de masse que les transducteurs potentiométriques	Marquage de l'analyte pour augmenter la réaction électrochimique à l'électrode de travail
Potentiométrie	Electrodes redox ou sélectives aux ions (ISE) ou Transistors à effet de champ (FET) Détection d'un ion produit par une réaction enzymatique => Mesure d'une différence de potentiel entre 2 électrodes	Sans marquage Simplicité Automatisation facile Miniaturisation de l'instrumentation Coût ↓	Manque de spécificité (eg. autres ions en solution) Effet de la force ionique à des concentrations élevées Dérive possible du signal Moins sensible et plus lent qu'ampérométrie
Conductimétrie	Electrodes de Pt ou Au Réactions biochimiques produisant ou consommant spécifiquement des ions => Mesure la conductivité électrique d'une solution à tension constante	Simplicité Coût ↓ Biocompatibilité avec échantillons biologiques Pas d'électrode de référence Miniaturisation possible	Manque de spécificité (Interférence potentielle d'autres ions en solution) Moins sensible / potentiométrie et ampérométrie
Impédancemétrie ou impédimétrie	Mesure la variation de la résistance et/ou de la capacité interfaciale entre la surface de l'électrode et une solution	Sans marquage Très sensibles Simple, rapide Coût ↓	Mauvaise reproductibilité => pas d'analyse quantitative de routine

Or : Au ; Carbone : C ; Platine : Pt.

Les biocapteurs conductimétriques et capacitifs sont en général peu utilisés et encore moins pour le dépistage des antibiotiques [123]. L'un des inconvénients majeurs des biocapteurs impédimétriques est une mauvaise reproductibilité, ce qui empêche leur application dans l'analyse quantitative de routine. Par contre, ils pourraient potentiellement être utilisés pour des analyses qualitatives [124].

La technologie de multiplexage permet de multiplier le nombre de paramètres mesurés pour un seul échantillon et en utilisant un seul outil analytique. Plusieurs analytes peuvent être détectés simultanément dans un même échantillon. Le multiplexage peut s'appliquer aux biocapteurs électrochimiques. Par exemple, Conzuelo et *al.* ont développé une méthode de détection simultanée et rapide de trois familles d'antibiotiques dans le lait [125]. Le multiplexage vient de l'utilisation de plusieurs billes magnétiques greffées avec trois biorécepteurs différents pour la détection des 3 familles d'analytes.

Parmi les diverses méthodes de transduction, les techniques électrochimiques sont étudiées en raison de leurs **avantages potentiels tels que le faible coût, la simplicité, la rapidité, la miniaturisation de l'instrumentation et la portabilité**. Parmi eux, les biocapteurs ampérométriques représentent une alternative prometteuse dans le développement de dispositifs pour l'analyse sur le terrain.

Tableau 8. Exemples de biocapteurs électrochimiques pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.

	Analyte	Matrice	Biorécepteur	Surface d'interaction	Enzyme ou composition de la membrane	Durée de l'essai (min)	Référence
Ampérométrique	SULF	Lait	Anticorps	SPCE	HRP	30	[126]
	TCYC	/	Induction d'un gène par un promoteur	Electrode de platine	Expression d'une enzyme (eg. β -galactosidase)	/	[127]
	BL	Lait	PBP	SPCE	HRP	30	[128]
	CEPH, SULF, TCYC	Lait	Anticorps + PBP	Billes magnétiques	HRP	5	[125]
Potentio-métrique	QNL, TTC	Lait	Cellules entières <i>E. coli</i>	Pile galvanique	/	120	[129]
	Erythromycine	Lait, miel	MIP	Electrodes Au + NP Au	/	/	[130]
	Pénicilline G	Lait	Pénicillinase	Electrode Platine	Film de polytyramine	1-2	[131]
Impédance-métrique et conducti-métrique	Pénicilline G	Lait	Anticorps	Electrode en or	SAM	20-25	[132]
	CAP	Crevettes	Anticorps	Nanoparticules d'or	SATUM	30	[133]
	Néomycine	Lait	Anticorps	SWNT	Papier filtre	10	[134]
	Ampicilline, kanamycine A	Lait	Aptamère	Electrode	PEDOT	2-3	[135]

Béta-lactamines (BL); Céphalosporines (CEPH); Sulfamides (SULF); Tétracyclines (TCYC); Quinolones (QNL); Chloramphénicol (CAP); Protéine de liaison à la pénicilline (PBP); Péroxydase de Raifort (HRP); Escherichia coli (E. coli); Electrodes de carbone imprimées (Screen Printed Carbon Electrodes ou SPCE); Polymère à Empreinte Moléculaire (Molecularly Imprinted Polymer ou MIP); Nanoparticules d'or (NP Au); Monocouche auto-assemblée (Self Assembled Monolayer ou SAM); Monocouche auto-assemblée de thiourée (Self-assembled thiourea monolayer ou SATUM); Nanotube de carbone simple paroi (Single-wall carbon nanotube ou SWNT); Polymère de 3,4-ethylenedioxythiophene (PEDOT).

3.1.1.2.2. *Transducteurs sensibles à la masse ou massiques*

Les biocapteurs massiques sont aussi appelés biocapteurs gravimétriques. Un biocapteur sensible à la masse répond à la variation de la masse sur une surface par un changement de propriété du matériau support, par unité de temps. Les méthodes de transduction mécanique sont principalement basées sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques (**Figure 18**).

- Les transducteurs à onde acoustique sont classifiés selon le mode de propagation de l'onde au travers ou en surface du matériau piézoélectrique. Le mode de propagation affecte de manière drastique les performances du transducteur et influe sur sa fabrication. La piézoélectricité correspond à la charge électrique qui s'accumule dans certains matériaux solides (notamment des cristaux, des céramiques et certaines matières biologiques tels que l'os, l'ADN et diverses protéines) en réponse à des pressions (changement de masse à la surface).

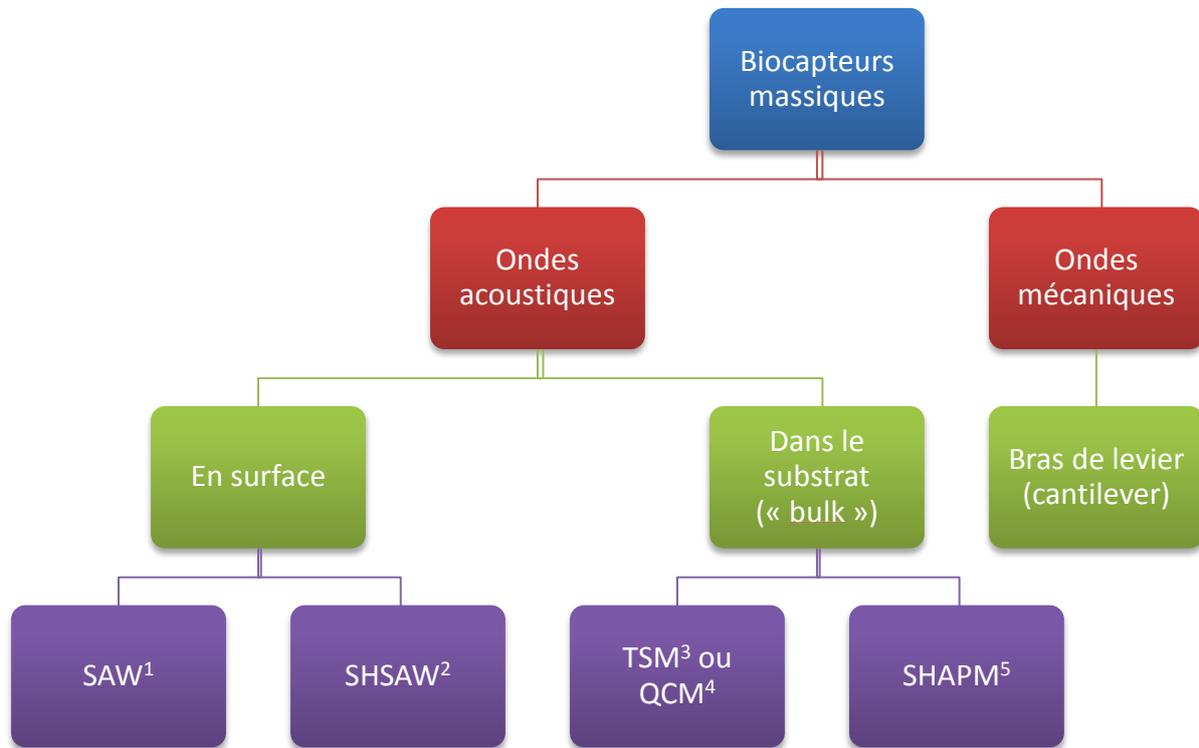
Parmi les quatre catégories de transducteurs à ondes acoustiques définies, les résonateurs TSM sont de loin les plus populaires dans les biocapteurs, et sont mieux connus sous le nom de microbalance à cristal de quartz (QCM ou Quartz Crystal Microbalance) [87]. -Le succès de la transduction par TSM, en fait, un outil de référence pour la détection sans marquage de biomolécules. Les biocapteurs massiques peuvent aussi utiliser des dispositifs à ondes acoustiques de surface (SAW ou Surface Acoustic Wave).

- Les transducteurs à onde mécanique sont appelés à bras de levier (ou cantilever).

Les biocapteurs à bras de levier sont des capteurs électromécaniques ultra sensibles utilisés pour la détection sans marquage d'un grand nombre d'entités biologiques. Un cantilever est une poutre ancrée à une seule extrémité. Le changement de masse à l'extrémité de la poutre est détecté par un phénomène optique (amplitude d'oscillation) (**Figure 19**). Les cantilevers en mode dynamique répondent aux interactions biochimiques se produisant à la surface par des changements de fréquence de résonance. Au cours des quinze dernières années, grâce aux progrès de la miniaturisation, les biocapteurs à base de microcantilever (MCL) sont en train de devenir un outil sensible pour la détection chimique et biologique.

Les trois principaux types de transducteurs sensibles à la masse, les plus fréquemment utilisés pour le dépistage des résidus d'antibiotiques, sont présentés dans le **Tableau 9**.

Figure 18. Classification des biocapteurs massiques.



¹ Ondes acoustiques de surface (SAW) ; ²Ondes acoustiques de surface à cisaillement horizontal (SHSAW) ;
³ Résonateurs «thickness shear mode» ou à cisaillement d'épaisseur (TSM) ; ⁴ Microbalance à cristal de quartz (=QCM) ; ⁵Transducteurs « shear-horizontal acoustic plate mode » (SHAPM) ou à mode de plaque acoustique à cisaillement horizontal.

Figure 19. Représentation schématique d'un immunoessai basé sur l'utilisation d'un biocapteur de type cantilever (Lin *et al.* 2006) [136].

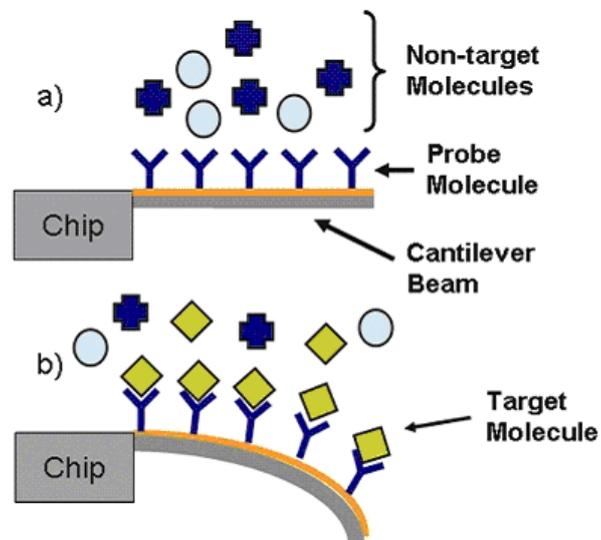


Tableau 9. Principes, avantages et inconvénients des différents types de transducteurs sensibles à la masse.

	Principe	Avantages	Inconvénients
Piézoélectriques Microbalance à cristal de quartz (QCM)	Perturbation de la propagation d'une onde acoustique	Sans marquage [137] Matériaux stables, chimiquement inertes, caractéristiques mécaniques et de vieillissement Détection de petits changements de masse (petites molécules) Films de surface sélectifs	
Piézoélectriques Onde acoustique de surface (SAW)		Rapide (mesures en temps réel) et simple Fabrication simple, peu coûteuse Multi-analytes simultanés (micropuces)	Manque de sensibilité et de spécificité Sensibilité aux perturbations extérieures
Bras de levier (Cantilever)	Transforme un signal chimique en un mouvement mécanique	Sans marquage Simple Rapide Limites de détection basses Fabrication simple, peu coûteuse Multi-analytes simultanés (micropuces) Préparation de l'échantillon simple	

Une revue des différents types d'analytes mesurables par les biocapteurs de type QCM a été publiée [138]. Les biocapteurs piézoélectriques permettent la détermination rapide et simple de petites molécules telles que les médicaments, les hormones et les pesticides. Cependant, il y a très peu de publications dans la littérature concernant l'utilisation de biocapteurs piézoélectriques pour détecter les résidus d'antibiotiques ou d'autres contaminants alimentaires. Un biocapteur QCM a été développé pour le dépistage du chloramphénicol, mais seulement en solution, pas dans une matrice [139]. Cette technique est rapide, à faible coût et ne nécessite pas de marquage. Une autre équipe a aussi travaillé sur un biocapteur QCM pour le dépistage des résidus de chloramphénicol dans plusieurs matrices (lait, viande, œufs, miel) [140]. Les niveaux de détection annoncés à 5 et 10 µg/kg sont très supérieurs à la LPMR du CAP (0,3 µg/kg). En outre, un autre équipe a développé un biocapteur QCM, basé sur un MIP comme élément de biorecognition, pour le dépistage du CAP dans le muscle de porc, le lait, le miel et les crevettes [141]. Le biocapteur a été capable de détecter le CAP dans le miel et dans les crevettes à des concentrations inférieures à la LPMR du CAP.

Le principe d'un immunoessai développé sur un biocapteur SAW est schématisé dans la **Figure 20**. Des biocapteurs SAW sont disponibles sur le marché (eg. samX®, NanoTemper Technologies GmbH (Allemagne)). Les biocapteurs à ondes acoustiques de surface (SAW) peuvent être utilisés pour détecter des analytes de faible poids moléculaire, tels que les résidus d'antibiotiques. Des méthodes de dépistage pour des résidus d'antibiotiques, basées sur des biocapteurs SAW, ont été développées par exemple pour la pénicilline dans le lait [142] et pour la fluméquine dans l'eau [143].

Des biocapteurs de type cantilever ont aussi été développés pour le dépistage de résidus d'antibiotiques tels que l'oxytétracycline en solution [144] ou la kanamycine en solution [145].

Malgré leurs potentialités, les biocapteurs massiques en général restent peu utilisés à ce jour pour le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires. Toutefois, le développement des micropuces (ou « microarrays ») pourrait amplifier leur utilisation dans le domaine de la bioanalyse particulièrement. Les micropuces ont été développées afin de combiner des dizaines, voire des centaines de micro-points (ou spots) sur une seule surface ou puce, permettant ainsi de faire plusieurs immunoessais en parallèle. En général, une puce est constituée d'un réseau de plusieurs biocapteurs, qui peuvent être contrôlés individuellement. Plusieurs biocapteurs massiques de même type peuvent ainsi être combinés sous forme de micropuces, grâce aux progrès de la miniaturisation. Nous parlerons alors de technologie de multiplexage, ce qui permet la détection simultanée de plusieurs analytes, en une seule analyse. Cette technologie permet aussi d'augmenter considérablement le débit d'échantillons, de réduire la durée d'analyse et les coûts. En outre, les méthodes multiplex permettent d'obtenir une large sélectivité. Le plus souvent, les biocapteurs multiplex nécessitant une faible préparation de l'échantillon. Il faut toutefois prêter attention aux interactions non spécifiques entre les différents analytes cibles et d'autres analytes ou composants de la matrice.

Les biocapteurs cantilever sont de plus en plus utilisés pour le screening haut débit de nouveaux principes actifs [146]. Quelques applications récentes pour le dépistage de résidus d'antibiotiques ont été trouvées dans la littérature (oxytétracycline en solution [144], kanamycine en solution [145], vancomycine dans du sérum [147]).

Figure 20. Représentation schématique d'un immunoessai développé sur un biocapteur SAW (Sang *et al.* 2013) [148].

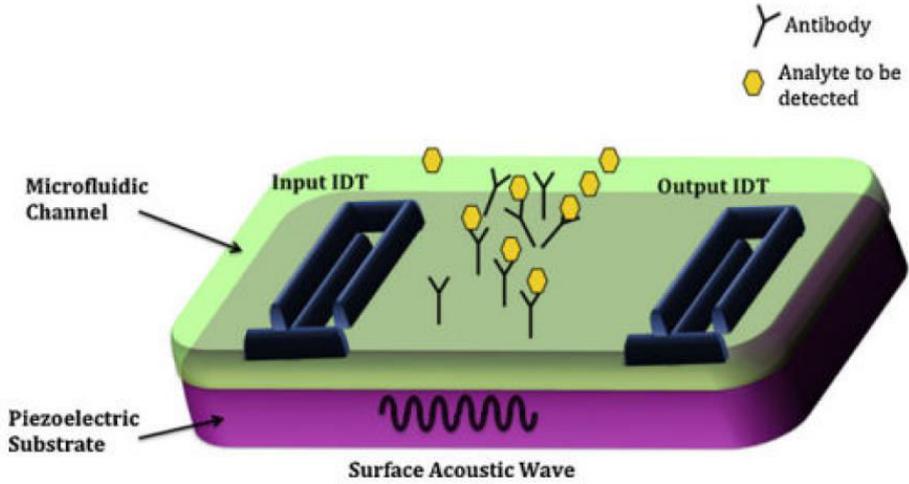


Figure 5. SAW delay line biosensor integrated in a microfluidic channel[45]

3.1.1.2.3. *Transducteurs optiques*

Dans les transducteurs optiques, le signal qui est mesuré est la lumière. La détection optique se décompose en un grand nombre de sous-classes telles que l'absorption, la réflexion, la réfraction, la dispersion, l'infrarouge, la technologie Raman, la chimiluminescence, la fluorescence, et la phosphorescence. La **Figure 21** présente les principaux types de transducteurs optiques et les grands principes de la détection.

La fluorescence classique et la TR-FIA

Différentes méthodes ont été développées en utilisant la fluorescence pour détecter des résidus d'antibiotiques depuis 1990 (aminosides dans le lait [149], lait et l'eau du robinet [73], sulfadiméthoxine dans le lait [99]. Des méthodes de dépistage de résidus de médicaments vétérinaires (antibiotiques, anticoccidiens) ont été développées grâce à la technologie appelée Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) entre 2006 et 2015 [69, 150-156]. Ces méthodes permettent l'analyse d'un seul antibiotique (*eg.* chloramphénicol) ou d'une famille d'antibiotiques (*eg.* fluoroquinolones). Toutefois, les biocapteurs basés sur la fluorescence sont compatibles avec la technologie de multiplexage. Un biocapteur multiplex basé sur la fluorescence a été développé par Chen et al. pour le dépistage de 8 antibiotiques dans les muscles et foies de poulet et de porc [157]. Un microréseau de différents spots a été imprimé sur une puce en verre modifiée. Sur ces différents spots, sont greffés différents conjugués protéine-antibiotique. L'essai dure 3 heures pour détecter et quantifier les 8 antibiotiques dans 6 échantillons, ce qui correspond à un débit d'échantillons un peu faible, par rapport aux techniques conventionnelles type ELISA.

La cytométrie de flux

Les premiers articles concernant l'utilisation de la cytométrie de flux pour détecter des interactions entre anticorps et antigène datent des années 1980. Cette technologie utilise de petites microsphères fluorescentes. Chaque ensemble de billes peut être couplé à un biorécepteur différent. Grâce à cette technique, il est possible de mesurer simultanément plusieurs interactions biomoléculaires différentes dans un seul puits de microplaque. La cryométrie de flux se classe dans la catégorie des technologies multiplexées en suspension (ou « Suspension array technology ») puisque l'interaction entre les billes greffées avec des anticorps, par exemple, et les analytes se passe en suspension et non sur une surface.

Des applications d'immunoessais couplés à la détection par cytométrie de flux (FCIA) ont été publiées utilisant des cytomètres de flux commerciaux.

Dans le cadre d'un projet de recherche, le Laboratoire National de Référence belge a développé une méthode de dépistage de 64 antibiotiques de 10 familles différentes dans le muscle de porc et dans le lait, basée sur la cytométrie de flux [158]. Depuis 2015, la commercialisation des kits prêts à l'emploi appelés BeadyPlex®, issus de ce projet de recherche, est réalisée par la société Unisensor (Belgique), en partenariat avec un fabricant de cytomètres de flux.

Figure 21. Les principes de mesure des différents types de transducteurs optiques.

Fluorescence	• Mesure de l'émission de lumière par une substance qui a absorbé la lumière ou un autre rayonnement électromagnétique
TR-FIA¹	• Mesure de l'émission de lumière par des chélates de lanthanides intrinsèquement fluorescents
FCIA²	• Mesure de la dispersion de la lumière et du signal fluorescent généré quand la particule ou la cellule passe à travers le faisceau de lumière (eg. Laser)
SPR³	• Mesure des changements d'indice de réfraction, en surface
iSPR⁴	• Mesure des changements d'indice de réfraction sur une surface, dans l'espace
DOT⁵	• Mesure les changements de diffraction de la lumière
Chimiluminescence	• Mesure de la chemiluminescence, issue d'une réaction chimique catalysée par une enzyme
Bioluminescence	• Mesure de la variation de luminescence émise par des micro-organismes vivants

¹TR-FIA : Time-resolved fluoroimmunoassay ; ²FCIA : Immunoessai par cytométrie de flux ; ³SPR : résonance plasmonique de surface; ⁴iSPR : résonance plasmonique de surface par imagerie; ⁵DOT : diffractive optics technology.

La seconde application concerne le système Multi Analyte Profiling (xMAP®) (Luminex, Texas, Etats-Unis). Ce système ouvert permet le développement de méthodes. Plusieurs applications de la cytométrie de flux utilisant ce système pour le dépistage de résidus d'antibiotiques ont été trouvées dans la littérature. La première application pour le dépistage de sulfamides dans le lait a été publiée en 2008 [159]. La seconde application a concerné, dans un premier temps, le dépistage de trois médicaments vétérinaires, dont le chloramphénicol, puis l'extension de la méthode au dépistage de 5 antibiotiques dans le lait, et enfin le dépistage simultané de sept pesticides et médicaments vétérinaires dans l'eau et dans le lait [160]. Cette dernière méthode est rapide (essai de moins de 2 heures) et la limite de détection annoncée pour le chloramphénicol (0,05 µg/L) est inférieure à la LPMR (0,3 µg/L).

La Résonance Plasmonique de Surface (Surface Plasmon Resonance (SPR))

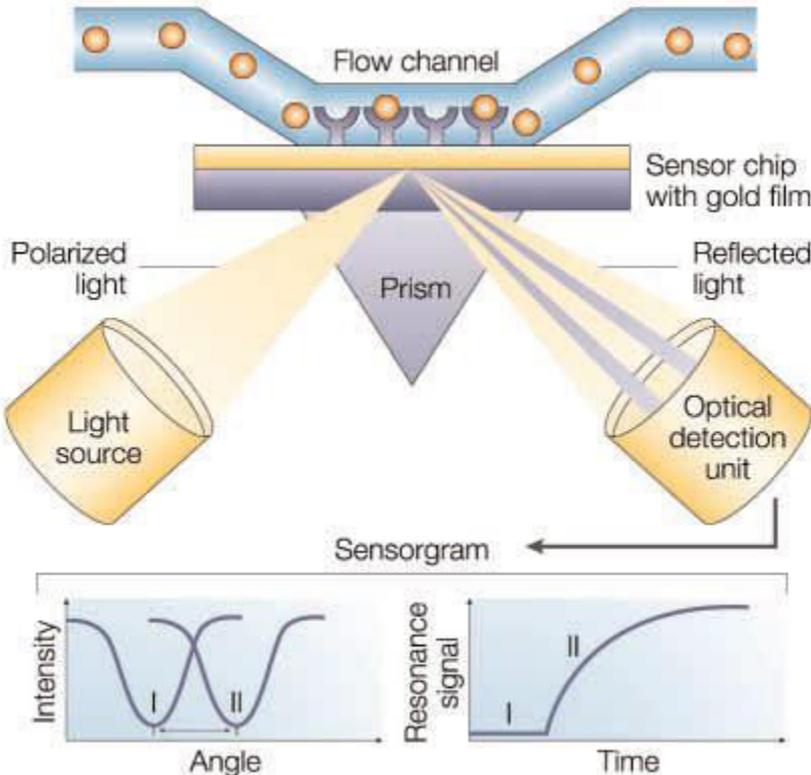
Les biocapteurs basés sur la résonance plasmonique de surface (SPR) sont des capteurs optiques utilisant des ondes électromagnétiques particulières pour détecter les interactions qui se produisent à la surface. Les changements de masse à la surface de la puce (« sensor chip ») qui interviennent lors de l'association ou de la dissociation de complexes biomoléculaires (BIA pour Biomolecular Interaction Analysis) provoquent un décalage de la position de l'angle de résonance (**Figure 22**). La variation de cet angle permet de suivre en temps réel. Le sensorgramme permet de visualiser en temps réel les variations de l'angle de résonance sous l'effet de la fixation des molécules sur la puce. Cette technique a été introduite dans les années 1990.

Le coût important de l'investissement dans les biocapteurs SPR de type Biacore (GE Healthcare, Suède) a été un frein pour une plus large application dans les laboratoires de contrôle des aliments. Un autre biocapteur basé sur la SPR moins coûteux a été commercialisé (Spreeta™, Texas Instruments, Etats-Unis). Toutefois, ce système s'est avéré moins robuste et possédait un seul canal disponible pour mesurer les interactions, au lieu de 2 à 8 selon les différents systèmes Biacore. Puis un biocapteur portable SPReeta® Kit SPR3, disposant de 3 canaux pour 3 interactions en parallèle, a été développé et évalué pour l'analyse du lait [161]. Des échantillons de lait ont pu être analysés après une préparation d'échantillon simple (centrifugation et dilution du lait).

De nombreuses méthodes ont été développées pour le dépistage de résidus d'antibiotiques entre 1995 et 2008 en utilisant le système BIACORE [83, 162-169]. Le système BIACORE avec 8 canaux permettait la détection simultanée de 8 analytes ou familles d'analytes différents.

Parfois des systèmes SPR développés intra-laboratoire et non commerciaux ont fait l'objet d'application au dépistage des résidus d'antibiotiques. Par exemple, une méthode de dépistage multi-antibiotiques (fluoroquinolones, sulfamides et phénicolés) dans le lait a été développée. L'interaction entre les antibiotiques et des anticorps polyclonaux greffés sur 6 canaux est détectée par un capteur optique SPR non commercial [170].

Figure 22. Le principe schématique de la SPR (Cooper 2002) [171].



L'imagerie de résonance Plasmonique de Surface (Imaging Surface Plasmon Resonance (iSPR))

Le système Flexchip de Biacore (GE Healthcare, Uppsala, Suède) a été la première plateforme disponible dans le commerce. Concernant le dépistage des résidus d'antibiotiques, le système IBIS iSPR (IBIS Technologies, Pays-Bas) est le système le plus fréquemment cité dans la littérature [172, 173]. Cette plateforme IBIS iSPR peut permettre d'analyser un maximum de 56 essais multiplexés.

Le principal avantage en combinant la iSPR et les microréseaux est que chaque site du microréseau est une zone de détection individuelle. Krishnawoorthy *et al.* ont présenté une application de la iSPR au format micropuces pour la détection de 5 molécules différentes et l'analyse cinétique, de l'interaction antigène/anticorps [174]. Parmi ces 5 molécules, cette équipe a testé deux antibiotiques, la néomycine et la gentamicine. En conclusion, cette méthode pourrait être utilisée pour le dépistage de ces antibiotiques ou d'autres antibiotiques.

La technologie d'optique diffractive

Une photodiode mesure l'intensité de l'ordre de diffraction, qui est corrélée à la concentration en analyte. La technologie optique de diffraction combine des formats de dosage immunologique multiplex avec des mesures en temps réel des interactions entre protéines [175].

Le système dotLab® mX (Axela Biosensors, Canada) basé sur cette technologie est un système commercial flexible qui permet le développement de méthodes pour la recherche de biomarqueurs de protéines et de nouveaux tests diagnostiques [176]. Ce système doit pouvoir être adapté au dépistage de composés de faible poids moléculaire tels que les antibiotiques, en appliquant le même principe que pour le développement de la SPR au cours des dernières années. Toutefois, aucun article n'a été trouvé concernant le dépistage des résidus d'antibiotiques avec ce système.

Chimiluminescence (CLIA ou Chemiluminescence ImmunoAssay)

Le biorécepteur (ou l'analyte) est marqué de manière covalente directement avec un composé chimiluminescent (*eg.* luminol). En déclenchant le marqueur luminescent, la réaction d'émission de la lumière produit un signal, avec une intensité donnée (photons/seconde) pour détecter l'analyte.

La plupart des tests sont hétérogènes et nécessitent une séparation du marqueur non lié. Ces tests sont plus simples à développer, mais un peu plus compliqué à réaliser. Un dosage homogène, par contre, nécessite que la réaction d'émission de la lumière soit affectée d'une manière quelconque par l'interaction entre l'analyte et le biorécepteur. La mesure de l'intensité lumineuse est relativement simple, nécessitant seulement un photomultiplicateur ou une photodiode, ainsi que l'électronique associée pour convertir et enregistrer les signaux.

Une revue des applications de la chimiluminescence et de la bioluminescence dans différents domaines liés aux contaminants a été publiée (*eg.* contamination bactérienne ou polluants environnementaux inorganiques (métaux lourds) [177].

Nous avons identifié deux types de biocapteurs chimiluminescents :

- Biocapteurs chimiluminescents intra-laboratoire :

La CLIA offre plusieurs avantages potentiels et a des applications en chimie clinique, en analyse de l'environnement, et en analyse des aliments. Les avancées réalisées dans le domaine des biocapteurs basés sur la détection par chimiluminescence couplés à des immunoessais sont présentés et discutés dans une revue bibliographique [178]. Ces progrès ont été réalisés par exemple dans le domaine du développement de nouveaux marqueurs luminescents ou de l'amélioration du signal des marqueurs existants par des activateurs, mais aussi dans le secteur des surfaces d'interaction. Des exemples de développement intra-laboratoire d'immunoessais basés sur la chimiluminescence pour les contaminants alimentaires ont été trouvés dans la littérature [179-182] (**Figure 23**).

- Biocapteurs chimiluminescents commerciaux

Seuls deux biocapteurs de chimiluminescence commerciaux ont été identifiés pour le dépistage de résidus d'antibiotiques.

- Le système Microarray Chip Reader 3 (MCR 3), développé à l'Université de Munich en Allemagne, est commercialisé par r-Biopharm AG (Darmstadt, Allemagne) et utilisé pour l'analyse du lait [183] et du miel [184].
- Le système Evidence Investigator® (Randox, Royaume-Uni) est un système semi-automatisé, basé sur des biopuces, conçu pour des applications médico-légales et à vétérinaires [185]. Des évaluations de plusieurs kits pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans le miel ont été publiées [186-188].

Bactéries luminescentes

La bioluminescence est une forme de luminescence, ou émission de «lumière froide». La variation de la luminescence peut être causée par l'enzyme appelée luciférase, codée par le gène lux, en réponse à la présence de l'analyte cible et dans une relation dose - dépendante. L'expression du gène lux dans des micro-organismes peut être contrôlée soit de manière constitutive soit inductible. Des souches bactériennes sont construites en utilisant des gènes de bioluminescence (lux) comme reporteurs de réponses transcriptionnelles. La production de lumière augmente en présence de produits chimiques spécifiques. A l'inverse, il existe des bactéries naturellement bioluminescentes type *Vibrio fischeri*. Dans ce cas, la production de lumière diminue en présence d'un contaminant qui inhibe la croissance bactérienne. Des exemples de biocapteurs basés sur l'utilisation de bactéries luminescentes et développés pour le dépistage de différents antibiotiques ont été trouvés dans la littérature [107, 189].

Figure 23. Principe d'un immunoessai basé sur la chimiluminescence pour le dépistage du chloramphénicol (Yu *et al.* 2014) [182].

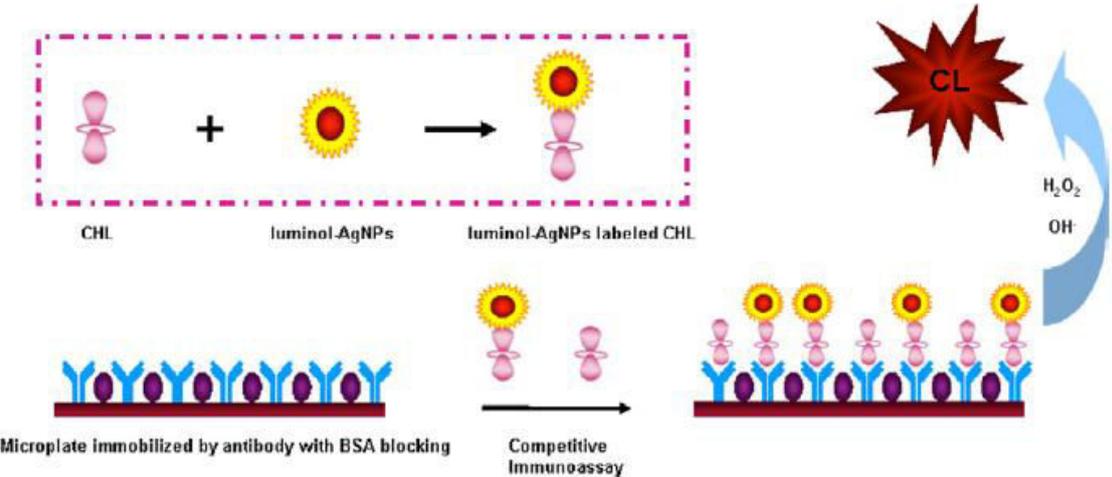
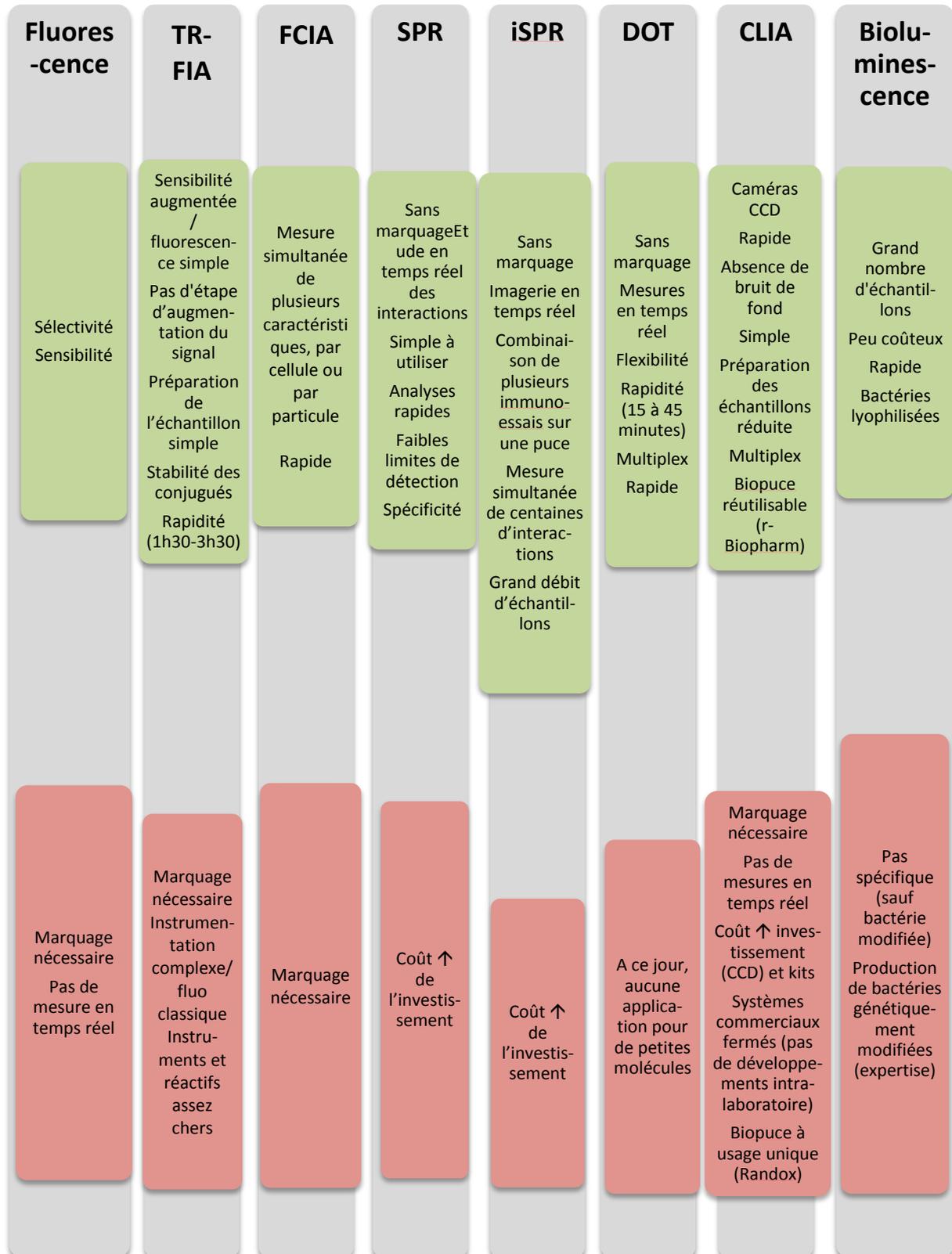


Figure 24. Avantages et inconvénients des différents types de transducteurs optiques.



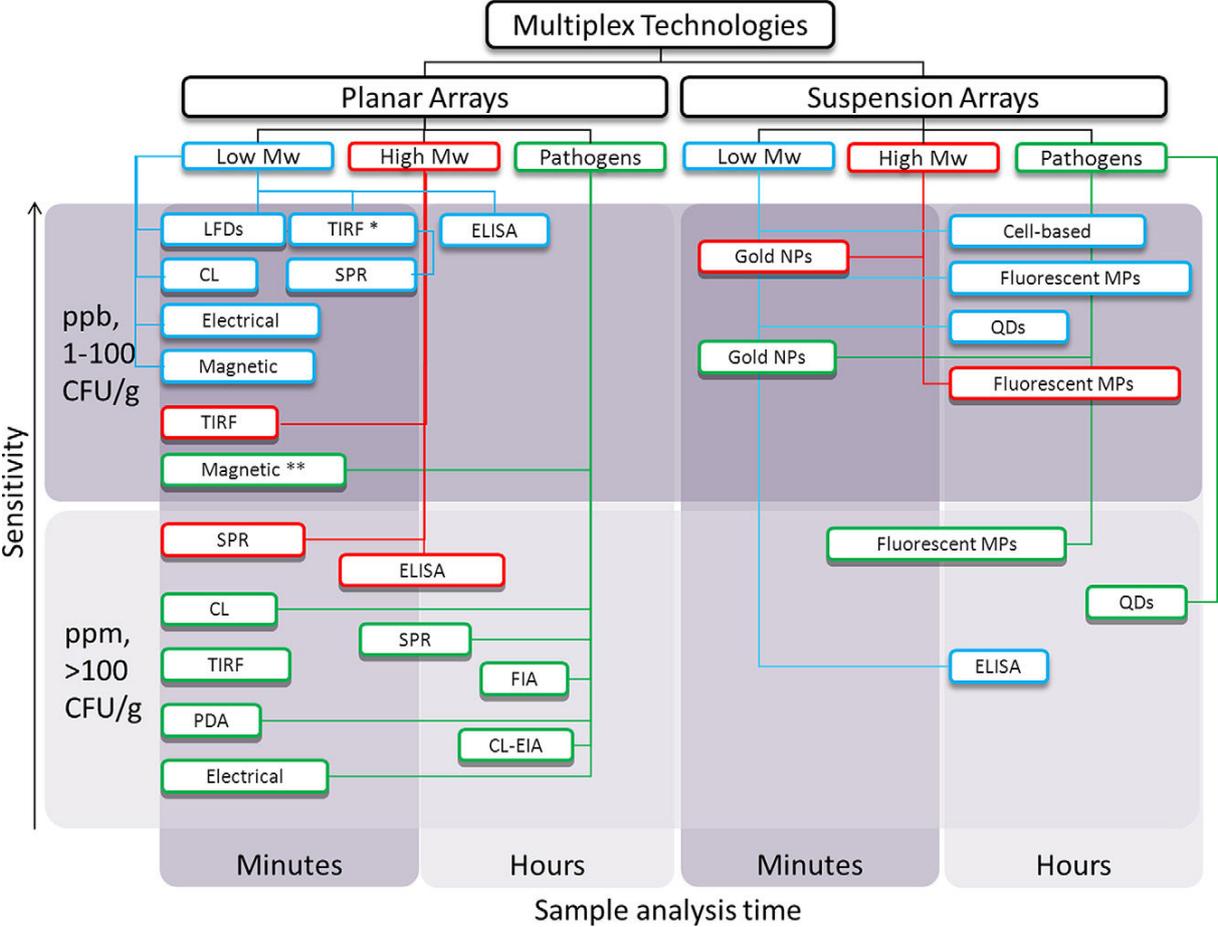
Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) ; Immunoessai par cytométrie de flux (FCIA) ; Résonance Plasmonique de Surface (SPR) ; imageire SPR (iSPR) ; Technologie d'optique diffractive (DOT) ; Immunoessai par chimiluminescence (CLIA) ; Dispositif à couplage de charge ou CCD (charge coupled devices).

En conclusion, les différents types de transducteurs optiques présentent des avantages et des inconvénients, en termes de praticabilité, mais aussi en termes de performance (**Figure 24**).

Pour certaines de ces techniques, le marquage de l'analyte ou du biorécepteur est nécessaire. Cette étape supplémentaire de conjugaison est complexe et demande une expérience particulière. De plus, la conjugaison, risque d'altérer le site de reconnaissance entre l'analyte et le biorécepteur. Les techniques sans marquage devraient donc être préférentiellement utilisées, à condition que les autres caractéristiques de la méthode (*eg.* coût, performance, etc) répondent aussi à nos attentes.

En outre, la technologie de multiplexage s'applique à nombre de ces biocapteurs optiques, ce qui est un avantage primordial pour détecter simultanément plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques dans les aliments. Le gain de temps sur les analyses et la réduction de la charge de travail sont deux grands avantages, par rapport à des tests individuels. Une revue a été publiée concernant les développements récents de technologies multiplexées, conventionnelles (*eg.* bandelettes) et innovantes, fondées sur différents principes de détection optique (*eg.* cytométrie de flux, chimiluminescence) [190]. Cette revue intègre un schéma synthétique des différentes technologies (sur puces et en suspension) et un bilan de leurs performances en termes de limites de détection et de durée d'analyse, en fonction du poids moléculaire des analytes (**Figure 25**). Les limites de détection et les temps d'analyse sont corrélés avec la technologie (planaire ou en suspension) et le type d'application (bactéries pathogènes, petites ou grosses molécules). Les antibiotiques étant des analytes de faible poids moléculaire (méthodes signalées en bleues sur la figure), le bilan montre que les limites de détection obtenues avec les techniques multiplex sont globalement de l'ordre du ppb (ng/g), donc conformes avec les limites réglementaires. De plus, les méthodes basées sur la SPR et la chimiluminescence peuvent être rapides (quelques minutes). Ces observations confirment nos conclusions quant au fort potentiel des biocapteurs optiques multiplexés. L'inconvénient majeur du multiplexage est que le risque d'observer des interférences dans la détection des différents analytes augmente avec le nombre d'essais multiplexés. L'optimisation de ce type de méthodes est donc primordiale pour limiter les interférences et demande beaucoup de travail. C'est pourquoi ce type de système doit être automatisé pour alléger la charge de travail lors des phases de développement et d'optimisation [191].

Figure 25. Limites de détection et temps d'analyse, en fonction des technologies multiplex utilisées, dans les domaines des analyses de l'alimentation et de l'environnement [190].



3.1.1.2.4. *Transducteurs thermiques*

Les biocapteurs thermiques permettent de déterminer la concentration d'un substrat grâce à la variation d'énergie (production ou absorption), associée à une réaction biochimique (eg. enzymatique). L'énergie libérée ou absorbée est proportionnelle au nombre de molécules produites par la réaction biochimique. Le changement de température, est mesuré par un microcalorimètre. Dans ces biocapteurs, les transducteurs sont des thermocouples, des thermorésistances ou des thermopiles (association en série de plusieurs thermocouples). Les biocapteurs thermiques les plus utilisés sont enzymatiques. Ce type de biocapteurs peut être développé pour une détection simultanée de multiples analytes (multiplex). En effet, une colonne peut être divisée en plusieurs régions distinctes et chaque région est immobilisée avec une enzyme spécifique, pour la détection d'un analyte spécifique. Un biocapteur thermique combiné à un immunoessai est appelé un « Thermometric ELISA » (TELISA).

Les applications des biocapteurs thermiques sont variées, depuis les analyses cliniques (eg. glucose, cholestérol) jusqu'à la surveillance de processus industriels (eg. production de pénicilline V par fermentation [192]), en passant par les analyses environnementales (eg. métaux lourds, pesticides) [193].

Un biocapteur thermique appelé HEATSENS® (NitBiosensing (Nanoimmunotech), Espagne) est commercialisé pour différentes applications, dont la détection d'analytes en temps réel, dans des matrices complexes. Ce biocapteur portable est utilisé dans le cadre d'un projet pour le dépistage des résidus d'antibiotiques non invasif chez les animaux vivants (projet espagnol appelé INNOSABOR).

Le **Tableau 10** présente les avantages et les inconvénients des biocapteurs thermiques.

Quel que soit le type de transducteur utilisé, les nanotechnologies sont de plus en plus utilisées afin d'améliorer la performance des biocapteurs. Nous allons voir les nanotechnologies utilisées et leur impact sur les biocapteurs.

Tableau 10. Les biocapteurs thermiques.

Transducteur	Avantages	Inconvénients
Microcalorimétrie de titration isotherme	Pas de marquage	
	Stabilité	
	Multiplex	
	Miniaturisation simple =< sensibilité ↑	
	Pas d'immobilisation des composés	Elaboration de la cellule du capteur difficile
	Rapides	Difficile à mettre en œuvre
	Reproductibles	Coût élevé
	Automatisation possible	Encrassement possible
	Mesures en continu	Pré-traitement de certains échantillons
	Pas sensibles à la lumière	
	En solution	
	Pas de limitation de poids moléculaire	
	Pas d'interférences optiques (eg. solutions colorées, turbides) ou électrochimiques	
	Compatible avec des solvants organiques	

3.1.1.3. Nanotechnologies

Les nanotechnologies sont un domaine qui progresse très rapidement et qui attire de nombreuses équipes multidisciplinaires. Dans d'autres domaines tel que la détection des toxines par exemple, les nanotechnologies qui offrent des perspectives de développement sont les nanomatériaux, les billes magnétiques et la microfluidique [194]. Il apparaît que pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments, les mêmes pistes peuvent être suivies pour le développement de nouveaux biocapteurs encore plus performants. Le développement des nanotechnologies, indépendamment des contaminants à rechercher, sera dans les années à venir à la base de la miniaturisation des biocapteurs. Cette miniaturisation permettra de développer le multiplexage et la portabilité des biocapteurs [195] (**Figure 26**).

Concernant les progrès de la microfluidique et de la nanofluidique, les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques pourront, comme par le passé, profiter des avancées réalisées dans le domaine biomédical qui est toujours à la pointe des nouvelles technologies. Nous pouvons signaler parmi les perspectives de développement prometteuses, des applications dans le domaine biomédical :

- Une revue de Derkus et al. de 2016 a fait la synthèse des différents dispositifs qui permettent la miniaturisation des systèmes de biocapteurs : micro et nanoprofilage (patternings), microfluidique, et MEMS [196]. La technologie Bio-MEMS correspond au développement de systèmes micro électromécaniques biomédicaux (ou biologiques), c'est-à-dire des techniques de microfabrication, essentiellement des parties mécaniques (microélectrodes, microaiguilles). Les nombreux développements récents de la technologie MEMS vont contribuer à améliorer la miniaturisation et donc la portabilité des biocapteurs tous domaines d'application confondus. Par exemple, un biocapteur optique, associé à la technologie MEMS a été développé pour la détection d'une petite molécule (un principe actif de médicament) et une grosse molécule (anticorps). Ce système est potentiellement applicable à des mesures de contaminants dans l'environnement ou au diagnostic médical à domicile [197]. Cette technologie est aussi applicable aux autres types de biocapteurs (électrochimique, massique [198] ou thermique).

- Les technologies Laboratoire sur Puce (LOC ou Lab on a chip), Laboratoire en Tube (LIT ou Lab in a tube) et les systèmes de microanalyse total (μ TAS ou micro total analysis systems). Le système de microanalyse totale (μ TAS) décrit un dispositif qui permet d'automatiser et d'inclure toutes les mesures nécessaires pour l'analyse chimique d'un échantillon (eg. échantillonnage, transport des échantillons, réactions chimiques, détection). Ces trois systèmes permettent de travailler à l'échelle d'une puce, de réduire les coûts et les durées d'analyse. Par exemple, une méthode basée sur la technologie LIT a été développée sur le système COBAS Liat® (Roche Molecular Diagnostics) pour la détection du virus de l'Influenza dans des sérums de patients [199]. Kovarick *et al.* ont présenté une revue bibliographique qui montre des exemples de biocapteurs développés avec la technologie μ TAS [200]. Les méthodes développées sont rapides, automatisées, et avec des limites de détection basses.

Figure 26. Les nanotechnologies et leurs impacts sur les développements de biocapteurs.

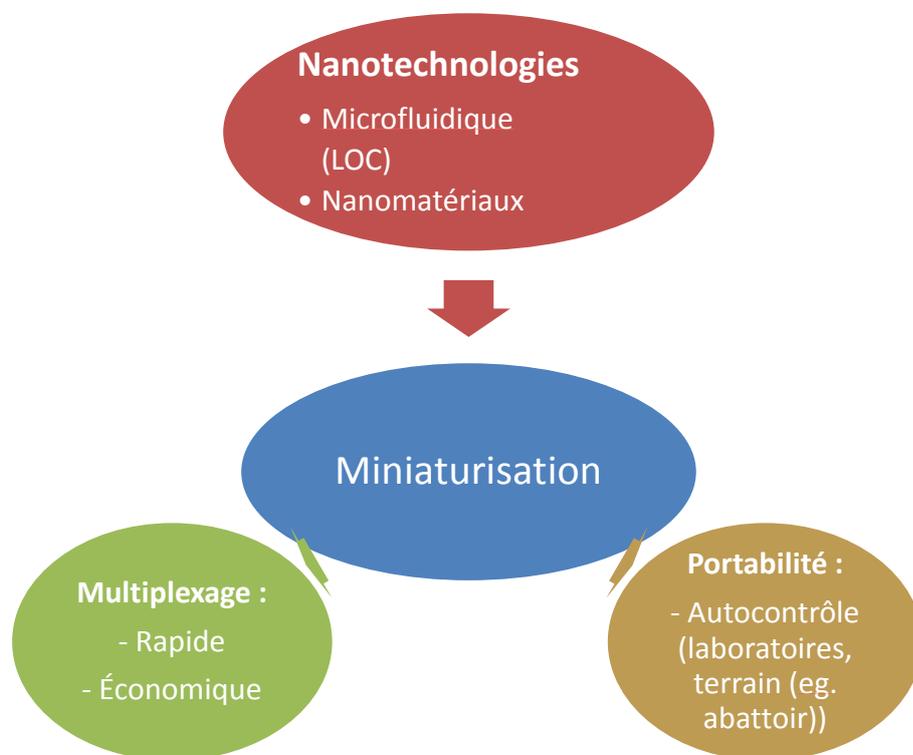


Tableau 11. Les différents types de nanomatériaux, principes et intérêts, à travers leurs applications récentes pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.

	Constituants	Principe/avantages	Analytes	Références
Nanoparticules	Métaux (<i>eg.</i> Au, Ag, Pt), oxydes de métaux (<i>eg.</i> Fer), silice, acides gras	Augmente la surface d'interaction Facilite les transferts de charge => zone active de l'électrode ↑	CAP, fluoroquinolones, enrofloxacin, streptomycine, sulfamérazine, tétracyclines	[201-206]
Nanotiges (nanorods) ou nanofils (nanowires)	Métaux (<i>eg.</i> Au, ZnO, CuO) ou matériaux semi-conducteurs (<i>eg.</i> silicone)	Absorption de la lumière ↑ Excellentes propriétés de diffusion	Gentamicine, pénicilline, ofloxacin	[207-210]
Boites quantiques (QD)	Matériaux semi-conducteurs (<i>eg.</i> sulfure de zinc, tellure de cadmium)	Nanostructure de semi-conducteurs Propriétés optiques (<i>eg.</i> rendement quantique ↑, spectre de fluorescence) QD commercialisées	CAP, vert de malachite, multi-antibiotiques, nitrofuranes, sulfamides et quinolones	[211-218]
Nanomatériaux de carbone	Nanotubes de carbone (paroi simple ou multiple)	Surface ↑ → quantité biorécepteurs ↑ Signaux électrochimiques ↑	Kanamycine, sulfamides, tétracyclines, ofloxacin, QCA	[219-225]
	Graphène, oxyde de graphène (GO)	Conductivité électrique ↑ Inhibiteur de fluorescence (quencher)	Aminosides, kanamycine, pénicilline	[226-229]
NP magnétiques	Noyau magnétique inorganique (<i>eg.</i> Au, multi-métaux)	Séparation de molécules cibles d'autres molécules grâce au champ magnétique Conductivité électrique ↑	CAP, streptomycine	[230-232]

Nanoparticules d'or (NP Au) ; Argent (Ag) ; Platine (Pt) ; Oxyde de zinc (ZnO) ; Oxyde de cuivre (CuO) ; Chloramphénicol (CAP) ; limite de détection (LOD) ; quinoxaline-2- carboxylic acid (QCA).

Le **Tableau 11** résume les tendances actuelles et futures, dans le domaine des nanomatériaux, pour le développement de nouveaux biocapteurs plus performants, en particulier pour le dépistage des résidus d'antibiotiques. Les différents types de nanomatériaux permettent globalement d'améliorer le signal, donc d'abaisser les limites de détection des biocapteurs.

3.1.1.4. Conclusions sur les biocapteurs

Les quatre classes principales de transducteurs permettent de développer des méthodes avec ou sans marquage. Les méthodes avec marquage nécessitent une étape de conjugaison de l'analyte ou du biorécepteur avec une molécule qui permettra la détection. Au contraire, les méthodes sans marquage sont basées sur la mesure directe d'un phénomène produit par des réactions biochimiques sur une surface de transducteur. Les méthodes sans marquage permettent donc d'éviter la préparation complexe et longue des conjugués analyte-biorécepteur, dans le cas des immunoessais compétitifs présentés dans cette thèse. Les méthodes sans marquage présentent donc un grand avantage par rapport aux autres, surtout quand un laboratoire veut développer une méthode interne et quand les conjugués ne sont pas disponibles commercialement. C'est pourquoi la technologie SPR, par exemple, a été fortement développée dans les années 1990 pour la détection des résidus d'antibiotiques, alors que les techniques électrochimiques moins coûteuses pourtant avaient été un peu oubliées jusqu'ici. Cette conclusion va aussi en faveur du développement des biocapteurs massiques pour le développement de méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques.

Le biocapteur « idéal » pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale doit être peu coûteux, rapide, simple d'utilisation, spécifique, avec des limites de détection en rapport avec les limites réglementaires, et présentant un haut débit d'échantillon (faible préparation). Le **Tableau 12** présente les caractéristiques et les performances des différents types de transducteurs pour tenter d'y répondre. Etant donné ces informations, les biocapteurs représentent l'avenir des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Tableau 12. Les attentes par rapport à une méthode de dépistage efficace et comment y répondent chaque type de transducteur.

	Econ omique	Rapi de	LOD basses	Spécifi cité	Préparati on de l'échantil lon	Multipl ex	Ha ut déb it	Portabili té
Potentiométrique	++	++	++	++	++	++	++	++
Ampérométrique	++	++	++	++	++	++	++	++
Piézoélectrique	++	++	++	+	+	++	++	++
SPR	-	++	++	++	++	+	++	++
Chimiluminescence	+	++	++	++	++	++	++	+
Bioluminescence	++	+	++	+	+	+	++	++
FCIA	+	++	++	++	+	++	++	-
Thermique	+	+	+	+	+	+	+	+

Résonance plasmonique de surface (SPR) ; Immunoessai par cytométrie de flux (FCIA) ; Limite de détection (LOD) ; - : ne remplit pas les critères attendus ; + : remplit partiellement les critères attendus ; ++ : remplit complètement les critères attendus.

3.2. Combinaison de méthodes biologiques et physico-chimiques

3.2.1 La combinaison BIA/SM

Les biocapteurs basés sur la SPR peuvent être utilisés en combinaison avec la spectrométrie de masse (SM). Cette combinaison d'instrumentation permet la détection et la quantification de molécules d'intérêt par SPR et, en plus, leur caractérisation moléculaire par l'analyse de SM. Le système BIA (Biomolecular Interaction Analysis) est utilisé pour séparer les analytes à partir des échantillons complexes. Puis la spectrométrie de masse est utilisée pour identifier et quantifier l'analyte. Les premiers articles concernant la combinaison de biocapteurs avec la spectrométrie de masse ont été publiés en 1997 [233-235].

La technique de désorption-ionisation laser assistée par matrice (Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)) couplée à la spectrométrie de masse (MALDI-SM) est une technique flexible qui peut aussi être utilisée en combinaison avec des méthodes bioanalytiques telles que la SPR. Cette combinaison augmente la spécificité de la méthode, puisque la SM permet la différenciation de molécules qui sont difficiles à distinguer par la simple utilisation d'un anticorps. Cette combinaison de techniques permet de développer des méthodes rapides, automatisées, et robustes. À notre connaissance, aucune application pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans les aliments n'a été publiée à ce jour en utilisant ces technologies combinées. Le principal inconvénient est le coût des différents investissements en matériel.

3.2.2. CCM – Bioluminescence

La Chromatographie sur couche mince (CCM) – couplée avec la détection par bioluminescence est une méthode qui combine la capacité de séparation de la CCM avec la biodétection, grâce à l'utilisation d'une bactérie luminescente. Cette biodétection est basée sur la bioluminescence naturelle des bactéries comme *Vibrio fischeri* [236] ou *Photobacterium phosphoreum* ou de bactéries génétiquement modifiées, par l'introduction d'un gène de bioluminescence. Avant analyses, la préparation de *Vibrio fischeri* prend de 24 à 30 heures d'incubation. Les lectures peuvent être effectuées en 1 seconde à 10 minutes. Les analytes détectés comprennent des pesticides, des métaux lourds, des polluants organiques, et des antibiotiques. Des matrices complexes comme des produits alimentaires, des boissons et eaux usées peuvent être analysés. La CCM couplée avec la détection par bioluminescence a été qualifiée comme un outil prometteur en 2011 [237]. Les applications futures dépendront de façon significative de la sélectivité des bactéries.

Deux systèmes commerciaux basés sur la CCM couplée avec la détection par bioluminescence (BioLuminex®, ChromaDex, Etats-Unis ; BioLuminizer®, Camag, Suisse) sont disponibles. Des méthodes ont été développées avec ces systèmes, basés sur l'utilisation de la souche bactérienne *Vibrio fischeri*, naturellement luminescente, par exemple pour la détection de toxines dans les aliments, et de polluants dans les eaux par exemple [237].

3.2.3. L'électrophorèse capillaire couplée à un biocapteur

L'électrophorèse capillaire (EC) en tant que méthode de séparation peut être couplée à la détection par un biocapteur. L'électrophorèse capillaire est basée sur des chambres électrophorétiques miniaturisées. Dans cette combinaison de techniques, l'EC sert de support solide pour immobiliser des biorécepteurs. L'électrophorèse capillaire présente de nombreux avantages : un coût réduit, un temps d'analyse court, de petits volumes d'échantillons. La préparation de l'échantillon et le traitement de données peuvent être automatisés.

Une méthode en combinaison de l'EC avec un capteur électrochimique a été développée pour le dépistage de l'atrazine en une heure, qui, comme les antibiotiques, est une petite molécule (LOD de 0,1 ng/ml) [238]. Plus récemment, des méthodes combinant l'électrophorèse capillaire sur des biopuces et une détection par un biocapteur ont été publiées pour le dépistage de résidus d'antibiotiques. Dans ces publications, les transducteurs utilisés étaient de type ampérométrique, pour le dépistage de 5 aminosides dans du lait [239], et de sulfamides dans des tissus animaux [240]. Une revue de méthodes a été publiée concernant le couplage de l'électrophorèse capillaire à un autre mode de détection, l'électrochimiluminescence. Plusieurs exemples d'application à la détection d'antibiotiques, dans le domaine de l'analyse biomédicale (*eg.* sérum, urine) sont présentés dans cette revue [241].

Des approches multi-capillaires ou multi-bandes permettent de développer des méthodes multi-analytes [242]. Toutefois, le circuit microfluidique peut devenir complexe quand le nombre d'analytes à détecter augmente, puisque le nombre de capillaires ou de bandes augmente avec le nombre de biorécepteurs. En outre, les risques d'interférences entre les différents analytes augmentent. Les progrès constants de la microfluidique et de la miniaturisation vont sans doute permettre la multiplication des capillaires ou des bandes en parallèle.

Cette étude bibliographique concernant les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques a montré la grande variété de méthodes et de techniques analytiques biologiques utilisables. Depuis les premières techniques microbiologiques dans les années 1980 jusqu'aux biocapteurs les plus innovants, en passant par les techniques immunologiques type ELISA, le choix de la méthode la plus adaptée au contrôle des résidus d'antibiotiques dans les aliments devra se faire en fonction des performances de la méthode. La caractérisation des performances et la validation des méthodes de dépistage vont donc constituer la deuxième partie de cette étude bibliographique.

III. PARTIE RECHERCHE : LES DIFFERENTES APPROCHES D'ÉVALUATION DES PERFORMANCES DES METHODES DE DEPISTAGE

3.1. Exigences pour les méthodes de dépistage des résidus de médicaments vétérinaires

La méthode de dépistage est la première méthode qui est appliquée à l'échantillon à analyser, le but étant d'établir la présence ou l'absence de résidus de médicaments vétérinaires. Une méthode de dépistage doit être spécifique ou sélective en fonction de la cible, qualitative ou quantitative, simple, rapide et être la plus performante possible. En ce qui concerne les matrices complexes (i.e. le muscle, le rein), si nécessaire, l'extraction doit être très simple et rapide. Enfin, ces méthodes doivent avoir un faible coût, une capacité d'analyse élevée et sont utilisées pour passer au crible un grand nombre d'échantillons pour détecter des résultats non conformes potentiels. Ces méthodes sont spécialement conçues pour éviter les faux résultats conformes.

Les méthodes de dépistage pour les résidus de médicaments vétérinaires sont définies dans la décision 2002/657/CE de la Commission Européenne [13] comme "les méthodes utilisées pour détecter la présence d'un analyte ou une classe d'analytes au niveau d'intérêt ». Le "niveau d'intérêt" est généralement soit la limite maximale réglementaire (limite maximale de résidus (LMR), la limite minimale de performance requise (LMPR)) [13] ou un "niveau d'action. La décision européenne 2002/657/CE [13], en application de la directive 96/23/CE [2] définit la limite minimale de performance requise (LMPR) comme la teneur minimale en analyte présente dans un échantillon, qui doit au moins être détectée et confirmée. La LMPR est un paramètre de la performance technique auquel les laboratoires doivent se conformer lors de l'essai pour détecter la présence d'une substance interdite notamment, de son métabolite ou d'un marqueur. Cette limite est destinée à l'harmonisation des performances analytiques des méthodes applicables aux substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été établie. Donc, la LMPR n'est pas une limite de sécurité, mais une limite analytique. Des LMPR ont été fixées pour le chloramphénicol, les métabolites de nitrofuranes et les colorants par exemple. Au contraire, la Limite Maximale de résidus (LMR) est une limite de sécurité. Elle est fixée en fonction de différents dangers (toxicologiques, microbiologiques, pharmacologiques, ...). La LMR est fixée pour une substance antibiotique et/ou ses métabolites et est spécifique de chaque matrice (lait, viande, etc). Lors de l'administration d'un médicament à un animal de rente, un temps d'attente est fixé sur la base des études de pharmacocinétique des résidus. Ce temps d'attente doit être respecté par l'éleveur avant l'abattage des animaux ou la commercialisation du lait par exemple. Quand le temps d'attente est bien respecté et à condition que les posologies aient été respectées aussi, la concentration en résidus de médicaments dans la matrice concernée sera inférieure à la LMR pour 95 % des animaux. Dans ce cas, il n'y aura pas de danger pour le consommateur (toxicité, allergies, etc) à ingérer ces aliments. Les 5 % restants expliquent que les produits d'origine animale doivent être contrôlés pour la présence de résidus d'antibiotiques (plans de surveillance).

Deux types de méthodes peuvent être développés en fonction des substances cibles. Dans le cas des substances interdites (eg. le chloramphénicol, les métabolites de nitrofuranes ou les colorants), la méthode doit être spécifique pour le dépistage d'un antibiotique seul et les concentrations

recherchées doivent être les plus faibles possibles. Dans le cas des substances à LMR, idéalement une méthode multi - résidus doit être utilisée, capable de détecter plusieurs familles d'antibiotiques en même temps et, si possible, au niveau des LMR respectives. De plus, les niveaux de résidus à rechercher pour les substances à LMR sont toujours plus élevés que les niveaux à détecter pour les substances interdites.

Même si, dans un cadre réglementaire, un résultat positif avec la méthode de dépistage est nécessairement confirmé par une méthode physico - chimique, une méthode de dépistage ne devrait pas produire de faux résultats positifs qui entraînent des analyses de confirmation coûteuses ; mais plus important encore, il ne devrait y avoir aucun résultat faux négatif puisqu'ils entraînent que des échantillons contaminés passent dans l'alimentation.

Avant la validation d'une méthode de dépistage et selon le principe de la méthode, il est nécessaire de définir la portée de la méthode :

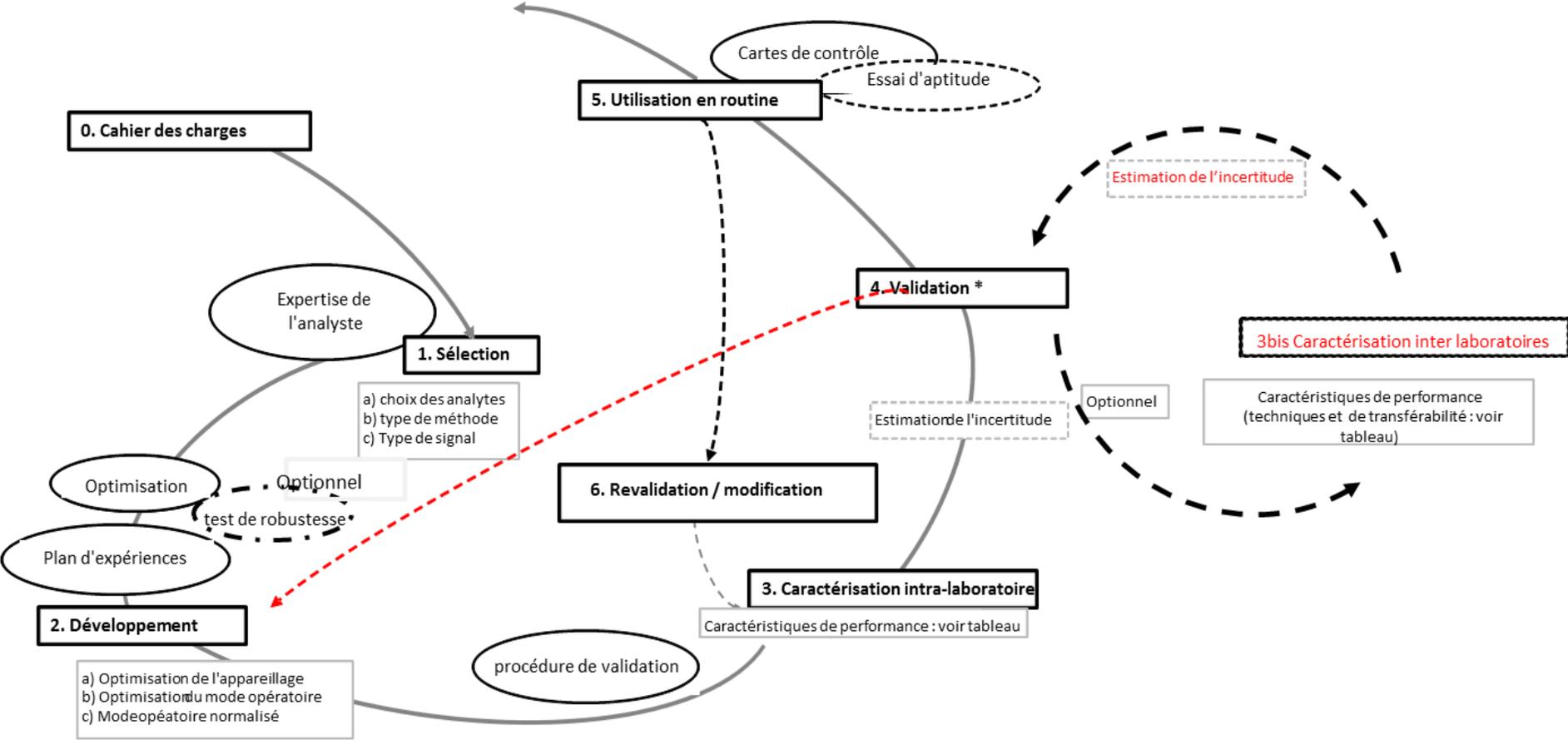
- l'analyte ou le groupe d'analytes à détecter,
- la gamme de concentration à détecter,
- la liste des matrices qui peuvent-être analysées.

Une méthode analytique doit pouvoir évoluer, suivant différentes étapes, qui sont représentées par le cycle de vie de la méthode (**Figure 27**) [243, 244]. En fonction de la demande d'un client (étape 0), une méthode va être développée et optimisée (étape 2), en commençant par sélectionner certains facteurs (étape 1), comme le type de méthode adapté pour la détection des analytes cibles. Ensuite, la méthode va être caractérisée en intra-laboratoire et, au besoin, en inter-laboratoires (étape 3). Enfin, la méthode va être validée, au regard de l'usage attendu (étape 4). À l'issue de ces étapes, l'utilisation en routine de la méthode peut être envisagée (étape 5). La revue périodique de la méthode peut donner lieu à un besoin de revalidation ou d'un nouveau développement (étape 6).

3.2. Caractérisation des performances et validation des méthodes de dépistage

La validation des méthodes de dépistage est d'une grande importance puisque ces méthodes constituent la première étape des plans de surveillance et plans de contrôle dans tous les pays. Seuls les résultats positifs à l'étape de dépistage doivent être confirmés, identifiés et quantifiés [13]. La validation des méthodes analytiques d'essais est une exigence normative pour l'accréditation. En effet, la norme NF EN ISO/CEI 17025 [245] appliquée dans le cadre de l'accréditation des laboratoires d'essais exige que les méthodes non normalisées ou les méthodes développées par le laboratoire soient validées avant emploi. La définition de la validation de cette norme est la suivante : « La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ». De plus, la validation des méthodes de dépistage pour les résidus de médicaments vétérinaires est une exigence réglementaire européenne [13].

Figure 27. Cycle de vie d'une méthode analytique.



Il existe deux types de validation :

- La validation inter-laboratoires (EILV) ou étude collaborative,
- La validation intra-laboratoire.

L'EILV permet de vérifier les paramètres de performance obtenus lors de la validation intra-laboratoire et de déterminer la reproductibilité, et si besoin la robustesse de la méthode. Contrairement au domaine de la microbiologie alimentaire, la validation inter-laboratoires est très peu utilisée dans le domaine du dépistage (en dehors des études de validation pour la certification AFNOR) et de la confirmation des antibiotiques dans les aliments, pour deux raisons principales.

Tout d'abord, ce type de validation est coûteux et demande de la part du laboratoire organisateur certaines compétences, différentes de celles nécessaires à une validation intra-laboratoire. En effet, la validation intra-laboratoire demande des compétences techniques et analytiques pour la mise en place de la méthode et des expériences nécessaires à la validation. La validation inter-laboratoires exige des compétences organisationnelles et de coordination.

De plus, quand la méthode est destinée à être utilisée dans un seul laboratoire, la validation inter-laboratoires est inutile. Un domaine où la validation inter-laboratoires est plus pertinente est l'industrie agro-alimentaire. En effet, plusieurs sites d'une même entreprise peuvent utiliser la même méthode. Dans le domaine du contrôle officiel et dans le cadre d'un réseau de laboratoires, comme celui des LNR, les méthodes peuvent parfois être transférées du laboratoire développeur vers les autres laboratoires. Dans ce cadre, une validation inter-laboratoires peut présenter un intérêt. Toutefois, en pratique, les laboratoires de référence (LNR ou LRUE) dans le domaine des résidus de médicaments vétérinaires, organisent très peu de validations inter-laboratoires. Après un transfert de méthodes au réseau, tout d'abord, le laboratoire qui reçoit la méthode doit réaliser une validation réduite, aussi appelée de transfert. Ce type de validation est décrit dans le guide de validation des méthodes de dépistage (2010). De plus, le choix est fait de vérifier la compétence de ces laboratoires grâce à l'organisation d'essais d'aptitude, et non l'organisation d'essais inter-laboratoires de validation (EILV). De même qu'un EILV, ces deux étapes permettent d'assurer la comparabilité des résultats entre plusieurs laboratoires utilisant la même méthode.

Nous allons nous focaliser sur la validation intra-laboratoire, qui est la pratique de loin la plus courante dans le domaine du dépistage des résidus de médicaments vétérinaires, et ses différentes approches. Etant donné que la norme NF EN ISO/CEI 17025 ne fait aucune recommandation concernant le ou les protocoles de validation à utiliser, le choix du protocole est lié à d'autres documents réglementaires ou normatifs. Les exigences de validation peuvent être différentes selon les pays, selon les domaines d'application et selon le type de méthodes (*eg.* qualitatives ou quantitatives). En outre, les protocoles de validation peuvent présenter des statuts différents : norme, réglementation nationale, européenne ou internationale, ou encore lignes directrices. Quelques exemples de protocoles de validation sont présentés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13. Protocoles de validation au niveau national, européen et international.

Niveau	R/G/N ¹	Document	Année	QL et/ou QT ²	CP ou MA/MR ³	Analytes	Référence
National	N	AFNOR NF V 03-110	2010	QT	CP	Produits agricoles et alimentaires	[246]
	N	AFNOR XP V 03-111	1995	QL	MA/MR		[247]
	G	Rapport d'une commission SFSTP ⁴	1992	QT	CP	Produits pharmaceutiques	[248, 249]
	G	Rapports d'une commission SFSTP	2003 à 2008	QT	CP		[250-253]
Europe	G	EURACHEM	1998	QL/QT	CP	Tous domaines d'analyse	[254]
	G	Procédure NMKL ⁵	2009	QL/QT	MA/MR	Pathogènes microbiens	[255]
	R	Décision 2002/657/CE	2002	QL/QT	CP	Annexe I de la directive 96/23/CE	[13]
	G	Guide de validation	2010	QL/QT	CP		[256]
USA	R	FDA ⁶	2013	QT	MA/MR et CP	Principes actifs et/ou métabolites	[257]
International	G	IUPAC ⁷ /AOAC ⁸	2002	QT	CP	Tous domaines d'analyse	[258]
	G	ICH ⁹	1996	QT	CP	Médicaments humains	[259]
	G	VICH ¹⁰	1999	QT	CP	Médicaments vétérinaires	[260]
	N	ISO ¹¹ 13969 (IDF ¹² 183)	2003	QL	CP	Résidus d'antimicrobiens	[261]
	N	ISO 18330 (IDF 188)	2003	QL/QT	CP		[262]
	N	(N) ISO 16140	2003	QL/QT	MA/MR	Pathogènes microbiens	[263, 264]
	N	NF EN FDIS 16140-2	2015	QL/QT	MA/MR et CP		[265, 266]

¹ Réglementation (R), guide (G) ou norme (N) ; ² Méthodes qualitatives (QL) ou quantitatives (QT) ; ³ Caractéristiques de performance (CP) ou comparaison d'une méthode alternative (MA) avec une méthode de référence (MR) ; ⁴ Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) ; ⁵ Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) ; ⁶ Food and Drug Administration (FDA) ; ⁷ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ; ⁸ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ; ⁹ International Conference on Harmonisation (ICH) ; ¹⁰ Veterinary International Conference on Harmonization (VICH) ; ¹¹ International Standard Organization (ISO) ; ¹² International Dairy Federation (IDF).

En fonction du statut du protocole, l'application des règles établies est plus ou moins contraignante. Par exemple, une décision européenne, comme la décision 2002/657/CE, doit être appliquée de manière complète. Beaucoup d'autres documents sont des guides ou des lignes directrices. Ces documents proposent des recommandations, mais ils peuvent être appliqués de manière partielle. Même lorsqu'il s'agit de normes, elles ne sont contraignantes que si une législation ou un référentiel (eg. AFNOR et NF EN FDIS 16140-2 [266]) oblige dans un domaine spécifique à utiliser cette norme. Aux États-Unis, la réglementation de la FDA, telles que les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exige que les méthodes d'analyse soient validées avant et pendant l'utilisation en routine. Il n'y a pas de réglementation spécifique sur les validations de méthodes, mais la FDA, ainsi que d'autres organismes et groupes de travail de l'industrie ont élaboré des lignes directrices pour la validation des méthodes.

En Europe, il existe plusieurs approches pour la validation des méthodes de dépistage des résidus de médicaments vétérinaires. Les approches peuvent être différentes en fonction du type de méthodes (qualitatives ou quantitatives), mais aussi en fonction du cadre dans lequel la validation doit être réalisée (eg. cadre réglementaire, certification). Trois approches utilisées pour la validation de méthodes pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments vont être présentées. Nous allons voir que deux grands types d'approche peuvent être utilisés : une approche relative (par comparaison de deux méthodes) et une approche absolue (une seule méthode).

3.2.1.1. La comparaison de méthodes :

Pourquoi valide-t-on les méthodes alternatives ? Le plus souvent, en microbiologie alimentaire, mais aussi en résidus, les méthodes dites « de référence » sont des méthodes anciennes, longues et parfois avec des limites de détection élevées. Les méthodes alternatives sont des méthodes plus innovantes, le plus souvent commerciales, plus rapides et moins lourdes à mettre en place, parfois automatisées. Le choix a été fait en microbiologie alimentaire de ne pas normaliser les méthodes alternatives, ce qui représente un processus long (3-4 ans), mais de les valider en comparaison avec la méthode de référence, validation réalisée par une tierce partie, en un à deux ans. En France, l'approche par comparaison d'une méthode alternative à une méthode de référence est préconisée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) pour la certification des kits commerciaux en microbiologie alimentaire et par extension pour les kits commerciaux pour le dépistage des résidus d'antibiotiques et autres substances à effet antibactérien dans les denrées alimentaires issues des animaux. Les études de validation pour obtenir la certification sont donc basées sur la norme EN NF EN FDIS 16140-2 [266]. A ce jour, les systèmes de certification AFNOR (France), MicroVal (NEN, Pays-Bas) et NordVal (NMKL, pays nordiques) appliquent la norme NF EN FDIS 16140-2 [266].

En 2005, un référentiel spécifique aux antibiotiques a été rédigé au sein de l'AFNOR par un groupe de travail, auquel l'Anses Fougères a participé [267]. Sur la base de l'ancienne norme ISO 16140 de 2003 [263], la validation d'une méthode alternative a été définie comme la « démonstration selon laquelle ladite méthode apporte un niveau de confiance approprié, sur le fait que les résultats obtenus

avec la MA sont comparables aux résultats obtenue avec la MR ». A cette date, le choix a été fait de conserver le principe de base de la comparaison de méthodes et les caractéristiques de performance à déterminer étaient similaires à celles de la norme. L'approche caractéristiques et critères de performance n'a pas été retenue. De plus, le référentiel pour les antibiotiques a aussi conservé les deux grandes étapes d'une certification d'un kit en microbiologie alimentaire: une étude préliminaire (intra-laboratoire) et une étude collaborative (inter-laboratoires). Les essais mis en œuvre dans le cadre d'une certification AFNOR sont réalisés par un laboratoire expert, indépendant, nommé par l'AFNOR. Cette approche est applicable aux méthodes qualitatives et quantitatives.

3.2.1.1.1. Etude préliminaire

L'objectif de l'étude préliminaire est de caractériser la méthode alternative et de comparer les performances de la méthode alternative avec celles d'une méthode prise en référence (**Figure 28**).

Praticabilité du kit

La praticabilité du kit qui permet de juger de la possibilité et de la facilité d'utilisation du kit en routine. Elle est déterminée suite à l'examen et au contrôle de 13 critères. Pour chacun de ces critères le mode de communication de ce critère auprès de l'utilisateur et le mode de contrôle de ce critère ont été définis. L'étude de praticabilité va consister à vérifier par exemple si le volume des réactifs fournis est suffisant et s'ils sont prêts à l'emploi ou non. La praticabilité est aussi liée à la nécessité ou non d'avoir des instruments ou des locaux spécifiques pour mettre en œuvre la méthode alternative.

Etude comparative de la méthode alternative et de la méthode de référence

Différentes caractéristiques vont être déterminées à partir des essais suivants pour chacune des méthodes, puis ces mêmes essais vont permettre de comparer les deux méthodes.

Caractéristiques absolues pour chacune des méthodes

Limite de détection / taux de faux négatifs

Pour chacune des méthodes, la (ou les) limite(s) de détection est (ou sont) déterminée(s) après l'analyse de matériaux contaminés (artificiellement ou non) avec une (ou des) molécule(s) à activité antibiotique à plusieurs niveaux de concentration. Le choix des analytes à valider ainsi que des concentrations doit se faire avant de démarrer la validation, lors de la présentation du projet d'étude préliminaire (**Figure 29**). Le choix est lié au type de méthode alternative, mais doit aussi tenir compte de leur fréquence d'utilisation en médecine vétérinaire ou du risque de survenue sous la forme de résidus dans la matrice concernée, si ces données sont connues. De plus, il faut veiller à respecter la proportionnalité entre la taille de chaque famille et le nombre d'antibiotiques testés dans cette famille. Le choix des concentrations doit se baser sur les limites réglementaires (eg. LMR) des différents antibiotiques dans la matrice d'intérêt, sur la (ou les) limite(s) de détection annoncée(s) par le fournisseur de kits et/ou sur des études précédentes réalisées dans d'autres laboratoires si elles existent.

Figure 28. Caractéristiques de performance à déterminer lors de l'étude préliminaire.

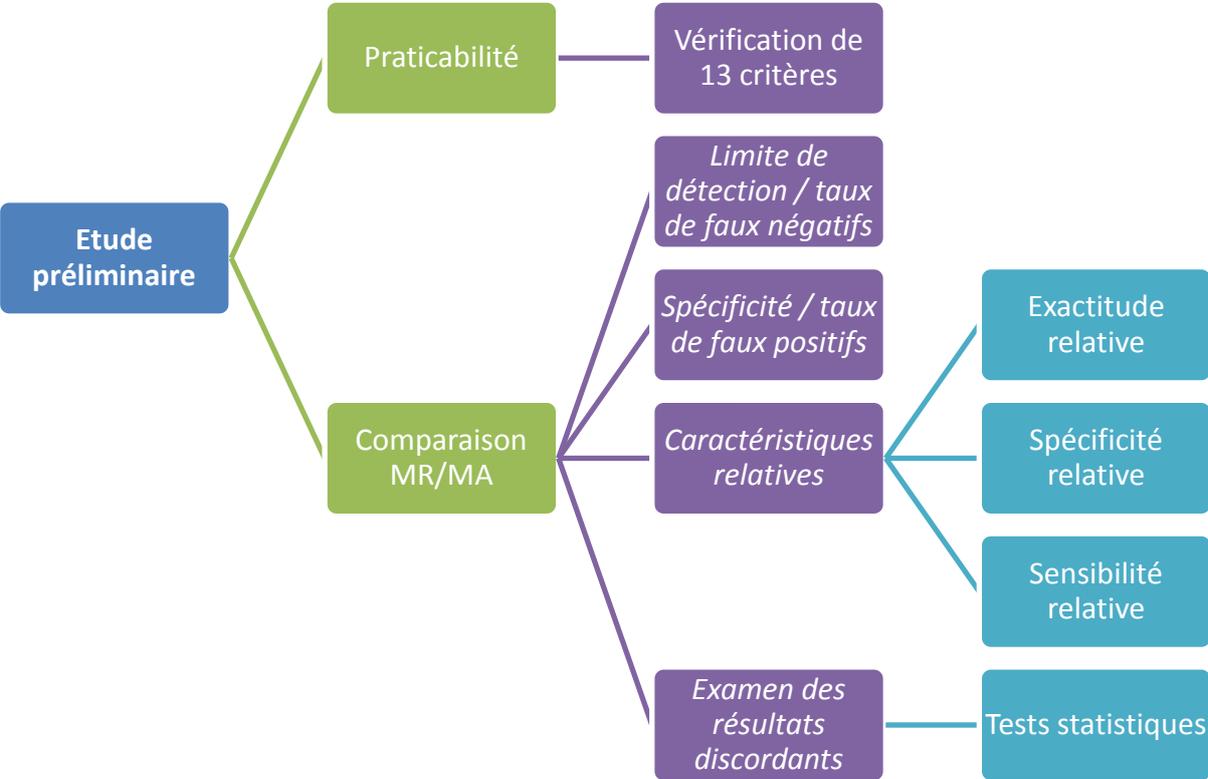
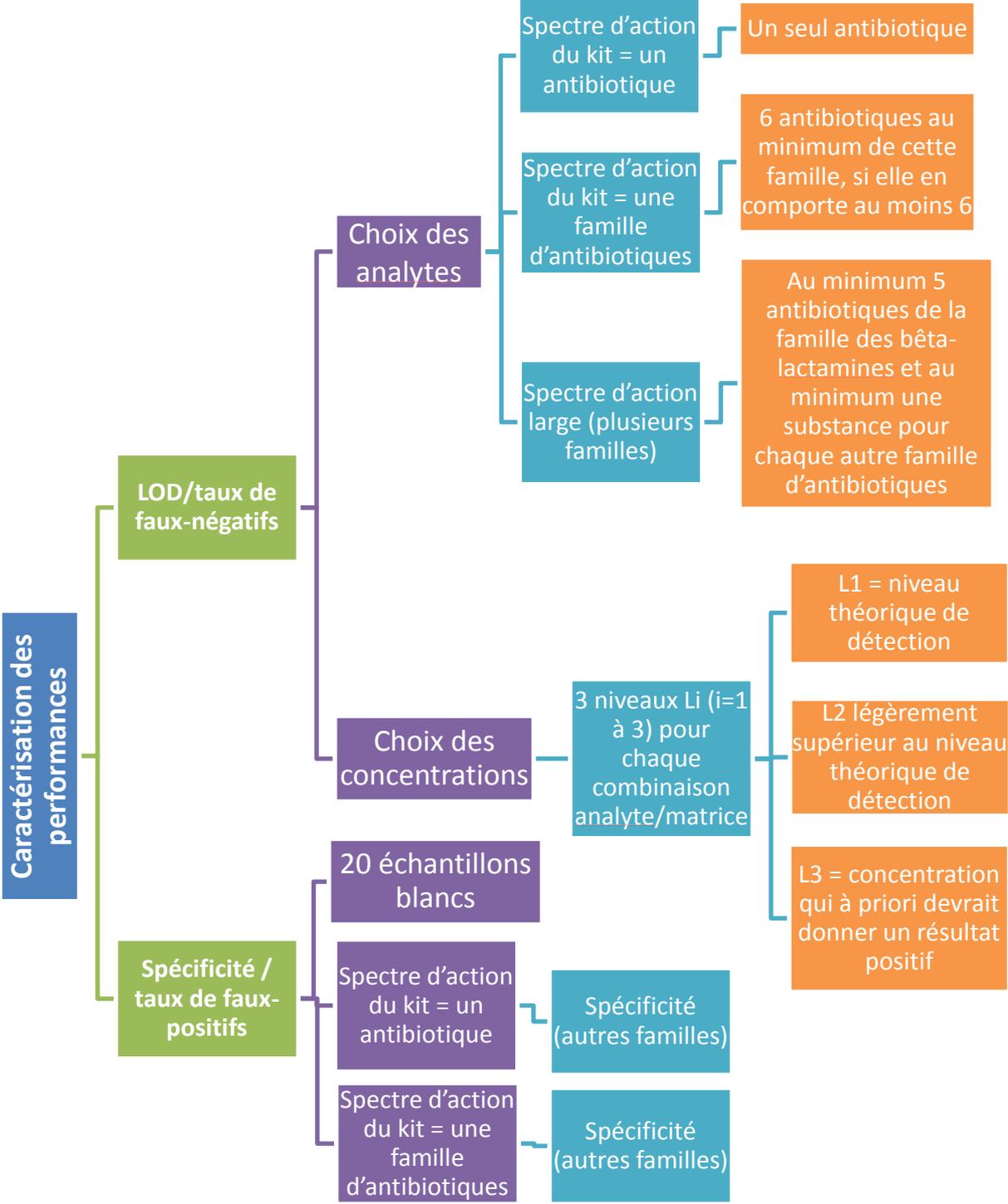


Figure 29. Construction du plan d'expérience pour la détermination de la spécificité et de la limite de détection.



Les échantillons sont codifiés aléatoirement pour réaliser toutes les analyses en aveugle. Chaque concentration d'antibiotique (pour une matrice) sera préparée en 5 exemplaires et chacun sera analysé une fois par la méthode alternative et une fois par la méthode de référence.

La limite de détection correspond à la concentration la plus basse qui donne un résultat positif ou douteux pour chacun des 5 réplicats des essais.

Le taux de faux négatifs est égal au nombre de résultats négatifs obtenus pour des échantillons contaminés (faux-négatifs FN) divisé par le nombre total d'échantillons négatifs (ce même nombre plus le nombre d'échantillons blancs donnant un résultat négatif (vrais négatifs VN)) et multiplié par 100.

$$\text{Taux de faux négatifs} = \frac{FN}{FN+VN} * 100 \quad \text{Equation n°1}$$

Spécificité / taux de faux positifs

L'objectif de ces essais est de démontrer, pour chacune des méthodes, la capacité à garantir que des échantillons donnant des résultats négatifs sont de vrais négatifs (exempt de résidus). Pour cela, 20 échantillons de matrice blanche (dépourvue de résidus d'antibiotiques ou autres substances à activité antibactérienne) seront analysés en double par chacune des méthodes (**Figure 29**). Dans le cas où le spectre d'action du kit est limité à une famille d'antibiotiques, il faudra en plus préparer et analyser des matrices blanches contenant des substances à activité antibiotique issue d'autres familles.

La spécificité correspond à la probabilité que la méthode donnera un résultat négatif pour un échantillon blanc (reconnu exempt de substances à activité antibiotique ou contaminé avec des substances qui ne sont pas détectées par cette méthode, si elle est spécifique d'un antibiotique ou d'une famille).

Le taux de faux positifs correspond au nombre de résultats positifs (faux-positifs FP) obtenus pour des échantillons blancs divisé par le nombre total d'échantillons positifs (ce même nombre plus le nombre d'échantillons contaminés donnant un résultat positif (vrais positifs VP)) et multiplié par 100.

$$\text{Taux de faux positifs} = \frac{FP}{FP+VP} * 100 \quad \text{Equation n°2}$$

Caractéristiques relatives

A partir de l'ensemble des résultats des essais présentés ci-dessus (matériaux contaminés et matériaux blancs), la comparaison des performances des 2 méthodes va être réalisée au moyen de caractéristiques relatives. Le **Tableau 14** présente la synthèse des résultats des deux méthodes, qui va permettre la comparaison.

Tableau 14. Couples de résultats des méthodes de référence et alternative.

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif +/+ (PA)	Déviations positives -/+ (PD) (R-/A+)
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives +/- (ND) (A-/R+)	Accord négatif -/- (NA)

L'accord positif (PA) et l'accord négatif (NA) correspondent à un résultat identique avec la MR et avec la MA (positif et négatif respectivement). Une déviation positive (PD) est observée quand la méthode alternative donne un résultat positif tandis que la méthode de référence donne un résultat négatif. Une déviation positive devient un résultat **faux positif** quand on prouve que le résultat vrai est négatif. Une déviation positive devient un vrai résultat positif quand on prouve que le résultat vrai est positif. Une déviation négative (ND) est observée quand la méthode alternative donne un résultat négatif tandis que la méthode de référence donne un résultat positif. Une déviation négative devient un résultat **faux négatif** quand on prouve que le vrai résultat est positif. Une déviation négative devient un vrai résultat négatif quand on prouve que le vrai résultat est négatif.

Trois caractéristiques relatives sont alors déterminées, à partir de ce tableau de contingence.

L'exactitude relative (AC) est définie comme le niveau de correspondance entre la réponse obtenue avec la méthode de référence et la réponse obtenue avec la méthode alternative sur les mêmes échantillons.

$$AC = \frac{PA+NA}{N^1} * 100 \quad \text{Equation n°3}$$

La sensibilité relative (SE) est la capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte quand la méthode de référence le détecte.

$$SE = \frac{PA}{N+2} * 100 \quad \text{Equation n°4}$$

La spécificité relative (SP) est la capacité de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte quand la méthode de référence ne le détecte pas.

$$SP = \frac{NA}{N-3} * 100 \quad \text{Equation n°5}$$

Où : ¹N = NA + PA + PD + ND : nombre total d'échantillons

²N- est le nombre total d'échantillons négatifs obtenus avec la méthode de référence (NA + PD)

³N+ est le nombre total d'échantillons positifs échantillons obtenus avec la méthode de référence (PA + ND).

Ensuite, les intervalles de confiance (IC) sont calculés pour chaque pourcentage p de AC, de SE et de SP et associés au nombre d'échantillons soumis à l'essai. Deux calculs différents sont proposés, en fonction de la valeur de la caractéristique.

- Si 10% < p < 90%, l'intervalle de confiance **bilatéral** à 95% approximatif est calculé :

$$IC\ 95\% \approx p \mp 2 * \sqrt{p(1-p)/n} \quad \text{Equation n°6}$$

avec n=N, N+, N- respectivement pour p (%) = AC, SE, SP.

- Si p ≥ 90%, la Limite de confiance inférieure (Low Confidence Limit LCL) à 95% (limite **unilatérale**) est déterminée à partir de la table de la loi binomiale pour un n et un p donné.

Examen des résultats discordants

Le test de Mc Nemar est utilisé afin de déterminer si les méthodes sont différentes ou non, en termes de sensibilité et spécificité. Ce test permet de comparer deux échantillons appariés. Ici, les deux échantillons représentent les résultats de chacune des deux méthodes.

Le nombre de résultats discordants Y entre les deux méthodes correspond à la somme des déviations positive et négative ($Y = PD + ND$). Quand Y est inférieur à 6, aucun test statistique n'est disponible. A l'inverse, quand les valeurs de PD et ND sont élevées et quasiment équivalentes, le test de Mc Nemar ne peut montrer aucune différence statistique entre les 2 méthodes. Toutefois, le laboratoire expert doit tenter d'expliquer les causes de ces valeurs de PD et ND élevées.

Ensuite, deux cas se présentent :

- Si $6 \leq Y \leq 22$, m est déterminée comme la plus petite des 2 valeurs de PD et ND. Pour une valeur de Y donnée, un $M = \text{Max}(m)$ avec $\alpha < 0.05$ est déterminé à partir de la table de la loi binomiale. Si $m \leq M$, les 2 méthodes sont différentes à $\alpha < 0.05$ (bilatéral).
- Si $Y > 22$, le test de McNemar avec la distribution de Chi deux pour 1 degré de liberté (ddl) est appliqué.

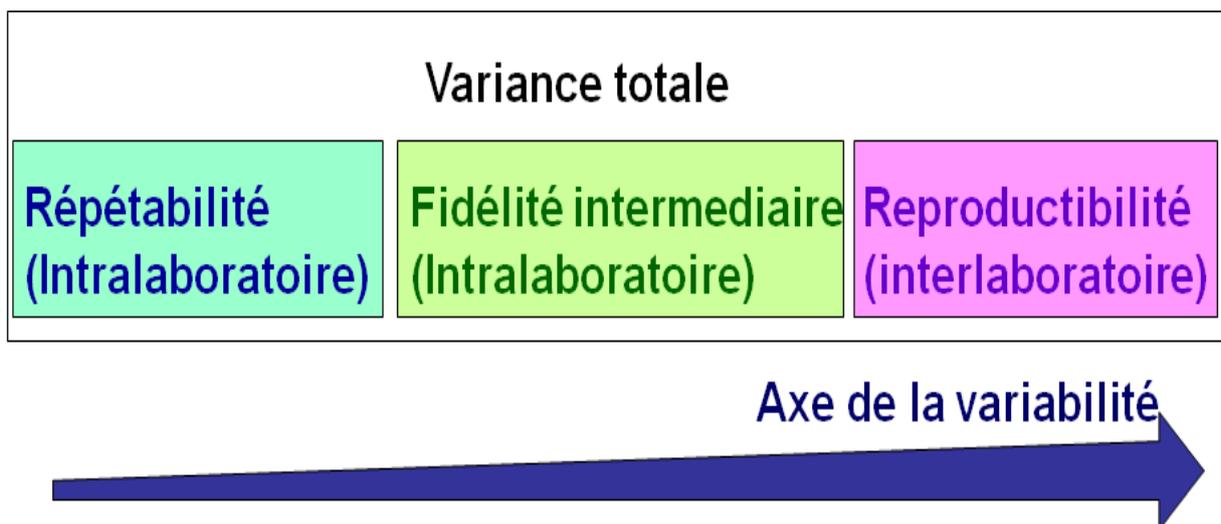
$$\chi^2 = \frac{d^2}{Y}, \text{ avec } d = |PD - ND| \quad \text{Equation n°7}$$

Pour un Y donné, d doit être supérieur ou égal à la valeur donnée dans une table pour conclure que les 2 méthodes sont différentes pour $\alpha < 0.05$ (bilatéral).

3.2.1.1.2. Etude collaborative

Dans cette deuxième phase, seule la méthode alternative (le kit) est mise en place par les laboratoires participants. L'objectif de l'étude collaborative (ou EILV) est de déterminer la fidélité de la méthode, dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité inter-laboratoires (**Figure 30**). Comme nous avons choisi dans cette thèse de nous focaliser sur la validation intra-laboratoire, cette deuxième phase de l'étude de validation d'une méthode alternative ne sera pas développée ici.

Figure 30. Participation de la répétabilité, de la fidélité intermédiaire et de la reproductibilité dans la détermination de la fidélité.



3.2.1.1.3. Conclusions sur l'approche comparaison de méthodes

Nous n'avons trouvé aucun avantage à utiliser l'approche de validation par comparaison de méthodes pour les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques.

Quel que soit le domaine d'application des méthodes, l'inconvénient majeur de l'approche par comparaison de méthodes est le suivant : la méthode alternative est caractérisée par comparaison avec une autre méthode. Elle n'est donc pas caractérisée individuellement, et les probabilités d'erreur de cette méthode (*eg.* risque β de produire des résultats faux-négatifs) ne sont pas déterminées.

Les inconvénients spécifiques au domaine des résidus de cette approche sont multiples :

- il n'existe pas de méthodes normalisées, dites de référence, par opposition à la microbiologie alimentaire. Le choix de la méthode de référence est donc fait par le laboratoire expert. En général, la méthode de référence utilisée est la méthode officielle française, utilisée dans les plans de contrôle et plans de surveillance (PSPC) pour la matrice concernée. Le principe de la méthode de référence est souvent différent de celui du kit, la préparation de l'échantillon est parfois aussi différente, ce qui complique la mise en place de l'étude comparative.
- le problème se pose de l'obsolescence des méthodes de référence. L'évolution des méthodes analytiques, y compris en dépistage, est continue ; nous l'avons vu avec les méthodes de type biocapteurs. Ces méthodes dites alternatives sont de fait plus performantes que les MR. Le plus souvent, la MA est plus performante que la MR. La détermination de caractéristiques de performance relatives et donc le désaccord obtenu entre les deux méthodes peut pénaliser une méthode alternative plus performante que la MR.
- Aucun critère n'est fixé pour statuer sur la validation de la méthode en ce qui concerne la détermination de la spécificité, de la sensibilité, du taux de faux-négatifs et du taux de faux-positifs de la méthode alternative. La seule possibilité est de comparer ces paramètres déterminés pour la MR avec ceux obtenus avec la MA. En outre, dans la pratique, pour le dépistage des résidus d'antibiotiques, le laboratoire expert dans son rapport compare les paramètres obtenus, soit avec les critères de performance réglementaires (*eg.* Taux de faux-négatifs inférieur ou égal à 5 % [13]), soit avec les limites réglementaires européennes (*eg.* LMR).
- Dans le domaine de la microbiologie alimentaire, si un kit est certifié AFNOR, le laboratoire utilisateur n'a pas besoin de le valider. Ce n'est pas le cas dans le domaine des résidus puisque le protocole de validation de l'AFNOR est complètement différent des exigences de la décision 2002/657/CE [13] et du guide de validation Européen (2010) [256].

Après l'approche relative, basée sur la comparaison de méthodes, nous allons nous intéresser à l'approche absolue. Dans cette approche, la validation comporte deux étapes :

- Tout d'abord la caractérisation des performances de la méthode,
- Ensuite l'étape de validation proprement-dite, qui consiste à comparer les valeurs des paramètres de performances obtenus pour les caractéristiques étudiées, aux critères de validation prédéterminés, soit de manière globale (3.2.1.2.), soit critère par critère (3.2.1.3.).

3.2.1.2. L'approche globale : le profil d'exactitude :

L'approche globale consiste à déterminer une caractéristique de performance. Ensuite, la validité de la méthode est statuée par rapport à un intervalle d'acceptabilité (eg. réglementaire). Une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) a développé un concept de validation basé sur l'erreur totale et le profil d'exactitude pour les méthodes quantitatives [250-253, 268].

Le profil d'exactitude est un modèle statistique utilisé pour valider des **méthodes quantitatives**.

En outre, une approche globale a été développée pour les méthodes qualitatives binaires. Elle est fondée sur la probabilité de détection (POD). Cette approche a été présentée pour la première fois par Wilrich en 2009 [269], puis Wehling en 2011 [270].

3.2.1.2.1. Le profil d'exactitude :

La caractéristique de performance pour cette approche est l'exactitude, c'est-à-dire la combinaison de la justesse (erreur systématique) et de la fidélité (erreurs aléatoires). En utilisant les mesures de répétabilité et de fidélité intermédiaire, le profil d'exactitude permet de calculer un intervalle où sera situé une proportion connue de mesures. Lorsque cet intervalle est comparé à un intervalle d'acceptabilité défini par l'utilisateur ou réglementairement, il est possible de décider simplement si une méthode est valide ou non [271].

a. Construction des plans d'expérience

Deux plans d'expérience sont construits (**Tableau 15**) :

- Un plan d'étalonnage (standards en solution et/ou en matrice), qui sert à estimer la fonction de réponse de la méthode.

Le plan d'étalonnage n'est nécessaire que pour les méthodes indirectes, c'est-à-dire les méthodes pour lesquelles un étalonnage préalable est nécessaire pour calculer les concentrations des échantillons inconnus.

Pour réaliser le plan d'étalonnage, il faut définir les niveaux de concentration k' , le nombre de séries I et le nombre de répétition par niveau J' . Le choix de ces différents paramètres doit s'approcher au maximum des conditions des analyses de routine ultérieures. Le nombre k' peut être différent du nombre k du plan de validation et égal à 1 si on est sûr que la droite passe par 0. Le nombre k' dépend du type de fonction de réponse de la courbe d'étalonnage. Le modèle d'étalonnage le plus souvent utilisé pour les méthodes de dépistage immunologiques (e.g. ELISA) est la fonction logistique à 4 paramètres. Dans ce cas, le nombre de niveaux de concentration k' pour le plan d'étalonnage est de 5 niveaux minimum. Il est recommandé de prendre au moins un niveau de plus que le nombre de paramètres de la fonction d'étalonnage, afin d'avoir la meilleure estimation statistique des paramètres de la fonction de réponse. Ensuite, il faut faire I séries de mesures. Enfin, pour chaque série, il faut effectuer J' répétitions. Le nombre d'essais à réaliser pour le plan d'étalonnage est donc égal à $I \cdot J' \cdot k'$ essais.

- Un plan de validation (standards supplémentés dans la matrice), qui sert à déterminer les caractéristiques de validation.

Tableau 15. Construction des plans d'expérience (étalonnage et validation).

	Plan d'étalonnage	Plan de validation
Niveaux de concentration	k' niveaux, nombre $k' \geq 1$	k niveaux, $k \geq 3$
Nombre de séries	l séries réparties sur l jours, nombre $l \geq 3$	l séries réparties sur l jours, nombre $l \geq 3$
Nombre de répétitions	J' répétitions, nombre recommandé $J' \geq 2$, au choix pour chaque étalon et pour chaque série	J répétitions, nombre $J \geq 2$, constant pour chaque série
Nombre total d'essais	$l * J' * k'$ essais	$l * J * k$ essais

Pour réaliser le plan de validation, il faut d'abord choisir les niveaux de concentration à valider et qui vont couvrir le domaine d'application de la méthode. Ensuite, il faut faire des séries de mesures et pour chaque série, il faut effectuer des répétitions. Ensuite, il faut faire I séries de mesures, autant que pour le plan d'étalonnage. Enfin, pour chaque série, il faut effectuer J répétitions. Ce nombre J peut être différent du nombre J' du plan d'étalonnage.

Le nombre d'essais à réaliser pour le plan de validation est donc égal à $I \cdot J \cdot k$ essais. Plus le nombre d'essais est élevé, plus la confiance statistique dans l'estimation des critères de validation est élevée. De même, plus le nombre d'essais est élevé, plus les intervalles de tolérance sont diminués et plus la confiance dans les résultats de la validation augmente.

Les essais de validation doivent être réalisés les mêmes jours que les essais d'étalonnage, afin d'utiliser les fonctions de réponse correspondantes. De plus, toutes les mesures doivent être réalisées dans des conditions de fidélité intermédiaire ou de répétabilité.

b. Modèle d'étalonnage et construction du profil d'exactitude

Les résultats bruts sont utilisés pour choisir le modèle d'étalonnage optimal et construire le profil d'exactitude.

- Choix du modèle d'étalonnage :

Les paramètres du modèle d'étalonnage sont estimés pour chaque série I, en représentant graphiquement la réponse instrumentale Y en fonction des concentrations des standards x. Le calcul des estimations des paramètres du modèle d'étalonnage peut être basé sur différentes techniques statistiques (eg. régression par la méthode des moindres carrés). Le modèle d'étalonnage doit être le même pour toutes les séries I, mais les paramètres estimés peuvent être différents (inter-séries = inter-jours).

A partir des résultats du plan d'étalonnage, il est possible de tester plusieurs modèles d'étalonnage et donc de construire plusieurs profils d'exactitude pour les mêmes données [272]. Le choix du modèle le plus adapté est réalisé à partir des indices suivants : indice d'exactitude (accuracy) I_A , indice de fidélité (precision) I_P , indice d'intervalle de dosage (dosing range) I_{DR} et indice de justesse (trueness) I_T . Le critère appliqué aux indices est le suivant : plus l'indice est proche de 1, plus le modèle est adapté pour cette caractéristique. Ce modèle optimal n'est pas forcément le modèle classiquement utilisé pour ce type de méthodes.

A partir des données du plan de validation dans la matrice, il faut calculer les concentrations prédites inverses z (ou concentrations retrouvées), pour chaque série I, à partir du modèle d'étalonnage correspondant. Pour cela, la fonction inverse du modèle d'étalonnage est utilisée.

- Construction du profil d'exactitude :

Pour construire le profil d'exactitude, il faut tout d'abord fixer les objectifs de la méthode :

- Les limites de tolérance (%) sont liées à la proportion β . Cette proportion est fixée arbitrairement, généralement entre 80 et 95 %, en fonction du champ d'application de la méthode. Elle correspond au pourcentage de résultats qui seront compris en moyenne dans l'intervalle de tolérance calculé.

- Les limites d'acceptabilité ($\pm \lambda$) correspondent aux performances exigées pour la méthode. Elles sont fixées en fonction de l'utilisation prévue en routine (eg. limites réglementaires (eg. critères de justesse dans la décision 2002/657/CE [13]), demande d'un client), parfois en fonction du niveau de concentration. Elles sont exprimées dans la même unité que le mesurande et encadrent la valeur de référence ; elles permettent de délimiter l'intervalle de dosage.

Ensuite, les calculs de justesse (biais ou recouvrement) et de fidélité sont réalisés, à partir des concentrations retrouvées z , par niveau de concentration k , pour chaque modèle d'étalonnage qui va être testé.

Justesse

La justesse peut être exprimée sous la forme d'un critère, au choix parmi les critères suivants :

$$\text{Biais absolu : } b_{ijk} = z_{ijk} - x_{ijk} \quad \text{Equation n°8}$$

$$\text{Biais relatif : } b_{ijk} \% = \frac{(z_{ijk} - x_{ijk})}{x_{ijk}} * 100 \quad \text{Equation n°9}$$

$$\text{Recouvrement : } \frac{z_{ijk}}{\bar{x}_k} * 100 \quad \text{Equation n°10}$$

Le biais permet d'estimer l'erreur systématique de mesure (ou la différence systématique entre la valeur assignée quantitative et la moyenne des résultats de mesure de réplicats) [265]. Le biais (absolu et relatif) doit être proche de zéro, alors que le recouvrement doit être proche de 100%.

Fidélité

Les écart-type de répétabilité (S_{kr}), inter-séries (S_{kB}) et de fidélité intermédiaire (S_{FI}) sont calculés pour chaque niveau de concentration k , de façon indépendante.

$$S_{kFI} = \sqrt{S_{kr}^2 + S_{kB}^2} \quad \text{Equation n° 11}$$

Intervalle de tolérance

β est la proportion du contenu de l'intervalle de tolérance. Si β est égal à 80%, un résultat sur cinq risque d'être en dehors de l'intervalle de tolérance. La valeur de β est généralement choisie entre 80 % et 95 %. Si β est égal à 95%, un résultat sur vingt risque d'être en dehors de l'intervalle de tolérance. Quand β diminue, il y aura plus de chances d'avoir des mesures à l'extérieur des intervalles de tolérance.

L'intervalle de tolérance est un intervalle symétrique autour de la concentration moyenne retrouvée \bar{z} , pour chaque niveau de concentration k . Pour chaque niveau, il faut calculer les limites basses et hautes de l'intervalle de tolérance.

$$\text{Limite de tolérance basse : } = \bar{z} - k_{tol} * S_{IT} \quad \text{Equation n°12}$$

$$\text{Limite de tolérance haute : } = \bar{z} + k_{tol} * S_{IT} \quad \text{Equation n°13}$$

k_{tol} est le facteur de couverture de l'intervalle de tolérance. Il est déterminé en fonction du seuil de tolérance β et du nombre de degrés de liberté (ddl).

$$k_{tol} = t_{v, \frac{1+\beta}{2}} \quad \text{Equation n°14}$$

$t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$ est déterminé à partir de la table de Student, pour v ddl.

Le nombre de ddl est déterminé grâce à l'équation de Satterthwaite [273], qui prend en compte le nombre de répétitions J , le nombre de séries I et le nombre R , qui est le rapport entre la variance inter-séries (inter-jours S_B^2) et la variance de répétabilité (intra-jour S_r^2).

$$R = \frac{S_B^2}{S_r^2} \quad \text{Equation n°15}$$

R reflète l'effet de la série (jour). Si la série n'a pas ou peu d'influence sur le résultat, R sera proche de 1. Par contre, si la série a un effet important, R sera élevé et le nombre de ddl diminuera. Dans ce cas, l'intervalle de tolérance sera élargi. Donc, la méthode aura moins de chance d'être valide.

L'impact de l'augmentation du R sur l'augmentation de l'intervalle de tolérance va diminuer si on augmente le nombre de séries I . Le Tableau 9 dans la norme V03/110 montre l'influence du nombre d'essais et de R sur la largeur de l'intervalle de tolérance (pour un β fixe de 80%) [246].

L'écart-type de l'intervalle de tolérance est calculé avec les équations suivantes :

$$S_{IT} = S_{FI} * \sqrt{1 + \frac{1}{I * J * B^2}}, \quad \text{Equation n°16}$$

$$\text{avec } B = \sqrt{\frac{R+1}{J * R+1}} \quad \text{Equation n°17}$$

L'intervalle de tolérance est lié à l'écart-type de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Moins la répétabilité et la fidélité intermédiaire sont bonnes (écarts-type faibles), plus l'intervalle de tolérance va augmenter et donc moins la méthode aura de chance d'être valide. De plus, l'intervalle de tolérance va augmenter si le facteur B diminue, c'est-à-dire plus on augmente le nombre de répétitions J .

Intervalle d'acceptabilité

L'intervalle d'acceptabilité est représenté sur le profil d'exactitude, avec une limite inférieure et une limite supérieure.

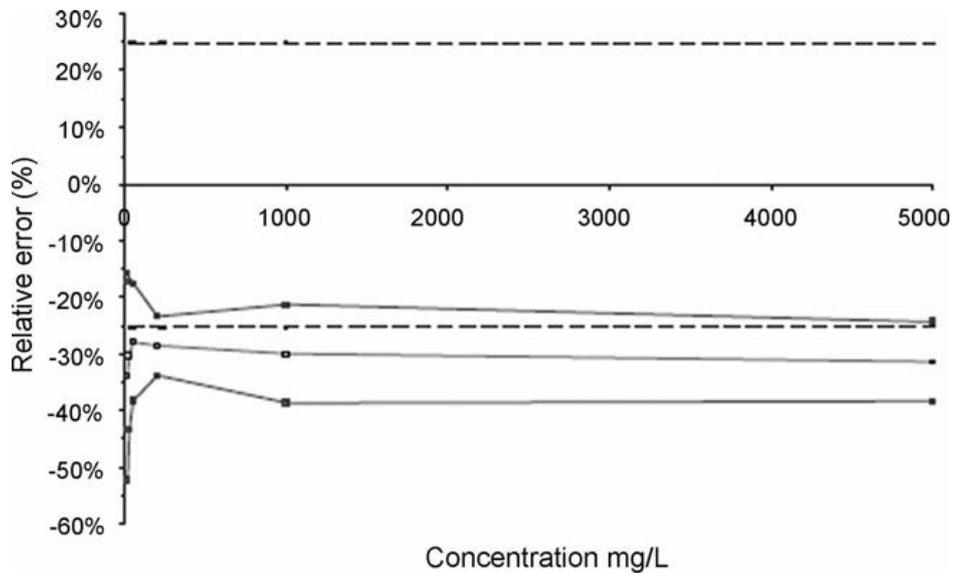
c. Interprétation du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est une représentation graphique des concentrations de référence moyennes (concentrations théoriques) en abscisse, des taux de recouvrement moyens (ou biais relatif), des limites de tolérance relatives (basses et hautes) et des limites d'acceptabilité relatives (basses et hautes) en ordonnées. La **Figure 31a** présente un profil d'exactitude.

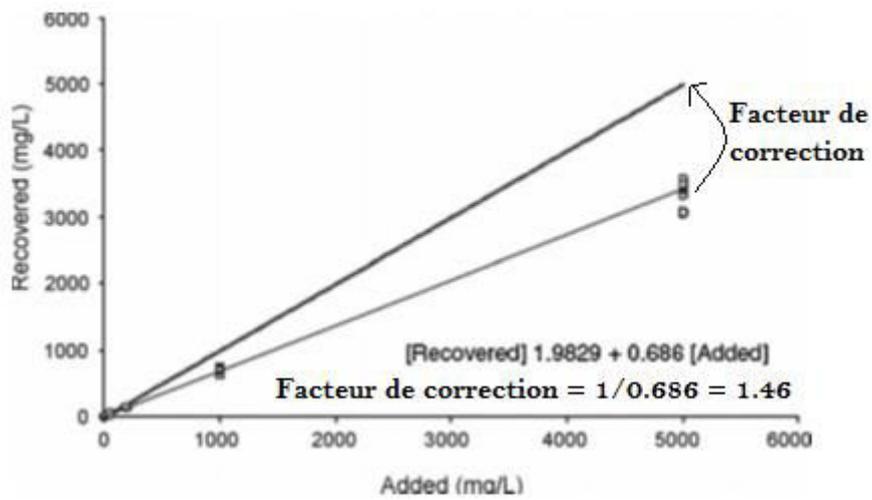
L'interprétation des résultats du profil d'exactitude se fait en fonction des objectifs fixés au départ, concernant la proportion β et les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$. Dans notre domaine des résidus d'antibiotiques, les limites d'acceptabilité sont fixées par la décision européenne 2002/657/CE [13]. En effet, les critères de justesse minimale sont fixés dans un tableau de cette décision, en fonction de la concentration.

Figure 31. Profil d'exactitude extrait de la publication de Hubert *et al.* [253].

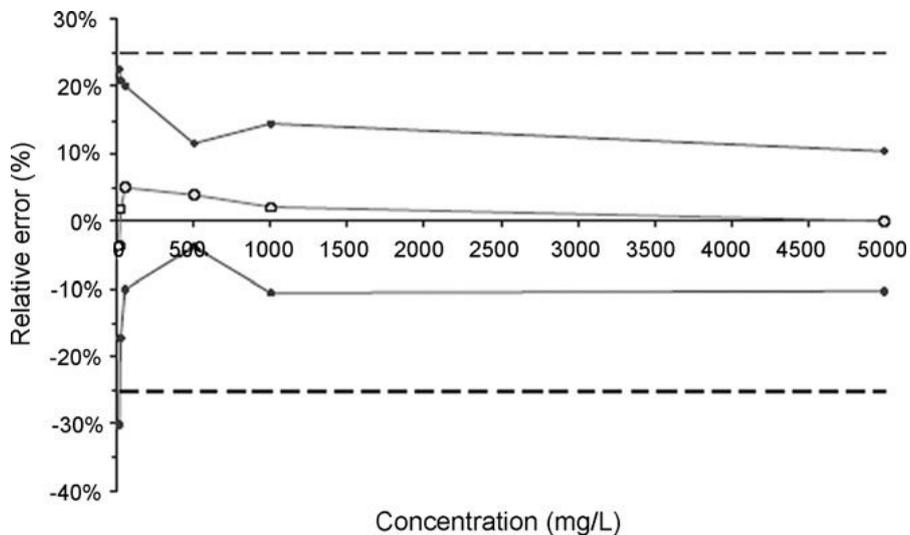
31a. Profil d'exactitude avec un biais.



31b. Représentation graphique de $z=f(x)$ pour le calcul du facteur de correction.



31c. Profil d'exactitude corrigé, à partir de celui du 30a.



La représentation graphique du profil permet une interprétation visuelle dans un premier temps.

La validité de la méthode va être déterminée en fonction des limites de tolérance et des limites d'acceptabilité.

- Pour conclure que la méthode est valide, la majeure partie des intervalles de tolérance doit être compris dans l'intervalle d'acceptabilité. Le domaine de validité de la méthode correspond au domaine dans lequel la proportion de résultats acceptables est au moins égale à β . La partie qui est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité correspond à l'intervalle de dosage. De plus, une limite de quantification (LOQ) basse et une limite de quantification haute vont pouvoir être dérivées du profil d'exactitude. La LOQ basse correspond à la borne inférieure du domaine de validité et la LOQ haute à la borne supérieure du domaine de validité.

- Dans le cas contraire (la majeure partie des intervalles de tolérance n'est pas compris dans l'intervalle d'acceptabilité), la méthode n'est pas valide. Par exemple, la méthode dont le profil d'exactitude est représenté dans la **Figure 31a** n'est pas valide ; elle présente un biais systématique. Ce manque de justesse (biais), par exemple dû à un effet matrice, peut être corrigé, en appliquant un facteur de correction. En fait, l'effet matrice aura déjà été détecté pendant la phase de développement. Dans ce cas, il faudra réaliser deux plans de validation, à partir d'échantillons indépendants. Le premier plan servira à calculer le facteur de correction, facteur qui sera appliqué au deuxième plan. Pour calculer ce facteur de correction, une droite est tracée, en mettant la concentration ajoutée en abscisse et la concentration retrouvée (calculée) en ordonnée (**Figure 31b**). Le facteur de correction est égal à l'inverse de la pente de cette droite. Ce facteur de correction va être appliqué pour tracer un nouveau profil d'exactitude et sera aussi appliqué pour les analyses de routine (**Figure 31c**).

Le profil d'exactitude va permettre de choisir le modèle d'étalonnage optimal, qui pourra être choisi ensuite pour l'application de la méthode en routine. De plus, il peut permettre d'identifier des points aberrants. Toutefois, un grand nombre de valeurs aberrantes est le signe que la méthode n'est pas satisfaisante. Elle devrait être ré-optimisée et revalidée ou abandonnée.

Le profil d'exactitude permet de choisir des points de contrôle (contrôle qualité) pertinents pour suivre les performances de la méthode en routine, par exemple en utilisant une carte de contrôle.

En outre, l'incertitude de mesure peut être dérivée du profil d'exactitude, à partir de l'écart -type de l'intervalle de tolérance S_{IT} , [246].

Le profil d'exactitude peut s'appliquer à différents types de méthodes quantitatives : méthode CL-SM/SM [274, 275], PCR quantitative [276], comptage bactérien par une méthode microbiologique [277], biocapteur optique [278]. Dans ce dernier article, les conclusions de l'approche globale ont pu être comparées avec celles de l'approche conventionnelle critère par critère que nous avons aussi publiée [163]. En résumé, les paramètres de fidélité et de justesse étaient similaires pour le même modèle (logistique à 5 paramètres) et les conclusions identiques. Le meilleur modèle après analyse des différents critères I_A , I_{DR} , I_P et I_T était le modèle quadratique pondéré ($1/X^2$), alors que classiquement, pour les méthodes immunologiques, les modèles utilisés sont le modèle logistique à 4 ou 5 paramètres. Toutefois, la méthode était valide avec le modèle classiquement utilisé et intégré dans le logiciel du système biocapteur.

La norme NF EN ISO 16140 de 2003 [263] a été révisée et est remplacée par une nouvelle version NF EN FDIS ISO 16140-1 et NF EN FDIS ISO-16140-2 [265, 266]. Cette nouvelle version apporte une approche plus statistique de l'exploitation des résultats. A présent, l'approche relative par critère est combinée avec l'approche relative globale appelée probabilité de détection (POD).

3.2.1.2.2. La POD :

La probabilité de détection POD (Probability of detection) est un modèle statistique utilisé pour valider des **méthodes qualitatives**. Cette approche POD a été présentée pour la première fois par Wilrich en 2009 [269], puis par Wehling [270]. Cette approche est à présent intégrée dans la dernière version de la norme NF EN FDIS 16140-2 [266].

L'approche globale permet de combiner 4 caractéristiques (sensibilité, spécificité, faux-positifs et faux-négatifs) en une seule, la POD.

Le premier objectif de la POD était d'harmoniser les approches de validation entre les méthodes qualitatives et quantitatives. Comme le profil d'exactitude, ce modèle permet :

- de réaliser une représentation graphique de la réponse de la méthode,
- de comparer les résultats d'une méthode alternative avec ceux d'une méthode de référence,
- de s'appliquer aussi bien à une validation intra-laboratoire qu'à une validation inter-laboratoires (étude collaborative),
- et de calculer la fidélité d'une méthode lors d'une étude collaborative.

Le deuxième objectif était de pouvoir valider une méthode qualitative, sans obligatoirement se comparer à une méthode de référence. En effet, l'approche statistique préconisée dans l'ISO 16140 (2003) [263] exigeait la mise en place d'une MR pour comparer la MA. Cette exigence posait problème dans le domaine de la microbiologie alimentaire (*eg.* quand aucune MR n'existe), mais aussi dans le domaine des résidus d'antibiotiques, comme nous l'avons observé plus haut (chapitre 3.2.1.1.). Au niveau des lignes directrices de l'AOAC, ce même problème se posait puisque le cas des méthodes pour lesquelles aucune méthode de référence n'existait n'était pas traité non plus [270]. En outre, les tests statistiques classiques n'étaient pas adaptés dans le cas de méthodes non appariées, c'est-à-dire que le protocole d'enrichissement de l'échantillon est différent entre la MA et la MR. Ce modèle a été développé pour être applicable aussi bien aux méthodes (ou analytes) chimiques que biologiques.

a. Le principe de la POD

La POD est une probabilité conditionnelle, avec la concentration en analyte ou en bactéries comme variable conditionnelle. La POD est définie comme « la proportion de résultats analytiques positifs pour une méthode qualitative sur une matrice donnée à une concentration en analyte ou à un niveau d'analyte donné » (NF EN FDIS 16140-2) [266]. Cette probabilité est assimilable à la concentration moyenne calculée pour une méthode quantitative. La POD est concentration dépendante. Plus les concentrations sont faibles, plus la probabilité est proche de zéro. A l'inverse, plus les concentrations sont élevées, plus la probabilité est proche de 1.

Figure 32. Les deux modèles théoriques de courbes de POD (Wehling *et al.* [270]).

Figure 31a. Courbe POD pour une méthode microbiologique (loi de Poisson).

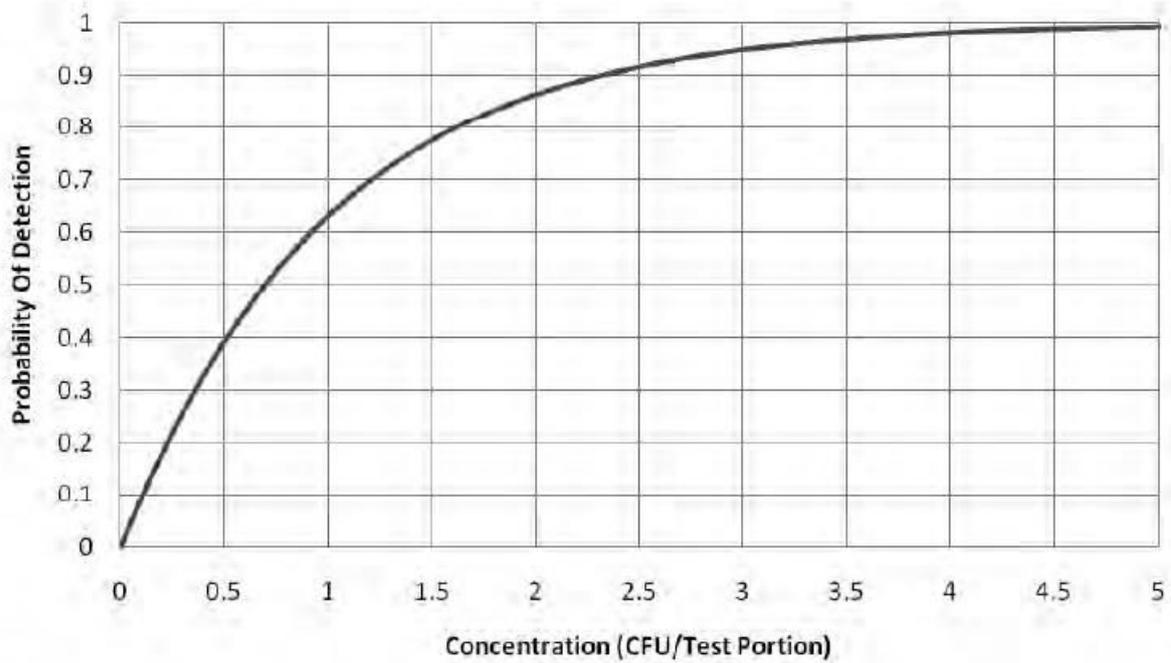
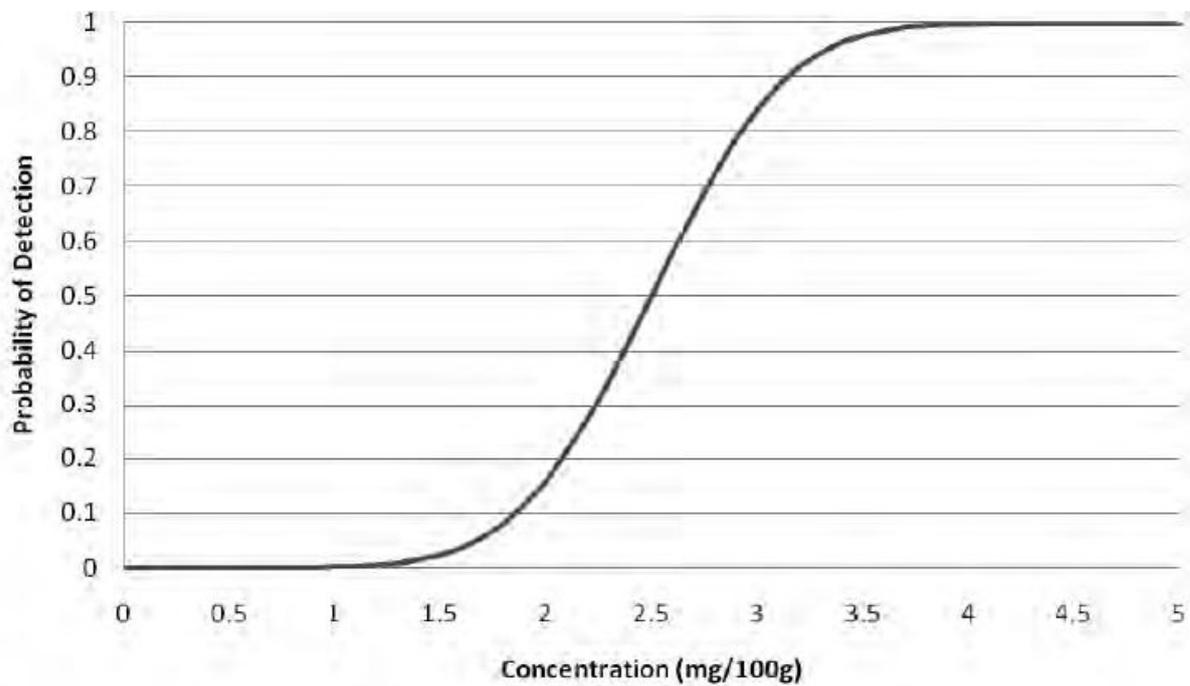


Figure 31b. Courbe POD pour une méthode qui utilise une valeur seuil (eg. ELISA).



Deux modèles théoriques de courbes de POD existent [270]:

- un pour les méthodes microbiologiques (avec une distribution selon la loi de Poisson) (**Figure 32a**),
- un pour les méthodes de type ELISA, pour lesquels une valeur seuil est fixée pour transformer les résultats quantitatifs (densités optiques) en variables qualitatives (+/-) (avec une distribution normale) (**Figure 32b**).

La variance de la POD va être liée aux concentrations en analyte, comme c'est le cas pour les méthodes quantitatives. En effet, quand la POD est proche de 0 ou de 1, la variabilité va diminuer. Par contre, dans l'intervalle de POD compris entre 0.15 et 0.85, la variabilité sera plus forte. Cette variabilité est corrélée à la variabilité entre les portions tests, mais aussi à la variabilité de la méthode dans certains intervalles de concentration. Le maximum de la variabilité sera observé pour $POD = 0.5$. D'après Wehling *et al.* [270], l'écart-type de reproductibilité sera très proche de $\frac{1}{2}$.

Les formules de calculs pour les intervalles de confiance à 95 % sont différentes en fonction du nombre de résultats positifs. Trois cas sont présentés dans la publication de Wehling *et al.* :

$x=0$, $x=N$ et $0 < x < N$ où N est le nombre total d'échantillons testés par niveau.

Dans cette approche, les intervalles de confiance sont représentés sous la forme de barres d'erreur, représentées sur le graphique de POD, pour chaque niveau de concentration (**Figure 33**).

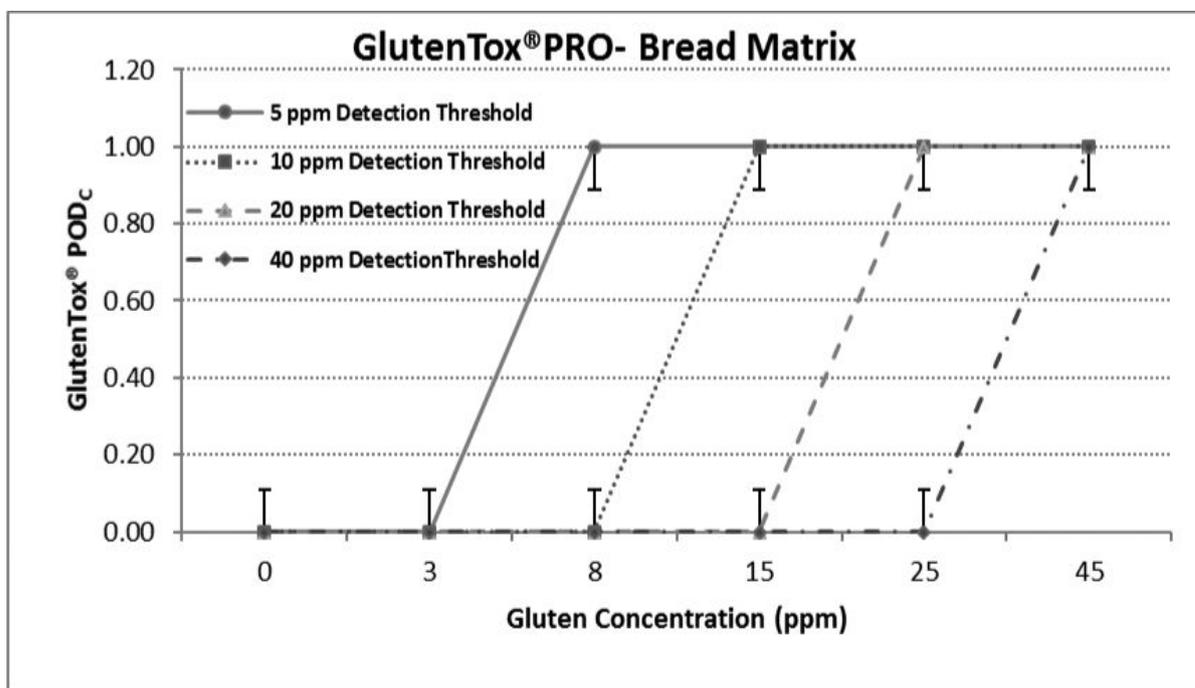
De plus, d'autres paramètres de validation peuvent être estimés à partir de la POD, par exemple une limite de détection (LOD) associée à une probabilité de détection. Par exemple, la LOD50 correspond à la concentration pour laquelle la POD est égale à 50 %.

b. Le protocole AOAC

Selon le protocole AOAC, il faut plus de réplicats pour valider une méthode qualitative que pour valider une méthode quantitative, mais l'approche reste la même [279]. En outre, valider une méthode qualitative, en utilisant des statistiques quantitatives, permettrait d'estimer les performances de la méthode avec moins de réplicats. Toutefois, aucune de ses deux affirmations n'est expliquée ou justifiée par une référence à un autre document.

Le protocole AOAC propose d'utiliser la POD, que ce soit pour une comparaison de méthodes ou pour valider une méthode dans l'absolu. Le choix du nombre de niveaux de concentration et du nombre de réplicats par niveau est crucial pour estimer au mieux le modèle de la courbe POD-concentration. Dans le protocole AOAC, il est conseillé de tester au moins 3 concentrations, avec un niveau très bas (ou absence d'analyte : un blanc) qui va donner une POD très basse, un niveau très élevé qui va donner une POD proche de 1, et enfin une concentration intermédiaire (entre 0.25 et 0.75 POD) [279]. Le nombre de niveaux peut être augmenté, pour accroître la confiance dans la détermination de la LOD. Dans certains cas, le nombre de niveaux peut être réduit à deux. De plus, il est possible d'analyser plus de réplicats à une concentration d'intérêt qu'aux autres concentrations, pour focaliser l'intervalle de confiance sur celle-ci.

Figure 33. Courbe POD pour un test immunochromatographique pour la détection du gluten dans le pain [280].



Enfin, pour comparer deux méthodes (MA/MR), il vaut mieux se focaliser sur la région marginale (0.25-0.75), car c'est là que la probabilité d'observer des différences entre les deux méthodes est la plus élevée. Pour comparer deux méthodes ou une méthode avec une valeur de référence (eg. matériau de référence certifié), la différence entre les deux POD (dPOD) est calculée, ce qui s'apparente à calculer le biais entre deux méthodes quantitatives. Si l'intervalle de confiance de la dPOD ne contient pas le zéro, alors la différence entre les deux méthodes est significative au niveau 5%.

Un exemple d'application à la validation d'un test immunochromatographique commercial pour la détection du gluten dans le pain est présenté dans la **Figure 33**, validé selon le protocole AOAC.

c. La norme NF EN FDIS 16140-2

Dans le protocole de la norme NF EN FDIS 16140-2, le principe de la comparaison de méthodes n'a pas changé par rapport à l'ancienne version de la norme et il n'est pas possible de valider la méthode alternative seule [266]. Il est recommandé de tester au moins 3 niveaux de concentration par type d'aliment, au moins un négatif, un niveau bas (niveau de détection théorique) et un niveau supérieur (légèrement supérieur au niveau de détection théorique). Le niveau bas doit pouvoir donner des résultats positifs et négatifs avec au moins une des deux méthodes. Au moins 5 réplicats doivent être analysés pour le témoin négatif et au niveau supérieur et au moins 20 répétitions au niveau bas (niveau de détection théorique).

Si la limite de détection attendue de la méthode alternative est beaucoup plus basse que celle de la méthode de référence, le niveau bas doit cibler la LOD de la méthode de référence, ce qui signifie que la LOD de la méthode alternative est sous-estimée.

La limite de détection relative la RLOD va être calculée comme suit :

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}} \quad \text{Equation n°18}$$

Les RLOD peuvent être déterminés à partir d'un modèle statistique logarithme-logarithme complémentaire (LLC). Pour ce calcul, les valeurs de contaminations des échantillons ne sont pas nécessaires. Le graphique de la POD va représenter la probabilité de détection en fonction du logarithme de la concentration (niveau de contamination).

3.2.1.2.3. Conclusions sur l'approche globale

Les avantages majeurs de l'approche globale, communs au profil d'exactitude et à la POD, sont :

- l'harmonisation des concepts statistiques entre méthodes quantitatives et méthodes qualitatives,
- un outil de représentation graphique des courbes de réponse des méthodes quantitatives et méthodes qualitatives,
- un outil de prise de décision graphique pour statuer sur la validité de la méthode,

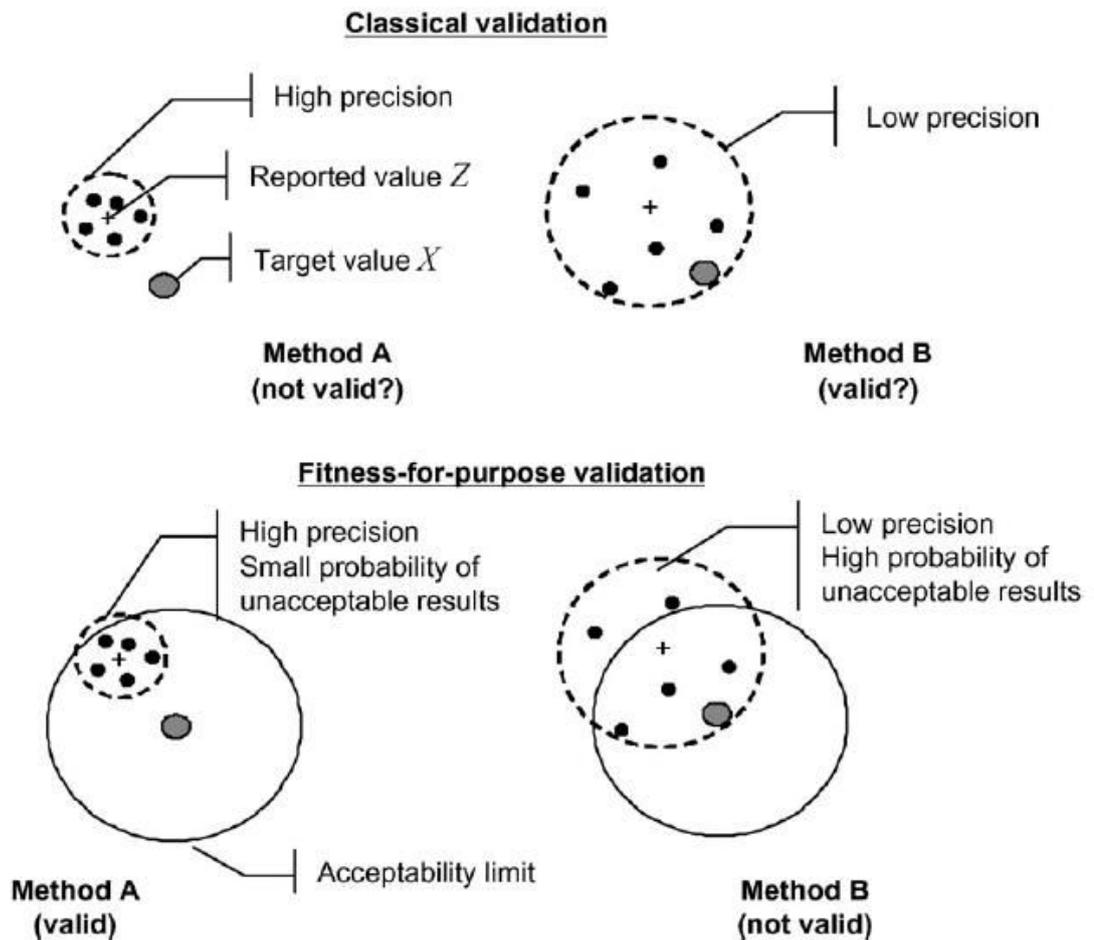
- la prise en compte la totalité des processus de la méthode, comme cela se passera en routine,
- la combinaison de la détermination des caractéristiques de performance qui facilite la prise de décision sur la validité de la méthode. Il n'y a pas de risque d'avoir des conclusions opposées puisque tout est regroupé en un seul paramètre.
- des outils de calcul sous forme de classeurs Excel, libres d'emploi, proposés pour le traitement des données de validation selon le profil d'exactitude et selon la POD, dans les normes V03-110 [246] et NF EN FDIS 16140-2 [266], et des logiciels commerciaux (eg. e-noval®, ProLab®, Statgraphics centurion® (Sigma Plus), SOS Stat VPAQ®, etc).
- des méthodes simples et qui ne demandent pas de connaissances poussées en statistiques pour utiliser les outils,
- l'application possible, aussi bien à une méthode seule (approche absolue), qu'à une comparaison de méthodes (approche relative) (norme V03-110 [246], NF EN FDIS 16140-2 [266]).
- l'application possible en intra-laboratoire, mais aussi en inter-laboratoires.

Les avantages spécifiques du profil d'exactitude sont les suivants :

- combiner deux exigences de la norme NF EN ISO/CEI 17025, c'est-à-dire valider une méthode selon des critères de performance, mais aussi déterminer l'incertitude de la mesure,
- mettre en évidence les effets matrices et possibilité d'appliquer un facteur de correction pour les analyses en routine,
- identifier les points critiques de la méthode,
- sélectionner les QC pour la routine,
- La fonction d'étalonnage peut être non linéaire (eg. logistique, quadratique, etc), comme dans la décision 2002/657/CE.
- Le profil d'exactitude est un outil de prédiction pour la réalisation des mesures en routine, mais également un outil de diagnostic des sources d'erreurs à contrôler en routine.
- L'approche globale du profil d'exactitude peut s'appliquer aux méthodes de comptage des bactéries, mais aussi aux méthodes de PCR quantitative.
- Transfert de la méthode en routine : carte de contrôle ou revalider partiellement avec un plan d'expérience à une concentration.
- dériver le profil d'incertitude à partir du profil d'exactitude [281].

Feinberg *et al.* ont illustré l'intérêt d'utiliser l'approche globale par rapport à l'approche individuelle classique, en représentant des résultats identiques, sur lesquels les critères de chaque approche sont appliqués (**Figure 34**) [271]. Les conclusions de la méthode classique peuvent être opposées car les caractéristiques sont validées individuellement. En effet, les deux méthodes présentées possèdent la même justesse, mais une fidélité différente. La méthode de gauche sur la figure présente un biais, mais une bonne fidélité, alors que la méthode de droite est juste, mais présente une fidélité faible.

Figure 34. Comparaison de l'approche classique de validation et de l'approche globale du profil d'exactitude (Feinberg *et al.* 2007) [271].



Cette figure met en évidence le fait que les conclusions de l'approche globale, grâce aux intervalles d'acceptabilité, sont simples à établir. Seule la méthode de gauche est valide, en fonction des limites d'acceptabilité fixées. Avec l'approche classique, comme la fidélité est bonne à gauche, il semble que la méthode est valide. Toutefois, les critères de justesse doivent être appliqués pour conclure sur la validité de la méthode. Pour la méthode de droite, la justesse est bonne, mais la fidélité est faible. Il est plus difficile de conclure sur la validité de la méthode, en prenant les caractéristiques individuellement. Chacune des caractéristiques doit être comparée à un critère de performance.

Les avantages spécifiques de la POD sont :

- La POD permet de déterminer plusieurs caractéristiques : les taux de faux-positifs et faux-négatifs, la sensibilité et la spécificité, la LOD et le cut-off.
- La LOD peut être déterminée pour différentes probabilités de résultats positifs, par exemple la LOD_{50} ou la LOD_{95} .
- L'estimation de la fonction POD intègre des intervalles de confiance pour les caractéristiques estimées.
- Le niveau de confiance de l'intervalle de confiance de la $LOD_{50\%}$ est égal au niveau de confiance choisi de 95%.
- Un effet matrice peut être visualisé grâce à la POD.

En raison de ces nombreux avantages, le modèle statistique de la POD est à présent intégré à la norme NF EN FDIS 16140-2-2 par exemple pour l'analyse des données des méthodes qualitatives en microbiologie alimentaire lors de l'étude préliminaire et lors de l'étude collaborative. La LOD_{50} est déterminée dans le cadre de la norme NF EN FDIS 16140-2-2 (2013). Des liens avec modèles de feuilles de calcul Excel sont intégrées dans la nouvelle norme NF EN FDIS 16140-2 [266]. Pourtant, la norme NF EN FDIS 16140-2 conserve l'approche classique des caractéristiques de performance relatives (sensibilité et spécificité relative).

En outre, cette approche est aussi intégrée depuis 2014 aux lignes directrices de l'AOAC pour la validation des méthodes chimiques qualitatives [279]. Dans ce cadre, une validation d'une méthode alternative de microbiologie alimentaire (méthode PCR qualitative) [282] et une méthode alternative pour la détection du gluten, un test immunochromatographique en bandelettes, qui est très similaire sur le principe aux tests en bandelettes pour les antibiotiques [280] ont été publiées. A ce jour, aucune publication n'a été trouvée mettant en place l'approche POD pour la validation de méthodes de dépistage des antibiotiques dans les aliments, sans doute car depuis il n'y a pas eu de nouvelle demande de certification ou de demande de modification d'un kit déjà certifié.

Toutefois, l'intérêt de cette approche explique son développement dans cette thèse. Ce modèle pourrait potentiellement s'appliquer aux méthodes microbiologiques ou immunologiques (eg. ELISA) de dépistage des résidus d'antibiotiques. Dans ce cas, l'exigence serait que la POD soit au minimum égale à 95 % pour une concentration cible inférieure ou égale à la limite réglementaire (eg. LMR). En effet, la décision 2002/657/CE exige que l'erreur beta soit inférieure ou égale à 5 % à la LMR ou en dessous.

Le premier inconvénient du profil d'exactitude est que les conclusions sur la validité de la méthode dépendent des critères fixés β et λ . Or le choix de ces deux paramètres peut se révéler compliqué. Dans certains domaines, il n'existe pas de critères réglementaires pour fixer β et λ . Dans le domaine des résidus d'antibiotiques, λ est un critère réglementaire en relation avec la décision européenne 2002/657/CE, mais β n'est pas fixé réglementairement. L'expérience de l'analyste en fonction du type de méthode doit permettre de fixer le critère β . Même si λ est un critère réglementaire, des valeurs minimales et maximales sont fixées pour la justesse et la fidélité dans la décision 2002/657/CE, mais aucune valeur pour l'exactitude. La pratique courante est de sommer les valeurs de justesse et de fidélité pour calculer λ , puisque l'exactitude est la combinaison de la justesse et de la fidélité.

Le deuxième inconvénient de cette approche est que l'optimisation de la fonction de réponse, c'est-à-dire le choix du modèle d'étalonnage le plus adapté ne peut se faire qu'avec un logiciel de traitement des données. Donc, sans logiciel adapté, la fonction de réponse utilisée ne sera peut-être pas optimale et cela aura une influence sur le profil d'exactitude et la validité de la méthode.

L'inconvénient majeur de la POD est que la charge de travail est importante, en regard du nombre de niveaux de concentrations par antibiotique à valider et du nombre de réplicats par niveau, nécessaires pour avoir une confiance raisonnable dans le modèle. Quand la méthode recherche un germe par exemple, même si les matrices alimentaires doivent être variées, cela équivaut à valider un seul antibiotique. Alors que les méthodes de dépistage microbiologique et multiplex de type biocapteurs sont capables de détecter des dizaines d'antibiotiques différents.

Uhlig *et al.* ont critiqué l'approche proposée par Wilrich *et al.* [269] et par Wehling *et al.* [270] dans le cadre d'une étude inter-laboratoires [283]. D'après eux, les variances ne sont pas homogènes entre les laboratoires et donc l'analyse de variance (ANOVA) ne peut pas être réalisée puisque l'homogénéité des variances est un pré-requis pour l'ANOVA. Wehling ne parle de ce problème et Wilrich a proposé une approche pour éliminer ce problème. D'après Uhlig *et al.*, l'écart-type de reproductibilité ne peut permettre d'évaluer la performance d'une méthode qualitative dans le cadre d'une étude collaborative. Quant à l'écart-type inter-laboratoires, il semble présenter des limites. Cette équipe propose une autre approche.

3.2.1.3. Les approches critère par critère :

Les différentes étapes de la validation suivant l'approche critère par critère sont présentées dans la **Figure 35**. L'approche appelée critère par critère est une approche qui nécessite la détermination d'une caractéristique de performance à la fois. De plus, l'interprétation des résultats est individualisée, caractéristique par caractéristique. Des critères de validation différents sont appliqués sur chacune des caractéristiques calculées. Le but de la validation est de démontrer que la méthode analytique est conforme aux critères applicables pour les caractéristiques de performance appropriées.

3.2.1.3.3. Les approches critère par critère en fonction de la réglementation :

Deux grands types d'approche vont être discutés : la validation AOAC, qui représente l'approche des Etats-Unis et la validation suivant la réglementation européenne (**Figure 36**). Ensuite, les caractéristiques de performance à déterminer ainsi que les critères d'acceptabilité seront présentés. Certaines caractéristiques et critères peuvent varier en fonction de l'approche.

a. La validation AOAC

La validation selon les principes et procédures de l'AOAC permet d'obtenir la certification AOAC pour une méthode. Ces études suivent les exigences du AOAC Research Institute et de l'administration américaine (U.S. Food and Drug Administration (FDA)). Les études de validation AOAC sont basées sur une approche par comparaison entre une méthode alternative et une méthode de référence dans le domaine de la microbiologie alimentaire [284, 285]. Par contre, dans le domaine des kits pour le dépistage de résidus d'antibiotiques, toutes les validations sont réalisées selon une approche absolue, critère par critère, basée uniquement sur la méthode alternative. Seule l'étude de l'effet matrice peut faire intervenir une méthode de référence, si elle est disponible.

Trois cas de figures ont été trouvés dans la littérature concernant l'organisation de la validation AOAC pour des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques :

- Soit toute l'étude de validation a été réalisée entièrement par un laboratoire indépendant [23],
- Soit la majeure partie de l'étude a été réalisée par un laboratoire indépendant, mais l'étude de robustesse a été réalisée par le laboratoire du fabricant [286, 287],
- Soit une partie de la validation a été réalisée par le laboratoire d'origine (ou développeur) et le reste de la validation par un laboratoire indépendant [288, 289]. Le protocole de l'étude de validation indépendante, dans ce cas, est destiné à vérifier les performances déclarées de la méthode, dans des conditions contrôlées en laboratoire et à caractériser la méthode dans les conditions d'utilisation prévues.

Au final, le laboratoire développeur rédige un rapport synthétisant les résultats des deux études de validation. Ce rapport de validation est évalué par des pairs (un expert et deux rapporteurs), qui décident ou non d'accorder la certification AOAC. La certification est accordée si :

- les résultats de l'étude de validation réalisée par le laboratoire développeur sont en accord avec les performances revendiquées dans la notice du kit,
- les résultats de l'étude de validation indépendante confirment les résultats de l'étude de validation du laboratoire développeur, dans les limites statistiques fixées dans le protocole d'étude de validation.

Figure 35. Les différentes étapes de la validation suivant l'approche critère par critère.

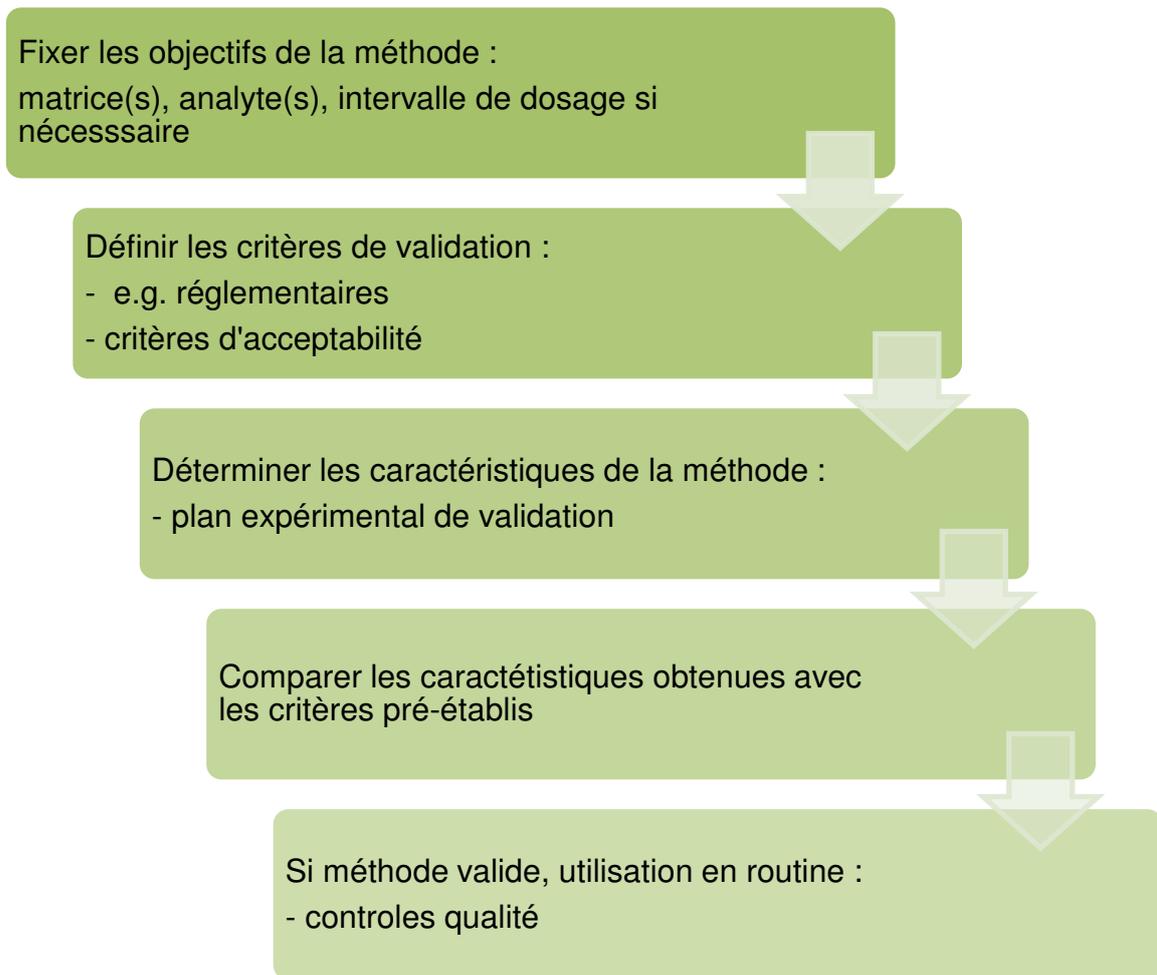
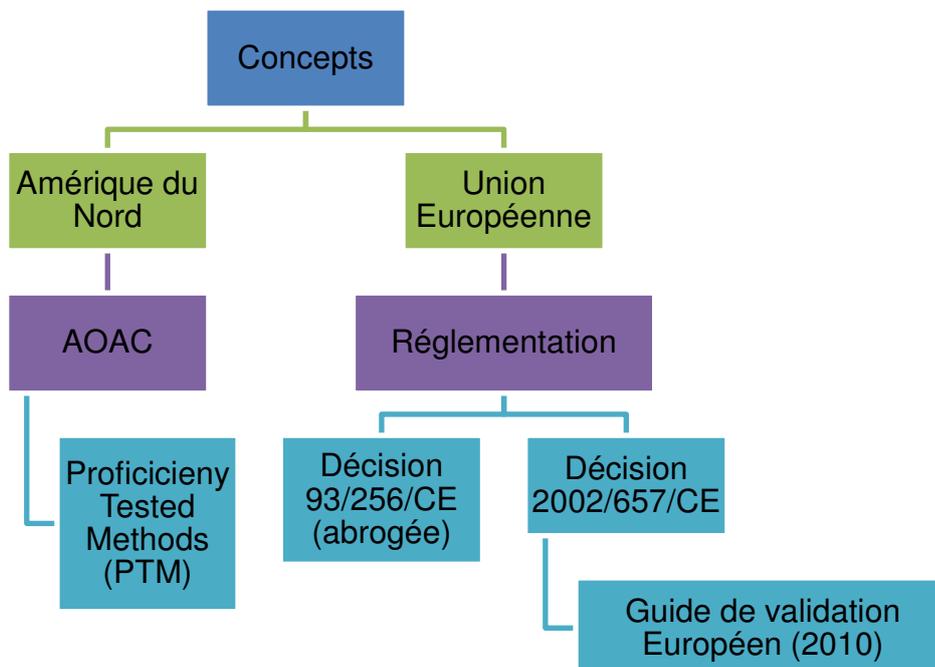


Figure 36. Les deux approches critère par critère en fonction de la réglementation.



- les résultats permettent de conclure que le kit a des performances similaires ou meilleures que la méthode de référence appropriée (le cas échéant),
- les résultats sont conformes aux critères d'acceptation figurant dans les protocoles d'étude de validation,
- les résultats répondent aux exigences minimales de performance (si elles existent).

Le rapport d'étude de validation approuvé par les pairs doit être soumis à l'AOAC pour publication dans le Journal l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode obtient alors la certification « Performance Tested Method » (PTM). Cette méthode peut ensuite être utilisée aux Etats-Unis dans le cadre des contrôles officiels.

b. La décision européenne 93/256/CE

En Europe, la réglementation concernant les exigences de validation est différente. La validation des méthodes d'analyse pour le dépistage et la confirmation des médicaments vétérinaires et des contaminants dans les aliments d'origine animale était décrite dans la décision 93/256/CE de la Commission du 14 avril 1993 arrêtant les méthodes à utiliser pour la recherche de résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyrostatique [290].

Les exigences concernant les méthodes de dépistage étaient très faibles dans cette décision. En effet, il était écrit : « Il n'est pas possible de fixer des exigences pour les méthodes de dépistage. Leur principale qualité réside dans le fait que l'incidence des faux résultats négatifs doit être la plus faible possible ». Cette décision contenait très peu d'information sur la façon de déterminer les caractéristiques de performance, telles que la spécificité. Il y avait très peu d'exigences à respecter dans le protocole de validation, en dehors d'un nombre minimal de blancs à analyser pour calculer la limite de détection.

Les premières validations de méthodes immunologiques suivant la décision 93/256/CE ont été réalisées en considérant la méthode développée comme une méthode quantitative [290]. Par la suite, au laboratoire, les méthodes immunologiques seront validées uniquement en qualitatif. En effet, les caractéristiques de performance quantitatives (fidélité, exactitude) ne respectent pas généralement les critères de performance attendus pour une méthode quantitative. De plus, dans le contrôle réglementaire, les résultats positifs du dépistage sont nécessairement confirmés par une méthode physico-chimique qui identifie et quantifie la (ou les) substance(s) présente(s).

c. La décision européenne 2002/657/CE

Suite aux évolutions très importantes des méthodes analytiques, la décision 93/256/CE a été abrogée et remplacée par la décision 2002/657/CE [13]. La décision 2002/657/CE est liée à la directive 96/23/CE [2], qui prévoit des mesures de contrôle, dont la liste des substances à l'annexe I (c'est-à-dire, des substances ayant un effet anabolisant ou substances non autorisées (groupe A) et des médicaments vétérinaires et de contaminants (par exemple, des substances antibactériennes,

d'autres médicaments vétérinaires (vermifuges, coccidiostatiques, sédatifs), d'autres substances et contaminants environnementaux (pesticides, éléments chimiques, les mycotoxines, colorants) (groupe B)). Ainsi, en Europe, chaque méthode analytique développée pour détecter ou confirmer les contaminants alimentaires ci-dessus devrait être validée selon les exigences de la décision de la 2002/657/CE [13].

La décision européenne 2002/657/CE établit des caractéristiques et des critères de performance pour caractériser, puis conclure sur la validité de la méthode [13]. Une caractéristique de performance y est définie comme une qualité fonctionnelle qui peut être attribuée à une méthode d'analyse. Un critère de performance est défini comme une exigence en matière de caractéristique de performances à partir desquelles il est possible de juger qu'une méthode d'analyse convient pour l'objectif poursuivi et donne des résultats fiables. Cette décision explique comment déterminer les caractéristiques de performance des méthodes d'analyse et définit les critères de performance. Toutefois, cette décision s'applique particulièrement pour les méthodes de confirmation, mais donne très peu d'information quant aux méthodes de dépistage.

d. Le guide de validation Européen pour les méthodes de dépistage :

De 2005 à 2009, les Laboratoires de Référence de l'Union Européenne (LRUE) avec la DGSANTE ont formé un groupe de travail auquel j'ai participé. Ce groupe de travail a rédigé un guide pour la validation des méthodes de dépistage qui a été publié sur le site de la DGSANTE en Janvier 2010 [256] ([http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en .htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm)). Ce guide est applicable à tout type de méthode de dépistage : microbiologique (méthode interne, test commercial), immunologique (eg. ELISA, test récepteur, biocapteur) et physico-chimique (de la Chromatographie Couche Mince (CCM) à la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)). De plus, il s'applique aux méthodes qualitatives et quantitatives, ainsi que pour toutes les denrées alimentaires d'origine animale (eg. lait, muscle, miel, etc).

Ce guide est un outil pour aider les laboratoires à mettre en place la validation des méthodes de dépistage, en accord avec les exigences de la décision 2002/657/CE. Le guide donne des recommandations pour construire le plan de validation afin de déterminer les différentes caractéristiques de performance exigées par la décision 2002/657/CE et indique aussi les critères d'acceptabilité quand c'est nécessaire.

Le guide de validation [256] pose les bases pour deux types de validation :

- La validation initiale concerne une nouvelle méthode ou une méthode dont les données de validation ne sont pas publiques. Elle peut être réalisée par le laboratoire qui a développé la méthode ou par un autre laboratoire. Elle consiste en une validation complète et approfondie.
- La validation de transfert concerne une méthode dont les données de validation sont publiques (eg. kit commercial) ou une méthode transférée du laboratoire développeur vers un laboratoire d'application, qui souhaite mettre en place la méthode dans son propre laboratoire, sans modifications notables. Elle est réalisée par le laboratoire d'application et consiste en une validation réduite (volume d'analyses réduit), qui permet de vérifier les performances du test, en comparaison avec la validation initiale et des critères de performance.

La première différence au niveau de ces deux types de validation est que toutes les caractéristiques de performance ne sont pas à déterminer à nouveau lors de la validation de transfert. Seules la spécificité et les capacités de détection doivent être déterminées en transfert, afin de les comparer à celles de la validation initiale. La deuxième différence est que le nombre d'échantillons à analyser pour déterminer le(s) CC β est réduit dans la validation de transfert : 20 échantillons quelle que soit la concentration cible de dépistage et son rapport avec la limite réglementaire.

Nous allons maintenant présenter les différentes caractéristiques de performance à déterminer, en fonction de l'approche utilisée (décision 93/256/CE, AOAC et 2002/657/CE).

3.2.1.3.4. Caractéristiques de performance à déterminer:

Les différentes caractéristiques de performance à déterminer pour une méthode de dépistage sont présentées dans la **Figure 37**. Quelle que soit l'approche, pour une méthode de dépistage qualitative, il faut déterminer la spécificité/sélectivité, la limite de détection, l'applicabilité, la robustesse et la stabilité. Pour une méthode de dépistage quantitative, il faut ajouter à ces caractéristiques la fidélité. Pour déterminer ces caractéristiques de performance, un plan de validation doit être construit.

Ce plan va définir plusieurs paramètres, permettant cette détermination, comme par exemple le nombre d'échantillons à analyser ou la répartition des analyses en intra-jour ou en inter-jours. Le plan de validation présenté dans la **Figure 38** illustre les expériences à réaliser pour déterminer les caractéristiques de performance, suivant les recommandations du guide Européen de validation des méthodes de dépistage et donc suivant les exigences de la décision 2002/657/CE.

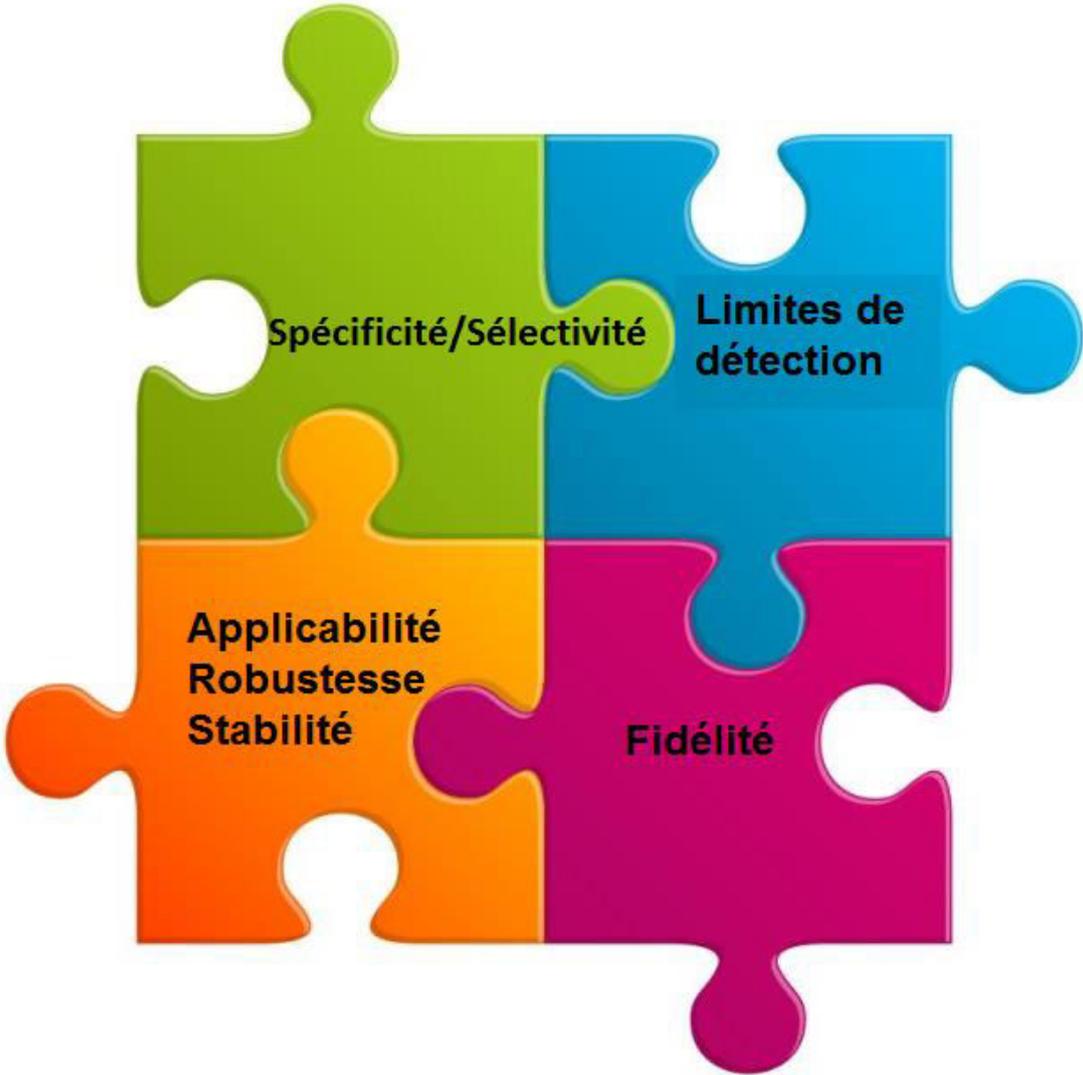
a. Limites de détection (LOD) :

Le terme limite de détection est défini comme la plus petite concentration qui peut être détectée. En dessous de cette limite, l'analyte ne peut être détecté. En fonction de la réglementation ou du référentiel de validation, la LOD peut être estimée de différentes façons.

Limite de détection (Décision 93/256/CE)

La limite de détection (LOD) était définie comme « la teneur minimale mesurée à partir de laquelle il est possible de déduire la présence de l'analyte avec une certitude statistique raisonnable (au moins 95% pour les substances non autorisées) ». Vingt échantillons blancs représentatifs devaient être analysés. La LOD se calculait, soit à partir de la moyenne des teneurs des échantillons blancs plus 3 fois l'écart-type, soit à partir de trois fois la hauteur du bruit de fond entre pics. Ce mode de calcul était ciblé sur les méthodes physico-chimiques et peu adapté pour les méthodes biologiques.

Figure 37. Caractéristiques de performance à déterminer pour une méthode de dépistage,.



Sensibilité 90/95% (AOAC)

La sensibilité correspond au pourcentage de résultats positifs trouvés parmi les résultats positifs attendus.

Selon le référentiel de l'AOAC, le niveau de sensibilité à 90/95% correspond à la concentration la plus basse estimée qui donne un résultat positif pour au moins 90 % des échantillons supplémentés testés, contenant cette concentration en analyte, avec un intervalle de confiance de 95 %. Ce niveau de sensibilité est déterminé à partir de la courbe dose/réponse, qui représente le pourcentage de résultats positifs obtenus en fonction de la concentration.

Le principe de la validation est le même pour une méthode immunologique ou pour une méthode microbiologique, avec seulement quelques différences dans le protocole. Pour un test microbiologique à large spectre pour le dépistage des antibiotiques dans le lait, le niveau de sensibilité à 90/95% a été calculé à partir d'environ 1900 échantillons pour 4 antibiotiques [23]. Pour des tests immunologiques spécifiques des bêta-lactamines, la détermination de la sensibilité 90/95% a nécessité environ 1400 échantillons pour 5 antibiotiques [286, 288].

Le niveau de sensibilité 90/95%, ainsi que la sélectivité sont déterminés soit par le laboratoire du fabricant, puis vérifiés par le laboratoire indépendant, soit directement déterminés par le laboratoire indépendant.

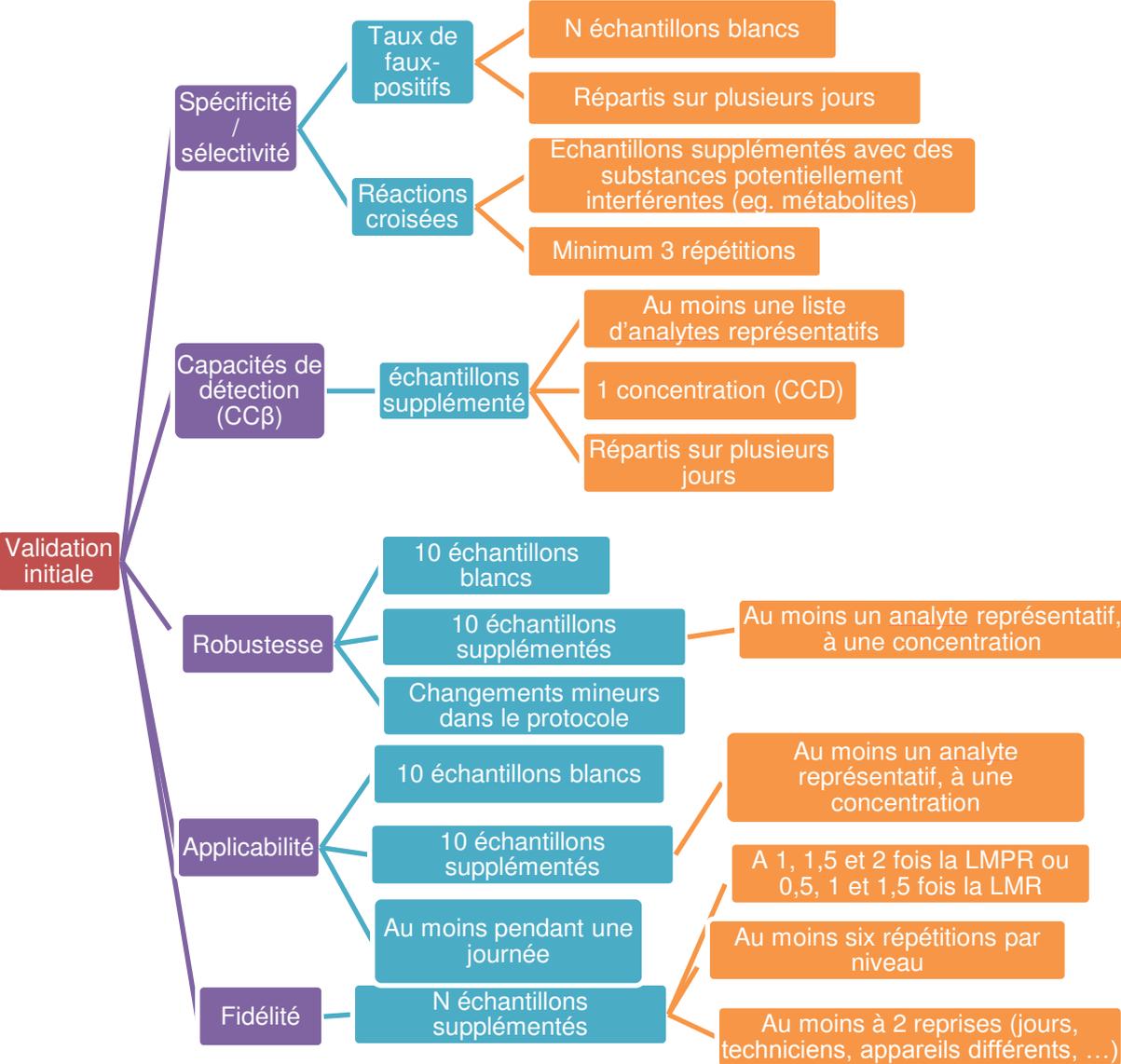
Capacité de détection (Décision 2002/657/CE et guide de validation Européen)

La caractéristique de performance la plus importante pour les méthodes de dépistage est la capacité de détection, qui est définie au point 1.12 de l'annexe de la décision 2002/657/CE [13] comme le plus petit contenu de l'analyte qui peut être détecté, identifié et / ou quantifié dans un échantillon avec une probabilité d'erreur de β . Cette définition est reprise dans le guide de validation [256]. L'erreur β est la probabilité que l'échantillon testé soit véritablement non conforme, même si une mesure conforme a été obtenue. Le $CC\beta$, contrairement à la LOD déterminée dans le cadre des validations selon la décision 93/256/CE, est déterminé à partir d'échantillons supplémentés avec l'antibiotique d'intérêt et non à partir d'échantillons blancs, qui ne prenaient en compte que le bruit de fond de la méthode.

La construction du **plan d'expérience** pour déterminer les $CC\beta$, qui est décrite dans le guide de validation Européen, se fait à partir de plusieurs informations concernant la méthode et les limites réglementaires des analytes cibles, si elles existent (**Figure 39**).

En fonction du type de la méthode, le **choix des analytes** et surtout de leur nombre va différer. En effet, le spectre de détection peut être plus ou moins large. Dans l'hypothèse maximale, une méthode peut détecter par exemple une soixantaine de substances à LMR dans le lait, ce qui représente une charge de validation très importante et un coût élevé. De plus, quand les méthodes ne sont pas spécifiques, il est impossible de mélanger plusieurs antibiotiques dans un même échantillon, ce qui multiplie le nombre d'essais. C'est pourquoi le guide de validation Européen donne des recommandations pour le choix des analytes à valider, en fonction du type de méthodes (**Tableau 16**).

Figure 38. Diagramme du plan de validation initiale pour une méthode de dépistage.



n : nombre d'échantillons requis pour la validation (20 ≤ *n* ≤ 60)

Le (ou les) analyte (s) sélectionné(s) pour l'étude de validation devrai(en)t idéalement être les moins sensibles de leur famille, à savoir la concentration cible de dépistage la plus proche (inférieure) de la limite réglementaire. Cependant, cet analyte doit être détecté au niveau ou en dessous de la limite réglementaire correspondante.

Dans le cas des méthodes microbiologiques, il est recommandé, avant la validation, de déterminer les profils d'activités pour tous les analytes concernés dans chaque famille afin de choisir au moins une ou deux substances représentatives par famille de composés, les moins bien détectées dans la famille par exemple. Les profils d'antimicrobiens sont déterminés en testant des solutions standards à différentes concentrations autour de la LMR. Lorsque la méthode de dépistage détecte plus d'une substance, la supplémentation doit être répétée pour chaque substance représentative.

Les protocoles proposés dans la décision 2002/657/CE pour déterminer le $CC\beta$ pour une méthode de dépistage ne sont pas adaptés. En effet, le premier protocole est basé sur l'utilisation de la courbe d'étalonnage, suivant les exigences de la norme ISO 11843 [291]. Or toutes les méthodes de dépistage ne sont pas utilisées avec une courbe d'étalonnage. De plus, dans cette approche, la courbe d'étalonnage devait être linéaire. Le second protocole nécessite de compléter 20 échantillons blancs au $CC\alpha$, ce qui nécessite la détermination préalable du $CC\alpha$. Le $CC\alpha$ correspond à la limite de décision de la méthode, limite au-dessus de laquelle l'échantillon va être déclaré non-conforme. Or le $CC\alpha$ n'est pas demandé pour une méthode de dépistage.

En 2008, le guide SANCO/2004/2726-rev a été publié afin de donner des lignes directrices pour compléter la décision 2002/657/CE et aider à la mettre en place [292]. Ce guide a proposé de déterminer le $CC\beta$ du dépistage en analysant 20 échantillons blancs supplémentés à deux concentrations, incluant le niveau d'intérêt (*i.e.* la limite réglementaire).

Ce n'est pas l'approche qui a été retenue dans le guide Européen. Ce guide définit la notion de **concentration cible de dépistage (CCD)** qui est la concentration à laquelle un test de dépistage donne un résultat positif pour un échantillon donné, ce qui entraîne obligatoirement une analyse de confirmation. La CCD doit être assez basse par rapport à la limite réglementaire (*eg.* LMR, LPMR, RPA) pour garantir que le $CC\beta$ sera bien inférieur ou égal à la limite réglementaire (LR). Le **nombre d'échantillons à analyser** pour déterminer le $CC\beta$ est fonction du rapport entre la CCD et la LR. En effet, plus on s'éloigne de la LR, plus la confiance statistique dans le résultat obtenu augmente et moins cela nécessite d'échantillons. En d'autres termes, plus la concentration cible est basse par rapport à la LR, moins il y a de risques d'obtenir un résultat faux-négatif pour les échantillons contenant un résidu à la LR. Le nombre d'échantillons supplémentés à la CCD à analyser sera fixé comme représenté dans la **Figure 39**.

Figure 39. Construction du plan d'expérience pour la détermination du CC β .

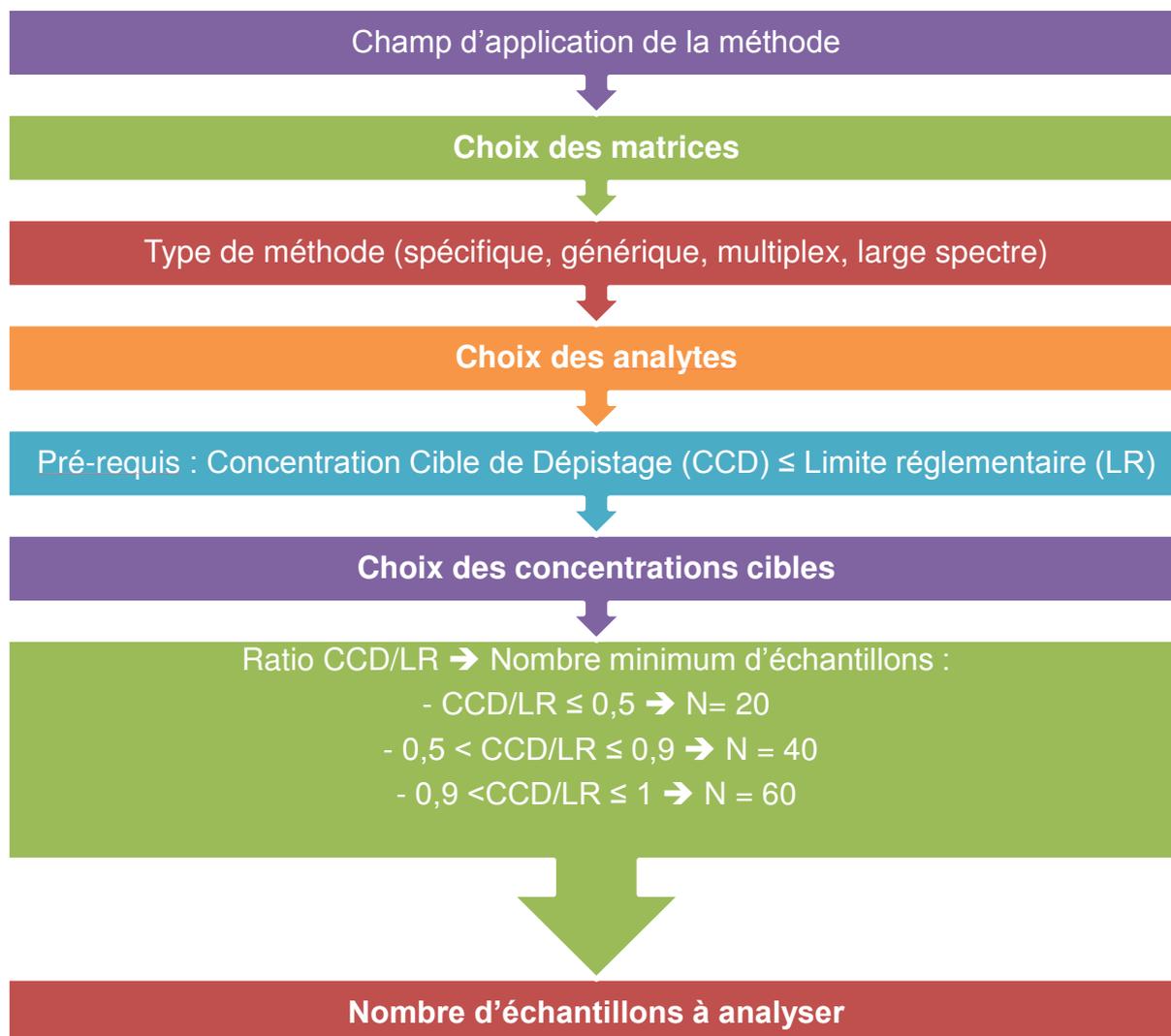


Tableau 16. Choix des analytes en fonction du type de méthode.

Méthodes	Spectre de détection	Analytes
Microbiologique	Large	Liste de substances représentatives
Immunologique	Spécifique d'un analyte	Analyte principal
	Générique (une famille)	Analyte avec la plus faible réaction croisée
	Multiplex (plusieurs familles)	Analyte avec la plus faible réaction croisée, dans chaque famille
Physico-chimique	Fonction de la méthode	Tous les composés détectables par la méthode ou au moins un composé par classe ou sous-classe chimique connue

Pour les matrices solides (eg. muscle), le guide de validation propose l'utilisation de tissus simulés, c'est-à-dire des tissus broyés et supplémentés, pour être le plus proche possible de vrais échantillons ou tissus. En effet, les méthodes microbiologiques (type boîtes) utilisent le plus souvent le muscle intact pour l'analyse. Il est donc impossible de supplémenter un muscle intact, de façon homogène. Il est aussi inconcevable de pouvoir produire des matériaux naturellement chargés (issus d'animaux traités), pour tous les antibiotiques d'intérêt, à la concentration cible précisément. Soit des morceaux de tissus congelés supplémentés sont carottés et placés directement sur les boîtes, soit des disques de papier sont dopés avec des solutions standard d'antibiotiques, les disques placés sur les boîtes, puis des morceaux de tissus entiers sont placés sur les disques dans un "sandwich". Ce dernier protocole permet de respecter l'intégrité du tissu.

En pratique, les N échantillons blancs (spécificité, voir point b.) et les N échantillons supplémentés à la CCD sont répartis et analysés sur plusieurs jours, en aveugle. Dans l'idéal, les N échantillons doivent être d'origine différente. En outre, l'utilisation de plusieurs lots (au moins deux) de kits, s'il s'agit d'un kit commercial ou de souche bactérienne, pour une méthode microbiologique par exemple, est recommandée pour la détermination du CCβ.

Pour une méthode microbiologique, le nombre d'échantillons supplémentés donnant un résultat négatif (inférieur au seuil de positivité de la méthode) va être déterminé.

Pour une méthode immunologique, les réponses analytiques pour les échantillons blancs B_i et pour les échantillons supplémentés Y_i sont mesurées. Puis, la réponse moyenne des blancs B et l'écart type « SD_b » de la réponse sont calculés. Une « valeur- seuil » ou seuil de positivité T est calculée à partir des blancs. De même, la réponse moyenne des supplémentés M et l'écart type « SD » de la réponse sont calculés. Le facteur « cut-off » F_m , est calculé à partir des supplémentés. Les facteurs T et F_m sont matrice-spécifiques.

Pour l'interprétation des résultats, deux cas se présentent :

- Le signal est proportionnel à la concentration d'antibiotiques dans l'échantillon (tests microbiologiques ou physico-chimiques) :

$$T = B + 1.64 * SD_b \quad \text{Equation n°19}$$

$$F_m = Y - 1.64 * SD \quad \text{Equation n°20}$$

Ce calcul est rarement utilisé pour les méthodes biologiques, il est plus couramment utilisé pour les méthodes physico-chimiques utilisées pour le dépistage, type CL-SM/SM. Cette possibilité ne va donc pas être développée ici.

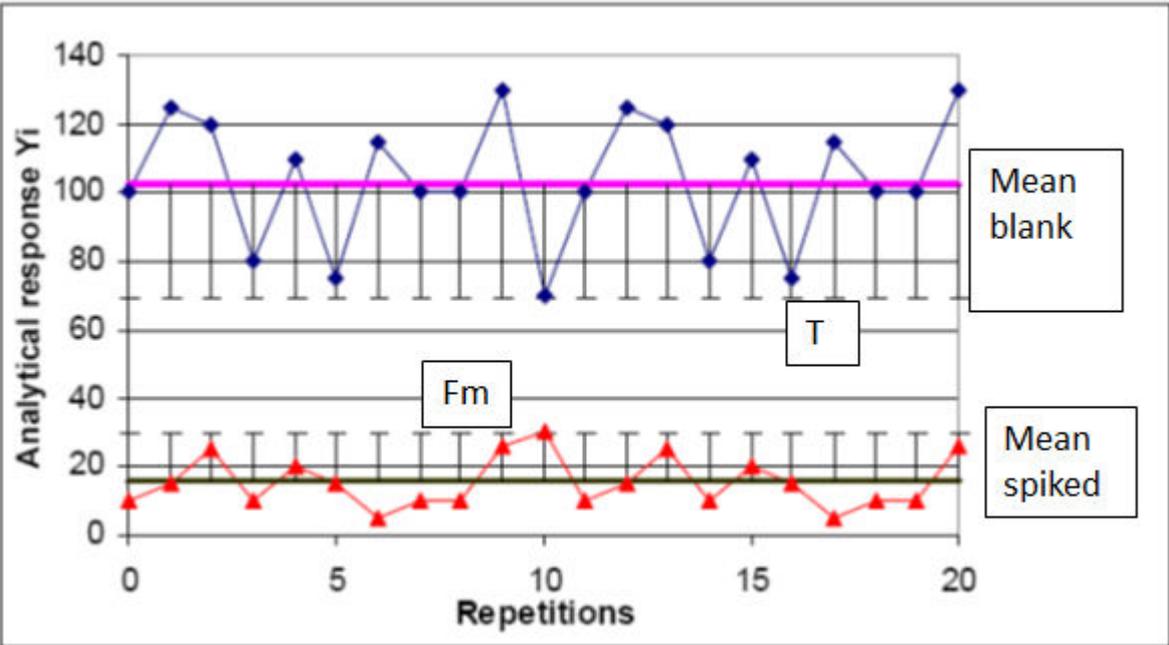
- Le signal est inversement proportionnel à la concentration d'antibiotiques dans l'échantillon (tests immunologiques type ELISA) :

Ce calcul est très souvent utilisé pour les méthodes immunologiques, type ELISA ou biocapteurs (**Figure 40**). Nous n'allons traiter que cette façon d'interpréter les résultats.

$$T = B - 1.64 * SD_b \quad \text{Equation n°21}$$

$$F_m = Y + 1.64 * SD \quad \text{Equation n°22}$$

Figure 40. Représentation graphique des résultats des échantillons blancs et des supplémentés, pour une méthode immunologique, en lien avec les valeurs seuils T et Fm.



b. Spécificité/Sélectivité

Dans la décision européenne 2002/657/CE, la spécificité est définie comme la capacité d'une méthode à distinguer l'analyte mesuré d'autres substances présentes dans l'échantillon (eg. métabolites, produits de dégradation, constituants de la matrice, etc.) [13]. Cette caractéristique est principalement fonction du type de méthode utilisée, mais dépend aussi de la classe de l'analyte ou de la matrice. Cette définition n'a pas évolué depuis la décision 93/256/CE et convient aussi pour la caractéristique appelée sélectivité, déterminée dans le cadre des validations AOAC.

La sélectivité est associée à la spécificité dans la décision 2002/657/CE, avec un protocole de détermination commun. Toutefois, seule la spécificité est clairement définie dans la décision. Les termes spécificité et sélectivité sont employés pour caractériser les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques. La différence entre les deux termes, qui est communément admise dans le domaine des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques, se situe au niveau de l'interprétation du calcul de spécificité.

- Le terme « spécificité » est habituellement utilisé pour les tests ciblés sur un seul analyte. Une méthode est dite spécifique quand elle donne un signal analytique exclusivement pour cet analyte. Par exemple, une méthode peut être spécifique de la pénicilline G.

Le terme « sélectivité » est généralement utilisé pour les tests de dépistage à large spectre (ou méthodes multi-résidus). La méthode est dite sélective quand elle produit des résultats analytiques pour une (ou plusieurs) classe(s) de substances. Par exemple, une méthode peut être sélective de la famille des bêta-lactamines. La spécificité correspond au pourcentage de résultats négatifs trouvés parmi les négatifs attendus (échantillons exempts de résidus).

Selon le référentiel de l'AOAC, le taux de sélectivité est déterminé comme le pourcentage de résultats faux-positifs parmi les 60 échantillons blancs testés.

Le guide de validation européen recommande, quel que soit le type de méthode (spécifique ou large spectre), la spécificité/sélectivité est déterminée après l'analyse de 20 à 60 échantillons de matrice blanche (exempte de résidus d'antibiotiques) (**Figure 36**). A partir des résultats, le taux de résultats faux-positifs peut être calculé :

$$\text{Taux Faux positifs} = \frac{\text{nb résultats positifs}}{\text{nb échantillons blancs}} * 100 \quad \text{Equation n°16}$$

Le nombre de résultats faux-positifs pour une méthode immunologique, type ELISA, sera déterminé globalement pour tous les jours de validation. Les échantillons blancs qui présenteront un résultat (signal) inférieur à la valeur seuil (eg. Fm) seront considérés comme des résultats faux-positifs.

Pour un test de dépistage ciblé, conçu pour répondre sélectivement à un composé unique ou à une famille d'antimicrobiens (eg. kit ELISA, test récepteur), la spécificité/sélectivité va en plus être constituée de la détermination des réactions croisées (CR), entre la substance principale et une liste de substances (**Figure 37**). Ces substances potentiellement interférentes peuvent être des substances chimiquement proches (métabolites, dérivés, etc.) ou d'autres substances susceptibles de se trouver en présence du composé d'intérêt dans les échantillons (médicament vétérinaire, en association avec d'autres (médicaments)). La présence éventuelle d'interférences sur les résultats du test va être analysée.

Les réactions croisées sont déterminées (eg. autres antibiotiques de la même famille, autres familles). Les concentrations en analytes sont calculées par rapport à une gamme d'étalonnage. La réponse de chaque analyte testé est comparée à la réponse de l'analyte principal pour déterminer la concentration équivalente à « l'analyte principal ». Cette concentration est exprimée en pourcentage de la réponse « de l'analyte principal ». Dans ce calcul, la spécificité de l'anticorps pour « l'analyte principal » est fixée à 100 %.

Le pourcentage de CR permettra d'estimer les CC β pour les molécules testées ici, à partir du CC β de l'analyte principal :

$$CC\beta \text{ analyte PI} = \frac{CC\beta \text{ analyte principal}}{CR \text{ a nalyte PI}} * 100 \quad \text{Equation n°24}$$

De plus, dans le protocole AOAC, les effets masquants potentiellement dûs à la présence d'autres substances dans l'échantillon sont mesurés.

c. Fidélité

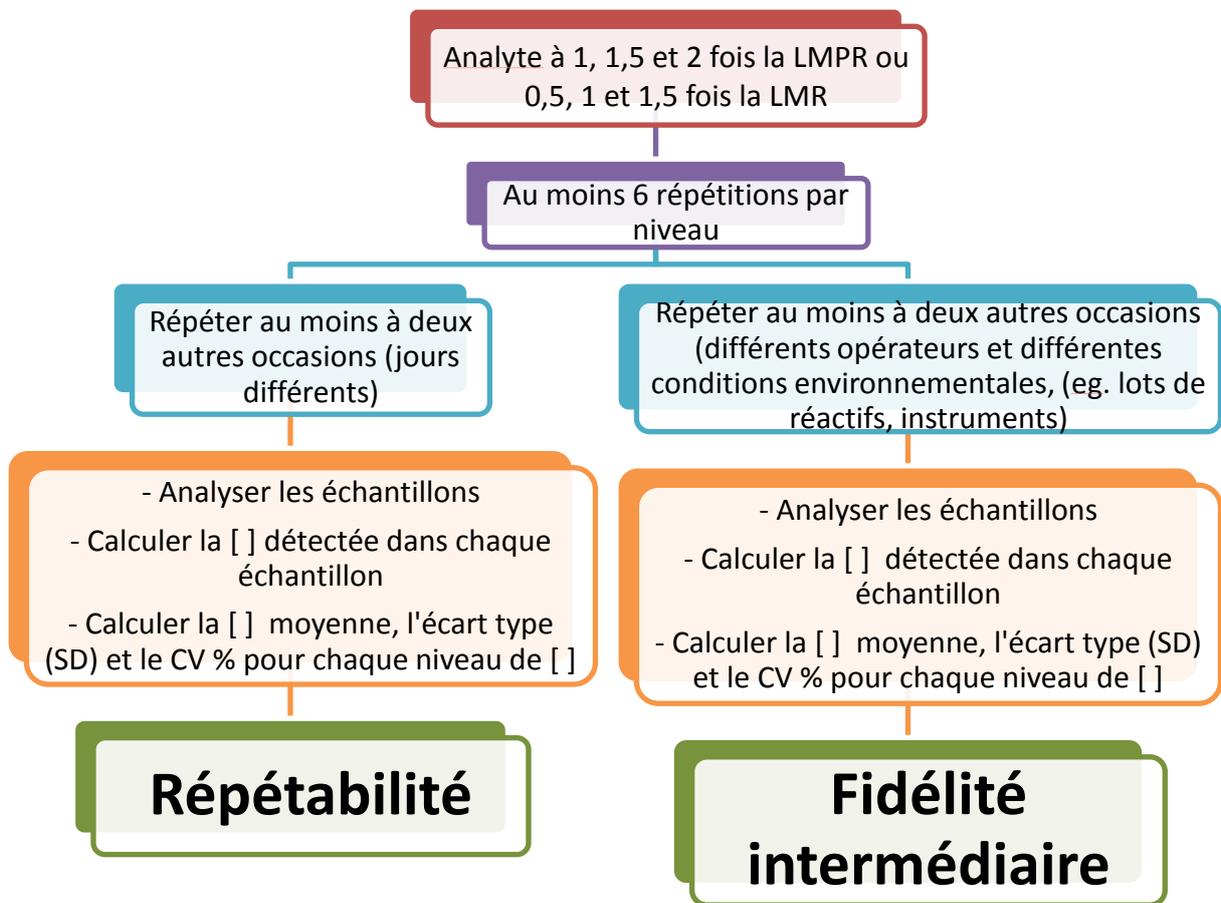
Pour une méthode quantitative de dépistage, la détermination de la justesse n'est pas demandée dans la décision européenne 2002/657/CE [13], seule la fidélité doit être déterminée. Dans la décision européenne 93/256/CE [290], deux caractéristiques devaient être déterminées pour une méthode de dépistage quantitative, même si, suite à la traduction de la décision en anglais, des abus de langage peuvent être signalés. Le terme précision était utilisé à la place du terme fidélité et le terme exactitude à la place de justesse.

De plus, aucun critère de décision n'était fixé pour ces deux caractéristiques. La seule exigence formulée était : « Les faux résultats positifs peuvent être acceptés mais les faux résultats négatifs doivent être réduits au minimum au niveau recherché ». Cette exigence ne représente pas vraiment une exigence pour une méthode qui produit des résultats quantitatifs. Elle est bien loin des exigences formulées plus tard par la décision 2002/657/CE [13].

Dans la décision 2002/657/CE, la fidélité est définie comme « l'étroitesse d'accord entre des résultats de tests indépendants obtenus dans des conditions stipulées (prédéterminées) » [13]. La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.

La détermination de la fidélité est exigée seulement pour les méthodes quantitatives. Même si des tests microbiologiques (comme les méthodes boîtes) peuvent donner des résultats quantitatifs (eg. zone d'inhibition), la détermination de la fidélité n'est pas obligatoire pour ce type d'essais. De même, si un test ELISA a pour but d'être utilisé seulement en tant que méthode qualitative, l'évaluation de la fidélité pendant la validation n'est pas nécessaire.

Figure 41. Protocole de détermination de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire.



Coefficient de variation (CV %)

La fidélité est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais, réalisés dans des conditions de répétabilité (même laboratoire, même opérateur, même équipement) et de reproductibilité (différents laboratoires, différents opérateurs, différents équipements), pour les échantillons supplémentés pour chaque niveau de concentration (**Figure 41**). Le guide SANCO/2004/2726-rev 4 complète la décision pour les substances interdites qui n'ont pas de LPMR [292]. Les concentrations à tester sont alors 1, 1.5 et 2 fois le CC β .

Dans le cadre de la certification AOAC, toutes les méthodes de dépistage ont été validées comme des méthodes qualitatives. Ainsi, la fidélité n'a pas été déterminée.

d. Applicabilité

L'applicabilité n'est pas abordée comme caractéristique spécifique dans les validations AOAC. De plus, toutes les méthodes validées pour les résidus d'antibiotiques ont été validées pour une matrice unique (*i.e.* le lait de vache).

Dans la décision 93/256/CE, l'applicabilité était définie comme « la liste des types d'échantillons et/ou d'analytes auxquels la méthode peut s'appliquer telle quelle ou moyennant certaines modifications mineures » [290]. Aucun mode de détermination n'était proposé.

Dans la décision européenne 2002/657/CE, applicabilité et robustesse sont traitées simultanément [13]. Dans le guide de validation Européen, l'applicabilité est traitée à part [256]. L'applicabilité est la possibilité d'appliquer une méthode à plusieurs matrices, avec des performances similaires. En effet, les matrices peuvent avoir un impact sur les résultats d'un essai. La plupart des méthodes sont conçues pour une matrice principale. En raison du grand nombre de combinaison analyte/matrice possibles, il est nécessaire de définir la portée de la méthode en termes de matrices et d'espèces animales. Les nouvelles matrices peuvent être des tissus différents (muscle, rein, foie,...), d'origine animale différente (œufs, miel, crevettes,...) ou venant de différentes espèces (bovin, ovin, volaille, lapins,...). De plus, les LMR peuvent différer entre les matrices, mais aussi entre différentes espèces animales pour une même matrice.

L'applicabilité peut être réalisée à deux moments distincts :

- soit dès la validation initiale si on a déjà fixé la (ou les) matrice(s) ou espèce(s) animale(s) pour lesquelles on veut évaluer l'applicabilité,
- soit à posteriori si on veut étendre la méthode déjà validée à une nouvelle matrice ou espèce animale.

A l'étape de la validation initiale, deux approches sont possibles pour déterminer l'applicabilité (**Figure 42**). Dans le cas de la première approche, l'hypothèse est faite que le(s) CC β pour les x matrices est (ou sont) équivalent(s), hypothèse qui peut être vérifiée par des essais préalables. Alors, la spécificité et le(s) CC β sont déterminés à partir d'un pool d'échantillons comprenant un mélange des différentes matrices (*eg.* 10 échantillons de muscle et 10 échantillons de rein). Si en fait les CC β étaient différents, déterminer un CC β unique pour les 3 matrices implique que le CC β de certaines matrices est surestimé ou sous-estimé. La deuxième approche consiste à déterminer spécificité et CC β pour une première matrice. Ensuite, spécificité et CC β sont déterminées pour une ou plusieurs autres matrices. Ces caractéristiques sont comparées à celles déterminées pour la première matrice validée.

Le guide de validation recommande que l'applicabilité soit démontrée pour chaque analyte que le laboratoire a inclus dans un programme d'analyse des résidus (*eg.* analyte cible (test ciblé)), ou au moins sur un nombre sélectionné d'analytes qui sont représentatifs du groupe d'analytes, quand la méthode a un spectre large de détection. L'applicabilité doit être démontrée par des analyses en aveugle (échantillons inconnus), à différents jours, avec différents opérateurs qualifiés, si possible.

e. Robustesse

La robustesse est définie dans la décision européenne 2002/657/CE comme « la sensibilité d'une méthode d'analyse aux variations des conditions expérimentales, qui peut s'exprimer par une liste des échantillons, des analytes, des conditions de stockage, des conditions d'environnement et/ou de préparation de l'échantillon pour lesquels la méthode peut être appliquée telle quelle ou moyennant certaines modifications mineures » [13]. L'objectif est d'identifier les points critiques d'une méthode, qui en pratique pourraient varier et influencer le résultat de l'analyse.

La robustesse est une étape très importante, qui n'est pas toujours intégrée dans la partie validation de la méthode, mais qui est parfois être considérée comme faisant partie du développement de la méthode. En effet, l'identification de points critiques dans la méthode qui peuvent influencer sur les résultats doit se faire avant la caractérisation de la méthode.

La robustesse se définit globalement de la même façon dans toutes les approches présentées. Seuls les facteurs étudiés peuvent varier. La première étape est de choisir des facteurs du pré-traitement de l'échantillon et de l'analyse, qui pourraient influencer les résultats de mesure (*eg.* l'analyste, la source et l'âge des réactifs, la température, le pH).

Dans le protocole AOAC, le laboratoire indépendant réalise des études de robustesse, sur des échantillons congelés (effet de la congélation), les interférences (germes, cellules). Le plus souvent elle a dû être prédéterminée par le fabricant, puisqu'elle doit précéder l'étape de caractérisation des performances proprement dite. Toutefois, elle est parfois réalisée par le laboratoire indépendant, selon les études.

Les facteurs doivent être modifiés dans un ordre de grandeur qui correspond à des déviations usuelles. Le guide de validation Européen recommande de se concentrer sur une molécule représentative de la série d'analytes considérés si la méthode a un spectre large de détection pour étudier la robustesse. Au moins 10 matériaux blancs différents et 10 matériaux différents supplémentés au niveau d'intérêt, c'est-à-dire la CCD, devront être analysés en aveugle, à différents jours, avec différents opérateurs qualifiés, si possible. La capacité de détection CC β pour cette molécule et la spécificité vont ainsi être déterminées. L'influence de ces variations peut être évaluée, par exemple, en utilisant des plans d'expérience, afin de minimiser le nombre d'expériences.

Figure 42. Détermination de l'applicabilité de la méthode : deux approches.

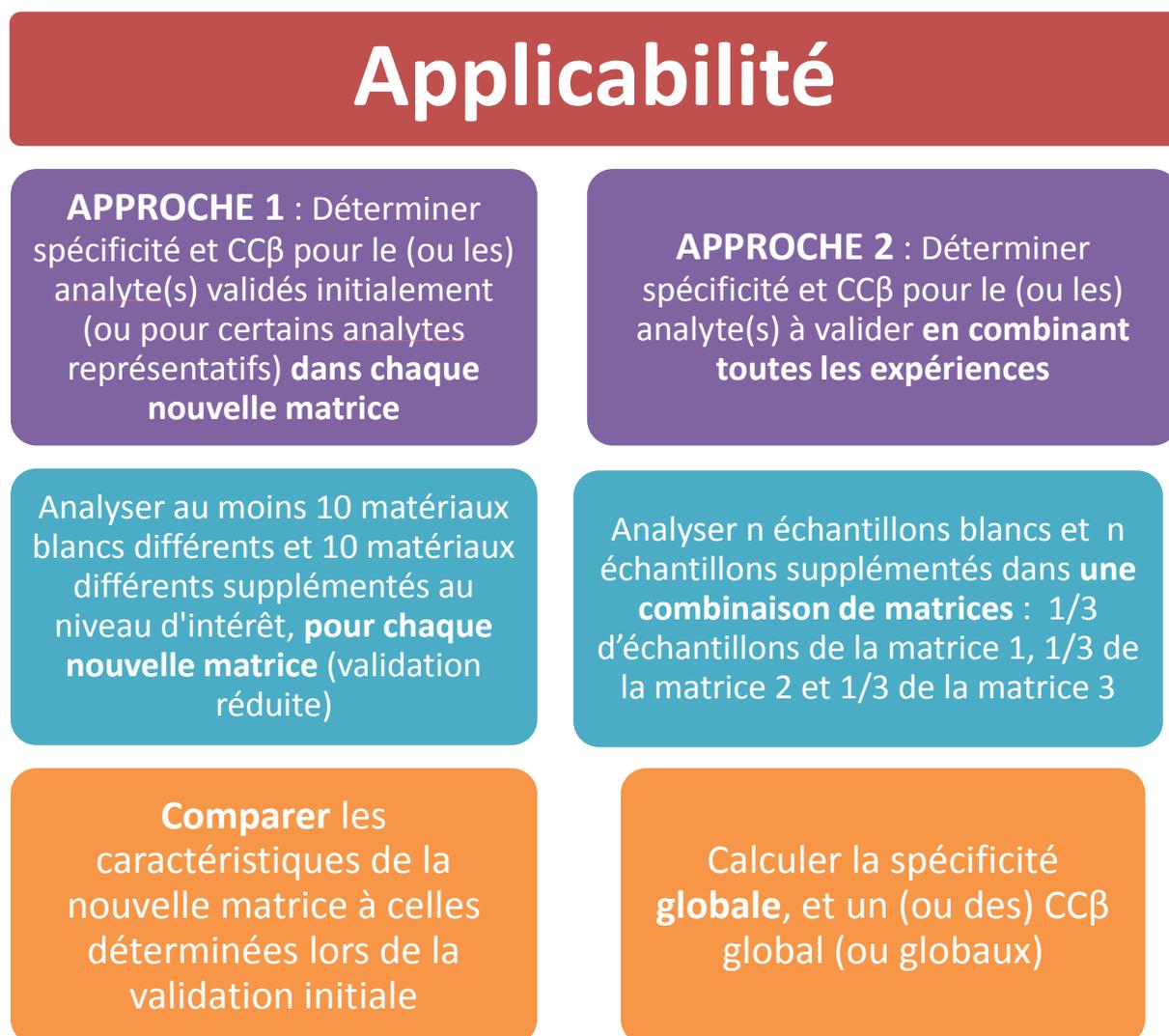


Tableau 17. Détermination de la stabilité des analytes en solution et dans la matrice [13].

	Stabilité des analytes en solution	Stabilité des analytes dans la matrice
Préparation	Solutions d'analytes	Homogénéiser une matrice blanche, partager en 5 aliquotes et supplémenter chaque aliquote avec le (ou les) analyte(s)
Mesure Cfraîche	Concentration en analyte dans la solution fraîche	Concentration en analyte dans un des aliquotes immédiatement
Différentes températures de stockage	-20°C, +4°C et +20°C, et les analyser après 1, 2, 3 et 4 semaines ou plus si nécessaire	au moins - 20°C ou à une température inférieure si nécessaire et les analyser après 1, 2, 4 et 20 semaines
Mesure Crésiduel	Concentration en analyte (C_i = concentration à l'instant considéré) : Analyte résiduel (%) = $C_i \times 100/C_{\text{fraîche}}$	

f. Stabilité

Dans le protocole AOAC, le laboratoire indépendant peut réaliser des études de stabilité des kits (ne fonction de leur date de production) et parfois des études de stabilité de l'analyte dans la matrice (eg. effet de la congélation, contrôles positifs lyophilisés à 4°C).

Dans la décision 2002/657/CE, les études de stabilité concernent les analytes [13]. La stabilité doit être vérifiée en solution et dans les matrices d'intérêt. En effet, une stabilité insuffisante de l'analyte ou des constituants de la matrice durant le stockage d l'échantillon ou pendant l'analyse peut entraîner des écarts significatifs au niveau du résultat.

Deux possibilités sont proposées dans le guide de validation européen :

- Si les données de stabilité existent déjà en interne au laboratoire ou dans la bibliographie, une étude bibliographique sera incluse dans le rapport de validation. En effet, des données de stabilité des analytes en solution ou dans les matrices peuvent être trouvées dans la littérature (données publiées) ou être déterminées par une coopération avec d'autres laboratoires si les études de stabilité ont été réalisées mais non publiées dans des journaux scientifiques. Les données de stabilité peuvent être extraites d'études réalisées avec d'autres méthodes analytiques, dans d'autres laboratoires puisqu'elles ne dépendent pas de la méthode employée pour l'analyse. Cette possibilité est aussi proposée dans le guide de validation en 2010 et dans l'autre guide SANCO/2004/2726-rev 4 [292]. Quand la stabilité n'est pas connue, des exemples sont donnés dans la décision CE/2002/657 [13] sur la façon dont la stabilité peut être déterminée (**Tableau 17**).

Dans la plupart des cas, des échantillons naturellement contaminés ne sont pas disponibles pour réaliser les études de stabilité dans la matrice. Pour les méthodes de dépistage biologiques, dans la plupart des cas, c'est l'approche bibliographique qui est retenue pour estimer la stabilité des analytes.

La caractérisation de la méthode par la détermination des caractéristiques de performance doit être suivie de la validation de la méthode, grâce à des critères d'acceptabilité prédéterminés. Ces critères vont être présentés et discutés.

3.2.1.3.5. Critères de performance :

a. Limites de détection

Limite de détection (Décision 93/256/CE)

Dans la décision 93/256/CE, le critère était, que la LOD soit « suffisamment basse pour que les résidus puissent être détectés à ce niveau » pour les substances à LMR, et qu'elle soit « aussi basse que possible » pour les substances interdites.

Sensibilité 90/95% (AOAC)

Les critères d'acceptation pour l'AOAC concernant la sensibilité 90/95% sont une sensibilité inférieure ou égale aux limites réglementaires, européennes ou américaines, en fonction du marché visé par le kit.

Capacité de détection (Guide de validation européen suivant la décision 2002/657/CE)

Les critères de validation pour cette caractéristique sont :

- 1) le cut-off Fm doit être inférieur au seuil de positivité T pour une méthode immunologique de dépistage,**
- 2) le risque d'obtenir un résultat faux-négatif à la CCD doit être inférieur ou égal à 5 % (erreur beta), ce qui permet de déterminer le CC β comme égal à la CCD,**
- 3) le CC β doit être inférieur ou égal à la limite réglementaire.**

1) Pour les méthodes immunologiques (eg. ELISA, biocapteur), la validité de la méthode va découler des calculs des facteurs T et Fm.

Pendant les essais de validation de la méthode, les facteurs T et Fm sont calculés chaque jour, à partir des résultats des échantillons blancs et des résultats des échantillons supplémentés. L'essai est valide si et seulement si le cut-off Fm est inférieur au seuil de positivité T. A la fin des essais de caractérisation, tous les résultats sont regroupés en une analyse globale. De nouveau, les facteurs T et Fm sont calculés. Si le T global est supérieur au Fm global, l'essai est valide. Dans certains cas, le T global pourra être inférieur au Fm global, mais l'essai sera quand même considéré comme valide si les T et Fm journaliers sont valides.

Le nombre de résultats faux-négatifs pour chaque jour d'essai va être déterminé, soit par rapport au T, soit par rapport au Fm, en fonction du seuil que l'on choisit pour interpréter les données. Selon toute logique, si le T est choisi comme valeur seuil pour décider de la positivité des échantillons, la capacité de détection pourra être abaissée, mais le pourcentage de résultats faux-positifs augmentera. Par contre, si le Fm est choisi comme seuil, le CC β sera un peu plus élevé, mais le risque d'obtenir des résultats faux-positifs diminuera. Dans tous les cas, au final, le nombre de résultats faux-négatifs global (inter-jours) doit être inférieur ou égal à 5% pour pouvoir conclure que la concentration cible de dépistage, qui correspond à la concentration en antibiotiques dans les échantillons supplémentés, est le CC β de cet antibiotique. Si c'est le cas, à cette concentration, le risque d'obtenir des résultats faux-négatifs sera bien inférieur ou égal à 5 %. De plus, si le cut-off Fm a été calculé par exemple avec une concentration de supplémentation égale à la ½ LMR, le risque d'avoir des résultats faux-négatifs au niveau de la LMR est bien inférieur au 5 % comme recommandé.

Au contraire, si plus de 5 % des échantillons supplémentés donnent des résultats faux-négatifs (supérieurs à la valeur seuil), la CCD choisie était trop faible. De nouveaux essais de caractérisation devront être entrepris avec une concentration plus élevée.

L'expérience nous a montré que le facteur Fm en pratique est couramment utilisé. En effet, même si un taux de faux-positifs maximum n'est pas fixé par la réglementation européenne, contrairement au taux de faux-négatifs (5%), le taux de faux positifs ne doit pas être trop élevé. En effet, chaque

échantillon positif en dépistage devra être confirmé en CL-SM/SM, ce qui est coûteux en investissement, en analyse et en temps personnel. Donc, le choix du Fm est le plus souvent un bon compromis entre un $CC\beta$ assez bas (inférieur à la limite réglementaire) et un taux de faux-positifs raisonnable.

2) Pour les tests de dépistage, **le critère de performance** est l'erreur β (taux de faux négatifs) qui **doit être inférieure à 5%**, à la concentration cible de dépistage [13].

Un résultat faux-négatif en dépistage est un résultat négatif obtenu pour un échantillon qui contient un résidu d'antibiotiques. La capacité de détection $CC\beta$ est égale à la concentration qui donne un taux de faux-négatifs de 5 % maximum. Par exemple, la survenue d'un ou aucun résultat faux-négatif après l'analyse de 20 échantillons supplémentés (eg. à la LMR) est suffisante pour démontrer que la capacité de détection est inférieure ou égale à la concentration testée (eg. à la LMR).

3) Concernant une méthode de dépistage pour une substance autorisée, le $CC\beta$ doit être inférieur ou égal à la LMR, alors que pour une méthode de confirmation, le $CC\beta$ est forcément supérieur à la LMR. En effet, pour une méthode de confirmation pour une substance autorisée, le $CC\alpha$ et le $CC\beta$ sont déterminés à partir d'échantillons supplémentés à la LMR, dans une des approches. Le $CC\alpha$ qui est la limite de décision pour une méthode de confirmation est logiquement supérieur à la LMR puisque l'objectif est de conclure avec un risque de 5 % minimum que la LMR est dépassée. Par contre, l'objectif d'une méthode de dépistage est de pouvoir détecter à des niveaux inférieurs à la LMR la présence potentielle d'un analyte. Ceci explique que, pour une méthode de dépistage pour une substance autorisée, le $CC\beta$ doit forcément être inférieur à la LMR pour conclure à la validité de la méthode.

En ce qui concerne une substance interdite, les objectifs de la méthode de dépistage comme de la méthode de confirmation sont de pouvoir détecter pour le dépistage ou d'identifier et de quantifier pour la confirmation, les concentrations en analytes les plus basses possible. Il faut pouvoir discriminer des échantillons blancs, qui produisent un bruit de fond, d'échantillons supplémentés à la concentration la plus basse possible. Dans ce cas, le $CC\beta$ du dépistage et le $CC\alpha$ de la méthode de confirmation doivent être les plus bas possible et inférieurs à la LPMR ou la RPA si elles existent.

Si le $CC\beta$ est supérieur à la limite réglementaire (LR), la méthode est non valide pour cet analyte (**Figure 43**). La concentration cible de dépistage peut toutefois être augmentée et l'exercice de validation répété si le $CC\beta$ doit être déterminé plus précisément.

Figure 43. Logigramme : conclusions de la détermination du CC β .

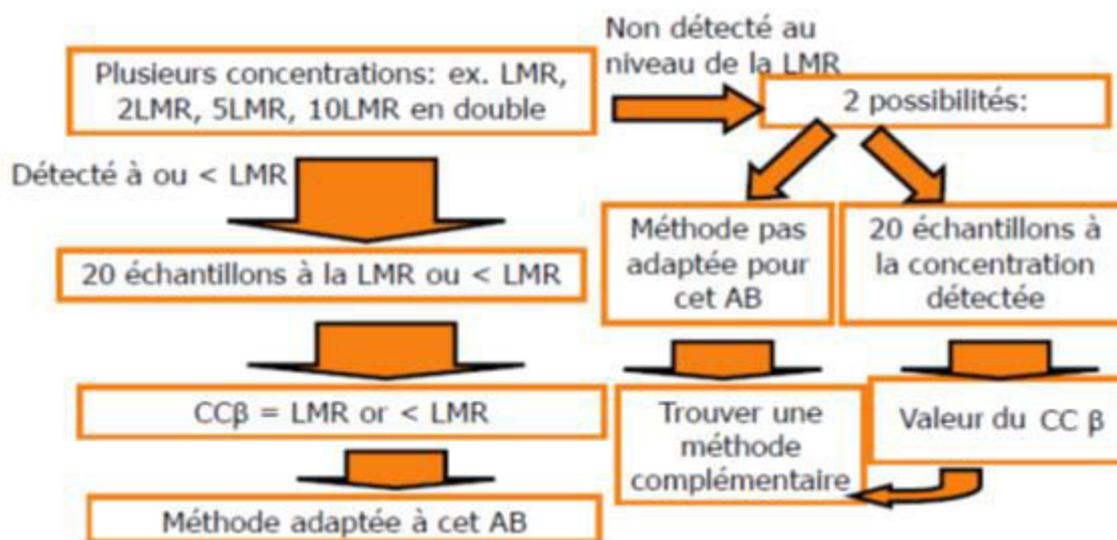


Tableau 18. Critères de validité pour estimer la fidélité de la méthode [13].

Critère sur le	Concentration < 100 µg/kg	Concentrations ≥ 100 µg/kg
CV de reproductibilité		CV calculé avec l'équation de Horwitz [13]. $CV = 2^{(1 - 0,5 \log C^*)}$
CV de répétabilité	Aussi bas que possible	la moitié et les deux tiers des CV calculés grâce à Horwitz
CV de reproductibilité intralaboratoire (fidélité intermédiaire)		CV intralaboratoire < CV de reproductibilité

*C est la fraction de masse exprimée comme une puissance (exposant) de 10 (par exemple 1 mg/g = 10⁻³), pour les concentrations supérieures à 100 µg/kg.

b. Spécificité

Le critère de l'AOAC est que les 60 échantillons blancs testés doivent donner un résultat négatif pour que le test soit déclaré valide (aucun résultat faux-positif autorisé). Par contre, au niveau européen (décision 2002/657/CE), il n'existe pas de taux de faux-positif maximum, contrairement au taux de faux-négatifs. En effet, un résultat faux-positif (un résultat positif pour un échantillon exempt de résidus) n'implique pas de risque pour la santé du consommateur. Par contre, comme tous les échantillons dépistés positifs doivent être obligatoirement confirmés par une méthode physico-chimique, un taux élevé de résultats faux-positifs entraîne des surcoûts de confirmation.

c. Fidélité

Le critère appliqué sur le coefficient de variation (CV) est lié à la concentration en analyte supplémenté. Suivant la décision 2002/657/CE, le CV inter-laboratoires pour l'analyse répétée d'un matériau de référence ou supplémenté, dans des conditions de reproductibilité, ne doit pas dépasser le niveau calculé grâce à l'équation d'Horwitz [13] (**Tableau 18**). Pour les concentrations inférieures à 100 µg/kg, l'équation d'Horwitz n'est pas adaptée car elle donne des valeurs trop élevées. Pour les concentrations supérieures à 100 µg/kg, Thompson propose une équation [293].

d. Applicabilité

Des critères ont été fixés dans le guide de validation européen des méthodes de dépistage pour conclure sur l'applicabilité de la méthode. Ces critères varient en fonction de l'approche choisie pour déterminer l'applicabilité.

- Si l'applicabilité a été évaluée dès la validation initiale, la méthode sera déclarée applicable aux matrices testées si le taux de faux-positifs est raisonnable et si le(s) $CC\beta$ du (ou des) analyte(s) validé(s) sont bien inférieur(s) ou égal (ou égaux) à la (ou aux) LR.
- Si l'applicabilité a été évaluée à posteriori pour une nouvelle matrice, la méthode sera déclarée applicable à la nouvelle matrice si le taux de faux-positif est similaire et si le(s) $CC\beta$ (s) dans la nouvelle matrice est (ou sont) proche(s) de celui (ou de ceux) déterminé(s) lors de la validation initiale. Aucune règle n'est fixée dans le guide pour limiter l'écart entre les taux de faux-positifs et/ou les $CC\beta$.

En conclusion, si des modifications mineures doivent être apportées à la méthode en fonction de la matrice, elles doivent être annoncées dans le protocole. Si l'applicabilité ne peut pas être prouvée, la méthode doit être entièrement validée pour la nouvelle matrice.

e. Robustesse

Une méthode analytique est robuste si les résultats ne sont pas (très) sensibles aux variations des conditions expérimentales. Les caractéristiques de performance (spécificité, $CC\beta$) doivent être déterminées pour tous les facteurs de variation qui ont montré un impact significatif sur le résultat de l'analyse. Lorsqu'un facteur influence notablement les résultats des mesures, des expériences

supplémentaires doivent être conduites pour déterminer les limites d'acceptabilité de ce facteur. De plus, l'impact de ce facteur sur les caractéristiques de performance doit être décrit dans le rapport de validation et ce facteur clairement identifié dans le protocole.

Il faut définir au préalable dans le plan de validation les critères applicables. Par exemple, si l'impact d'un facteur consiste en l'augmentation du CC β qui devient supérieur à la limite réglementaire, ce facteur devra être parfaitement maîtrisé en routine. Les limites d'acceptabilité de ce facteur devront être indiquées dans le protocole afin que les performances de la méthode ne soient pas affectées.

f. Stabilité

Au niveau de l'AOAC, la survenue d'au moins un résultat négatif pour un échantillon supplémenté testé, pour une méthode qualitative de dépistage des antibiotiques, entraîne la conclusion d'instabilité de l'analyte dans la matrice ou du kit [23].

Aucun critère de stabilité n'est fixé dans la décision européenne 2002/657/CE [13].

En interne, dans notre laboratoire, le guide de validation des méthodes CLHP fixe un intervalle maximum de 90 à 110 % définit les limites de stabilité de l'analyte en solution. Les critères acceptables pour la stabilité de l'analyte dans la matrice sont définis selon la méthode, avant la validation en fonction des concentrations étudiées. L'effet des cycles congélation-décongélation peut aussi être étudié.

3.2.1.3.6. Utilisation de la méthode en routine après la validation :

Après la validation initiale, l'analyse régulière de contrôles qualité (QC) pendant les analyses de routine est très importante. Ces contrôles qualité peuvent être un (ou des) échantillon(s) blanc(s) comme contrôle qualité négatif (QC-) et un (ou des) échantillon(s) supplémenté(s) au CC β comme contrôle qualité positif (QC+). Le choix des analytes à inclure dans les QC+ en routine doit s'inspirer des règles de la validation initiale, c'est-à-dire choisir l'analyte le moins bien détecté par la méthode ou l'analyte le plus pertinent dans un plan de contrôle national si c'est l'objectif de la méthode.

La préparation et l'analyse de QC en routine s'applique aussi bien aux méthodes de dépistage qualitatives, qu'aux méthodes quantitatives. Les résultats de ces QC doivent être enregistrés afin de vérifier les performances de la méthode. Il faudra avoir un taux de faux-négatifs sur le long terme inférieur ou égal à 5%.

- Pour une méthode qualitative microbiologique (*eg.* Test en tube), si le QC+ donne un résultat négatif ou si le QC- donne un résultat positif, la série d'analyses sera éliminée et il faudra refaire les analyses. Dans les deux cas, une analyse des causes sera réalisée.
- Pour une méthode immunologique de type ELISA (qualitatif ou quantitatif), les QC+ permettent de calculer un « cut-off » journalier F_m , et les QC- (blancs) un seuil de positivité T . En routine, la détermination de ces 2 seuils à partir des QC journaliers permet de conclure sur la positivité des échantillons analysés le jour même. Si la moyenne des résultats (ou le résultat) de l'échantillon inconnu est inférieure à la valeur seuil, l'échantillon est présumé contenir une concentration en antibiotique supérieure au CC β . Inversement, si la moyenne des résultats (ou le résultat) de

l'échantillon inconnu est supérieure à la valeur seuil, l'échantillon est présumé contenir une concentration en antibiotique inférieure au CC β ou aucun résidu. Dans tous les cas, il est déclaré négatif.

L'enregistrement et l'analyse des résultats des QC (ou des T et Fm journaliers) peuvent se faire sous forme de carte de contrôle, afin de suivre la dérive éventuelle des résultats d'essais [294]. La vérification continue de la méthode avec l'analyse des QC a plusieurs objectifs et avantages :

- Vérifier et tracer les performances de la méthode
- Ajouter des données au rapport de validation initiale ou de transfert,
- Vérifier la qualité de lots différents de kits commerciaux,
- Vérifier la stabilité et la qualité des réactifs,
- Vérifier l'aptitude des analystes qui mettent en place la méthode,
- Valider les essais journaliers (T>Fm),
- Conclure sur le statut des échantillons inconnus.

3.2.1.3.7. Conclusions sur l'approche critère par critère

En conclusion, l'approche actuelle de l'AOAC critère par critère pour la validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques présente plusieurs points forts :

- La validation est réalisée, au moins en grande partie par un laboratoire indépendant. De plus, la revue des résultats par des relecteurs est un plus pour la certification AOAC.
- La notion de niveau de sensibilité à 90/95% est intéressante. Cette limite est déterminée précisément, à partir d'une courbe dose-réponse, basée sur l'analyse de plusieurs concentrations et d'un grand nombre de réplicats.
- Les effets masquants potentiels d'autres classes d'antibiotiques sur la détection des antibiotiques ciblés par le test sont étudiés.
- La robustesse est aussi un élément très important à déterminer : l'impact de facteurs primordiaux pour le lait comme le taux de cellules somatiques par exemple, sur la détection des antibiotiques est mesuré. De même, l'impact de l'utilisation de plusieurs lots de kits ayant des péremptions différentes est étudié.

Toutefois, l'approche de l'AOAC présente aussi certains points faibles :

- La charge de travail est très importante car le nombre d'échantillons à analyser pour déterminer le niveau de sensibilité 90/95% est très élevé.
- De ce fait, le nombre d'antibiotiques validés diminue. Par exemple, pour des tests spécifiques des bêta-lactamines, la sensibilité 90/95% est déterminée seulement pour 5 bêta-lactamines [287], voire les 6 bêta-lactamines autorisées aux Etats-Unis [288]. Cette validation est ciblée sur les utilisateurs américains, puisqu'aucune autre bêta-lactamine n'est étudiée. De plus, les critères de validation pour la sensibilité sont bien entendu les limites de tolérance américaines. Pour un test à large spectre, le choix des antibiotiques représentatifs est basé uniquement sur la famille des bêta-lactamines pour la détermination de la sensibilité 90/95%

[23]. 29 antibiotiques ont été testés à deux concentrations mais avec seulement trois échantillons.

- Ce protocole est impossible à réaliser sur d'autres matrices que le lait, par exemple sur le muscle. D'ailleurs, lors de la validation AOAC du Premi@Test, un test commercial microbiologique en ampoules, à large spectre, seul le niveau de sensibilité 90/95% de la pénicilline G a été déterminé [295]. Un seul échantillon a été testé pour estimer le niveau de détection de 23 antibiotiques et 10 médicaments vétérinaires.
- Contrairement à la certification AFNOR, la validation d'une méthode selon le programme « Performance Tested Methods » (PTM) de l'AOAC, qui est appliqué aux méthodes alternatives, dont les kits de dépistage des résidus d'antibiotiques, ne comporte pas d'étude collaborative.

Deux évolutions majeures sont à noter concernant les protocoles de validation AOAC :

- La notion de $CC\beta$ est apparue pour la première fois, récemment, dans les validations AOAC dans le cadre du programme PTM [296], ainsi que des références à la décision européenne 2002/657/CE et au guide de validation européen (2010). Le concept est le même, l'erreur beta est aussi fixée à 5 %. Le $CC\beta$ est déterminé suivant une approche proposée dans le guide européen, mais qui dans les faits n'est pas souvent utilisée. Plusieurs concentrations d'un antibiotique sont d'abord testées avec des réplicats pour estimer le $CC\beta$, à partir de la courbe dose-réponse. Ensuite, 60 échantillons sont supplémentés au $CC\beta$ estimé et le $CC\beta$ est déterminé plus précisément. C'est bien le $CC\beta$ qui est déterminé et non plus la sensibilité 90/95%.
- L'approche globale de la POD est à présent utilisée par l'AOAC, en combinaison avec une approche critère par critère, pour les kits de microbiologie alimentaire, depuis la parution de nouvelles lignes directrices en 2014 [279]. Cette approche combinée pourrait être aussi appliquée dans l'avenir aux kits de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments.

Il faudra attendre le prochain kit antibiotiques certifié PTM par l'AOAC pour voir si la détermination du $CC\beta$ se poursuit ou si l'approche de la POD est mise en place.

Dans la décision 93/256/CE, le calcul de la limite de détection était basé sur l'analyse des blancs uniquement (20 échantillons) et pas du tout sur l'analyse d'échantillons supplémentés [290]. Dans le cas de méthodes microbiologiques à très large spectre, la détermination de la LOD permettait seulement de fixer le seuil de positivité (valeur de la zone d'inhibition au-dessus de laquelle il est conclu qu'un échantillon est positif). Cette limite de détection n'apportait aucune information sur le niveau de détection associé à chacun des antibiotiques détectés par la méthode, au contraire des capacités de détection utilisées actuellement. De plus, la décision 93/256/CE précisait pour les méthodes de dépistage que l'incidence des résultats faux-négatifs devait être « la plus faible possible ». Toutefois, aucune détermination ou estimation du taux de faux-négatifs n'était prévue par cette décision.

La décision 2002/657/CE était censée apporter des améliorations par rapport à la décision 93/256/CE. Les avancées concernant les méthodes de confirmation étaient flagrantes dans cette nouvelle décision, prenant bien en compte les progrès technologiques survenus depuis la première décision

93/256/CE [290]. Concernant les méthodes de dépistage, les apports de cette nouvelle décision étaient beaucoup plus discrets. Toutefois, le concept le plus important de cette décision pour les méthodes de dépistage, la capacité de détection ou $CC\beta$ a beaucoup apporté pour la caractérisation et la validation des méthodes de dépistage. Comme nous l'avons dit précédemment, dans la décision 93/256/CE, le calcul de la limite de détection à partir du bruit de fonds produit par les échantillons blancs n'était pas très satisfaisant. Le concept plus statistique du $CC\beta$ associé à un risque d'erreur de 5 % maximum est beaucoup plus intéressant et performant. En outre, la nouvelle décision fixe un taux maximum de résultats faux-négatifs de 5%. La décision européenne 93/256/CE exigeait seulement que l'incidence des faux résultats négatifs soit la plus faible possible, sans fixer de taux maximum. Toutefois, pour la mise en pratique de ce concept, il aura fallu toutefois beaucoup de tâtonnements et finalement la rédaction du guide européen pour la validation des méthodes de dépistage (2010) [256]. Dans l'intervalle de temps entre la parution de la décision 2002/657/CE et celle du guide de validation Européen, quelques laboratoires ont publié des validations de méthodes en essayant de se conformer aux exigences de la décision 2002/657/CE et en « copiant » les procédures applicables pour les méthodes de confirmation, bien développées dans la décision. Deux exemples montrent ce « copier-coller ». Tout d'abord, la limite de décision ($CC\alpha$) devait nécessairement être déterminée pour des méthodes de dépistage dans une des approches de détermination du $CC\beta$, alors que le $CC\alpha$ n'était pas exigé. Pourtant c'était la seule possibilité pour une méthode biologique de dépistage, puisque cette approche était de calculer le $CC\beta$ à partir d'échantillons supplémentés au $CC\alpha$. Il fallait donc d'abord déterminer le $CC\alpha$ au préalable à partir d'échantillons blancs [297, 298]. L'autre approche de la décision était de déterminer les $CC\alpha$ et $CC\beta$ à partir de la courbe d'étalonnage linéaire selon la norme ISO 11843 [291], ce qui n'est pas toujours possible avec les méthodes biologiques de dépistage. La norme ISO 11843 a été étendue à des modèles non linéaires [299]. Toutefois, ces approches sont peu ou pas appliquées dans les laboratoires, pour les résidus d'antibiotiques. De plus, toutes les validations de kits (eg. ELISA) ou de biocapteurs immunologiques approchaient ce type de méthodes obligatoirement comme une méthode quantitative [26, 163]. Au contraire, à présent la tendance va vers une approche qualitative de ce type de méthodes pour la validation et pour l'utilisation en routine [61, 187]. D'une part, cela simplifie la validation et diminue la charge de travail. De plus, il n'est pas nécessaire pour une méthode de dépistage de fournir une valeur quantitative de la concentration en analyte contenue dans l'échantillon. La détermination de la valeur seuil et l'utilisation des QC négatifs et surtout positifs permet d'estimer si la concentration en antibiotiques dans l'échantillon est inférieure ou supérieure au $CC\beta$, si et seulement si toutefois une seule molécule est reconnue par l'anticorps ou le biorécepteur.

En conclusion, les avantages de l'approche de validation critère par critère sont les suivants :

- des critères objectifs pré-déterminés auxquels les caractéristiques de performance déterminées sont comparées,
- par rapport à la décision 93/256/CE, l'approche du $CC\beta$ est plus statistique que la LOD,
- un critère de risque de 5 % est fixé sur les faux-négatifs, alors qu'il n'existait pas dans la décision 93/256/CE,

- le CC β est la caractéristique majeure apportée par la décision européenne 2002/657/CE [13] qui permet d'évaluer la performance d'une méthode de dépistage et son aptitude à répondre à l'usage attendu,
- le CC β peut/doit être utilisé pour suivre les performances de la méthode en continu, pendant son application en routine, comme valeur de supplémentation du contrôle qualité positif (eg. cartes de contrôle),
- les valeurs seuils Fm et T sont un apport très important du guide de validation européen, pour vérifier la performance et la validité des essais en routine au jour le jour et pour aider à la décision sur les échantillons inconnus en routine. Ces valeurs seuils sont liées au CC β .
- grâce à l'approche proposée pour la détermination de l'applicabilité dans le guide de validation européen [256], la détermination du CC β et de la spécificité permet de vérifier, avec des essais réduits, si la méthode est valide dans le cas d'une extension de matrice (eg. denrée alimentaire, espèce animale),
- le CC β , combiné à la spécificité, va permettre de comparer deux méthodes, en déterminant ces deux caractéristiques pour chacune des méthodes.

Les inconvénients de cette approche sont les suivants :

- Le nombre d'essais à réaliser pour déterminer le(s) CC β , principalement pour les méthodes microbiologiques à large spectre représente une charge de travail lourde, malgré le choix d'une liste d'antibiotiques représentatifs et l'utilisation de tissus simulés pour les matrices solides (eg. muscle).
- Avec cette approche de la détermination du CC β , le taux de faux-négatifs à cette concentration est forcément inférieur ou égal à 5 % mais on ne connaît pas ce taux précisément comme le font remarquer Galarini *et al.* [300].
- Comme plusieurs caractéristiques de performance sont déterminées en parallèle, certaines caractéristiques peuvent être valides et pas d'autres. Dans ce cas de figure, les conclusions sont contradictoires. En général, la conclusion finale est que la méthode n'est pas valide puisqu'une des caractéristiques ne l'est pas. Toutefois, dans le cadre des méthodes biologiques, par exemple, le CC β peut ne pas être valide pour certains antibiotiques à rechercher, mais être valide pour d'autres. Si toutes les autres caractéristiques sont valides, on peut conclure à la validité de la méthode, mais seulement sur une liste de composés dont le CC β est valide.
- Le concept des CC α et CC β n'est utilisé que dans la décision 2002/657/CE [13], donc que pour les résidus concernés par la directive 96/23/CE. Donc il y a un manque d'harmonisation pour certains laboratoires qui travaillent sur d'autres contaminants chimiques, par exemple les pesticides. Toutefois, le concept de SDL dans la SANCO/12571/2013 [301] pour les pesticides pour les méthodes de dépistage qualitatives est équivalent au concept de CC β .

3.3. CONCLUSION GENERALE SUR LES APPROCHES DE VALIDATION

Les différentes caractéristiques de performance, les expériences nécessaires pour les déterminer, le mode d'évaluation et les critères de validation associés, en fonction de l'approche choisie, sont synthétisés dans le **Tableau 19** pour les méthodes de dépistage qualitatives et dans le **Tableau 20** pour les méthodes de dépistage quantitatives.

L'approche de validation par comparaison d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence n'est pas satisfaisante pour valider une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques. Le choix de la méthode de référence est difficile et entraîne des complications dans le déroulement de l'étude et dans l'interprétation des résultats. En effet, la méthode alternative est souvent basée sur des principes différents et présente le plus souvent des limites de détection plus basses que la méthode de référence.

L'approche globale pour les méthodes qualitatives (POD), comme pour les méthodes quantitatives (profil d'exactitude) sont applicables aux méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques. La représentation graphique permet de visualiser rapidement le biais d'une méthode et sa fidélité. De plus, le profil d'exactitude permet de choisir le modèle d'étalonnage le plus adapté, et pas forcément celui utilisé classiquement pour un type de méthodes. Enfin, la combinaison de deux caractéristiques en une, pour les deux approches permet de conclure plus simplement sur la validité d'une méthode que chaque caractéristique prise indépendamment. Le nouveau protocole AOAC a intégré l'approche POD pour déterminer la sensibilité 90/95% pour des kits de dépistage des résidus d'antibiotiques. Le profil d'exactitude a déjà été utilisé pour valider des méthodes de dépistage quantitatives, par exemple des méthodes de microbiologie alimentaire [277].

L'approche classique critère par critère recommandée par la décision européenne 93/256/CE n'était pas très performante. Le calcul de la LOD basé sur l'analyse de 20 blancs n'était pas satisfaisant, puisque la LOD n'était pas basée sur l'analyse d'échantillons supplémentés avec l'analyte d'intérêt. Aucun taux maximum n'était fixé pour le taux de résultats faux-négatifs. La décision européenne 2002/657/CE [13] qui a abrogé la décision 93/256/CE [290] a apporté une caractéristique déterminante pour la validation des méthodes de dépistage et pour le suivi de la performance de la méthode en routine, la capacité de détection ou CC β . Le taux de faux-négatifs a été fixé à 5% (erreur β) pour les méthodes de dépistage.

Tableau 19. Caractéristiques de performance pour les méthodes qualitatives de dépistage, en fonction de l'approche de validation.

Approche	Caractéristiques	Expériences	Evaluation	Critères d'acceptation	
93/256/CE	LOD	20 blancs	3*SD bruit du fond	≤ LMR	le plus bas possible
POD	LOD50 ou LOD95	Plusieurs concentrations, plusieurs répétitions	A partir de la courbe dose réponse	≤ LMR	le plus bas possible ou ≤ LPMR
	RLOD			Proche de 1 ???	
AOAC	Sensibilité 90/95%	Plusieurs concentrations, plusieurs répétitions	A partir de la courbe dose réponse	≤ limites réglementaires	/
2002/657/CE Guide de validation (2010)	CCβ	20 à 60 supplémentés à la CCD	Concentration pour laquelle le taux de faux-négatifs ≤ 5%	≤ LMR	le plus bas possible ou ≤ LPMR
Toutes	Spécificité	N échantillons blancs	Taux de faux-positifs	Taux minimal	
Guide de validation (2010)	Applicabilité	20 blancs et 20 supplémentés au CCβ de la 1ère matrice	Concentration pour laquelle le taux de faux-négatifs ≤ 5%	CCβ de la 2 ^e matrice équivalent au CCβ de la 1ère matrice	

Ecart-type (Standard deviation ou SD) ; Limite de détection (LOD) ; Limite de détection relative (RLOD) ; Concentration cible de dépistage (CCD) ; Limite Maximale de Résidus (LMR) ; Limite de Performance Minimale Requise (LPMR).

Toutefois, le guide de validation des méthodes de dépistage rédigé par les LRUE et la DGSANTE en 2010 [256] a été nécessaire pour aider les laboratoires à mettre en place cette décision. Pour les méthodes microbiologiques, les avancées principales concernent la recommandation de validation pour une liste d'antibiotiques représentatifs, faire varier le nombre d'échantillons à analyser la concentration cible en fonction du ratio CCD/LMR et les tissus simulés pour les matrices solides comme le muscle. Pour les méthodes immunologiques, le point principal concernées valeurs seuils T et Fm à partir des échantillons blancs et des échantillons supplémentés à la CC, pour déterminer le CC β et valider la méthode, pour suivre les performances de la méthode en routine (cartes de contrôle) et pour déterminer l'applicabilité de la méthode à post \acute{e} riori (*i.e.* extension de matrices).

Tableau 20. Caractéristiques de performance pour les méthodes quantitatives de dépistage, en fonction de l'approche de validation.

Approche	Caractéristiques	Expériences	Evaluation	Critères d'acceptation
93/256/CE	Exactitude <hr/> Précision	Concentration proche de la LMR Répétitions en conditions de répétabilité et de reproductibilité	Différence entre la valeur moyenne mesurée pour le matériel de référence et sa valeur réelle, exprimée en pourcentage <hr/> Calcul des CV intra-jour et inter-jours	¹ Faux-positifs acceptés Faux-négatifs au minimum
2002/657/CE Guide de validation	Fidélité	Concentrations 1, 1,5 et 2 fois la LPMR ou 0,5, 1 et 1,5 fois la LMR, plusieurs répétitions (jours)	Calcul des CV intra-jour et inter-jours	$\leq CV =$ f(concentration) (équation d'Horwitz, de Thompson)
Profil d'exactitude	Exactitude = justesse + fidélité	Plan d'étalonnage + plan de validation (plusieurs niveaux de concentration, plusieurs répétitions)	Choix du modèle d'étalonnage optimal, choix de β et λ ; construction des profils d'exactitude	Intervalle de tolérance (proportion β) le plus possible compris dans l'intervalle d'acceptabilité (λ réglementaire)

¹ Des critères en termes de coefficients de variation (CV) ne sont indiqués dans cette décision que dans le chapitre méthodes de confirmation.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

L'utilisation d'antibiotiques dans les traitements animaux peut entraîner la présence de résidus dans les produits d'origine animale (eg. lait, viande). Le contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale permet de protéger le consommateur. La première étape du contrôle est constituée par les méthodes de dépistage, qui peuvent être de type microbiologique, immunologique ou physico-chimique. Ces méthodes représentent une variété importante, basées sur des principes différents. Les méthodes peuvent être qualitatives ou quantitatives.

Le dépistage est une étape critique et primordiale, qui doit détecter le mieux possible les résidus d'antibiotiques au niveau des limites réglementaires (eg. LMR) pour éviter la présence de résidus dans l'alimentation. De plus, comme tous les résultats positifs à cette étape sont obligatoirement confirmés par une méthode physico-chimique coûteuse, il faut éviter de déclarer des échantillons exempts de résidus comme positifs. C'est pourquoi les méthodes de dépistage doivent être validées afin de déterminer leurs performances et vérifier qu'elles sont adaptées à l'usage qui va en être fait. De plus, la validation des méthodes analytiques est une exigence réglementaire dans le domaine des résidus (décision européenne 2002/657/CE) et normative pour l'accréditation des laboratoires d'essais (NF EN ISO/CEI 17025).

Etant donné la diversité de méthodes de dépistage à notre disposition, les approches de caractérisation doivent-elles être différentes ? Les différentes approches de validation proposées dans la littérature sont-elles applicables aux méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques ? Si oui, les résultats et conclusions de ces différentes caractérisations sont-ils comparables et de même qualité ? L'objectif principal de cette thèse est de comparer ces différentes approches afin de statuer sur la fiabilité des décisions prises par chaque approche, au moyen des résultats obtenus à partir des méthodes de dépistage validées selon ces différentes approches.

Dans ce contexte, notre premier objectif a été de tester ces différentes approches, pour la caractérisation des performances des méthodes de dépistage. Dans un premier temps, l'approche critère par critère a été appliquée à différents types de méthodes de dépistage. Une méthode de type biocapteur a été développée pour le dépistage de la sulfaméthazine dans le lait. Il s'agit d'un système commercial appelé BIAcore (GE Healthcare, Suède) dont la détection est basée sur la résonance plasmonique de surface (RPS). L'approche critère par critère mise en œuvre suivait les exigences de la décision européenne 93/256/CE (**Article 1**).

Dans un deuxième temps, l'approche par comparaison de méthodes a été appliquée à une méthode microbiologique de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le muscle de différentes espèces animales. Un kit commercial nommé Premi@Test (r-Biopharm, Allemagne) basé sur l'inhibition de croissance de la bactérie *Bacillus stearothermophilus* inoculée dans un milieu gélosée en ampoule. Cette validation a été réalisée dans le cadre de la certification AFNOR, qui impose de valider la méthode alternative (le kit commercial) par rapport à une méthode de référence (**Article 2**). Dans un troisième temps, l'approche globale a été mise en place pour la validation d'une méthode immunologique de type ELISA, pour le dépistage des résidus d'un anticoccidien, la nicarbazine, dans

les œufs. Un plan expérimental a été réalisé afin de construire le profil d'exactitude. Cette méthode a été caractérisée comme une méthode quantitative (**Article 3**). Depuis 2002, la décision européenne 2002/657/CE concernant la validation des méthodes de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les aliments a été mise en vigueur, remplaçant la décision 93/256/CE. Cette décision a été complétée pour faciliter sa mise en œuvre par la publication d'un guide de validation des méthodes de dépistage (2010). Une méthode microbiologique en boîtes, appelée méthode Screening Test for Antibiotic Residues (STAR), développée au laboratoire a été validée pour le dépistage des antibiotiques dans le muscle de différentes espèces animales, suivant la nouvelle approche critère par critère (**Article 4**). Une méthode immunologique basée sur un biocapteur commercial, appelé Evidence Investigator® (Randox, Royaume-Uni), permet la détection simultanée de plusieurs antibiotiques ou familles d'antibiotiques par chimiluminescence. Le kit AM II pour le dépistage de 6 familles d'antibiotiques dans le miel a aussi été validé suivant cette nouvelle approche (**Article 5**).

Notre 2^e objectif a été de comparer ses différentes approches, afin de conclure sur leur applicabilité aux méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques et d'envisager des évolutions possibles pour le futur.

RÉSULTATS

I. ARTICLE 1

DEVELOPMENT OF AN IMMUNOASSAY FOR THE
DETECTION OF SULFAMETHAZINE IN MILK
USING AN OPTICAL BIOSENSOR: INFLUENCE OF
FLOW RATE AND ANTIBODY ON THE
PERFORMANCE OF THE ASSAY

Valérie Gaudin, Marie-Laure Pavy

Journal of AOAC International

Contexte

La sulfaméthazine est un antibiotique de la famille des sulfamides. Ce principe actif, retrouvé dans de nombreux médicaments vétérinaires, est utilisé chez les animaux de rente et en particulier chez les vaches laitières. Des résidus de sulfaméthazine peuvent être retrouvés dans le lait de vache. La Limite Maximale de Résidus (LMR) pour la somme des sulfamides dans le lait a été fixée à 100 µg/kg. Les méthodes de dépistage doivent donc être capables de détecter cet antibiotique dans le lait, au niveau ou en dessous de la LMR. Il existe différents types de méthodes de dépistage pouvant détecter les sulfamides dans le lait : des méthodes microbiologiques [22, 29, 302], immunologiques (type ELISA) [66, 70, 159, 303, 304], physico-chimiques, telles que la CCM [305], la CLHP [306] ou CL-SM/SM [307]. Cependant, les méthodes microbiologiques présentent le plus souvent des limites de détection supérieures aux LMR pour les sulfamides (LMR = 100 µg/kg).

La technologie « Biomolecular Interaction Analysis » (BIA) permet l'étude en temps réel des interactions entre biomolécules, sans marquage. Au départ, la principale application était la détermination de l'affinité entre biomolécules et de la cinétique des interactions [308]. Les applications se sont ensuite diversifiées et ont touché de nombreux domaines des sciences de la vie. Le système Biacore X (Biacore AB, Suède) est un biocapteur optique, dont la détection est basée sur la résonance plasmonique de surface (SPR) [309]. Le principe de la méthode est de fixer de manière covalente un ligand (anticorps) sur une surface appelée *sensor chip* (**Figure 44**) et d'introduire un analyte dans un débit de tampon. Les deux molécules vont alors former des complexes. Ces interactions entre biomolécules, sont visualisées en temps réels grâce à un détecteur optique. Le sensorgramme permet de visualiser les variations de l'angle de résonance sous l'effet de l'association et de la dissociation des analytes sur la surface (**Figure 45**).

Les premières publications de développement de méthodes pour détecter les résidus d'antibiotiques avec ce système sont parues entre 1995 et 2001 [162, 168, 310-312].

Méthodologie/Principaux résultats

Nous avons développé, optimisé et validé une méthode de dépistage de la sulfaméthazine dans le lait, en utilisant deux anticorps polyclonaux anti-sulfaméthazine. La première étape du développement consistait à optimiser l'immobilisation de la sulfaméthazine à la surface de la *sensor chip* (la biopuce). Ensuite, nous avons optimisé la concentration active d'anticorps primaire qui va être mélangée avec l'échantillon, ainsi que la concentration d'anticorps secondaire. Ce type d'essai est compétitif : en cas d'absence de sulfaméthazine dans l'échantillon, l'anticorps primaire en excès pourra se lier totalement à la surface de la puce, donc le signal sera maximum (détection du changement de masse). En cas de présence de sulfaméthazine dans l'échantillon, elle entrera en compétition avec la sulfaméthazine immobilisée à la surface, pour se lier à l'anticorps primaire ; donc la quantité d'anticorps à la surface diminuera et le signal aussi. Le signal est donc inversement proportionnel à la quantité de sulfaméthazine dans l'échantillon. Un anticorps secondaire anti-anticorps de lapin a été utilisé pour augmenter le signal. De plus, le débit du flux à travers le système a été optimisé.

Figure 44. La *sensor chip*.

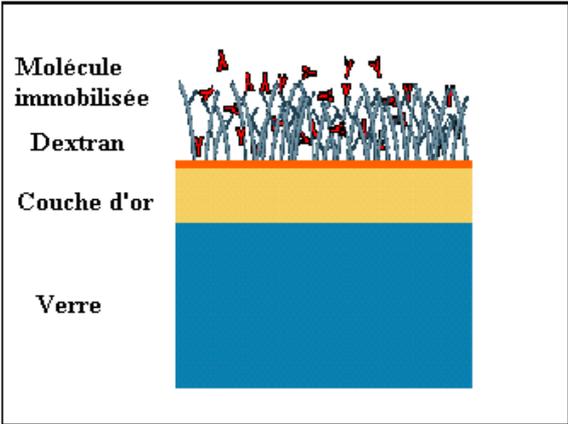
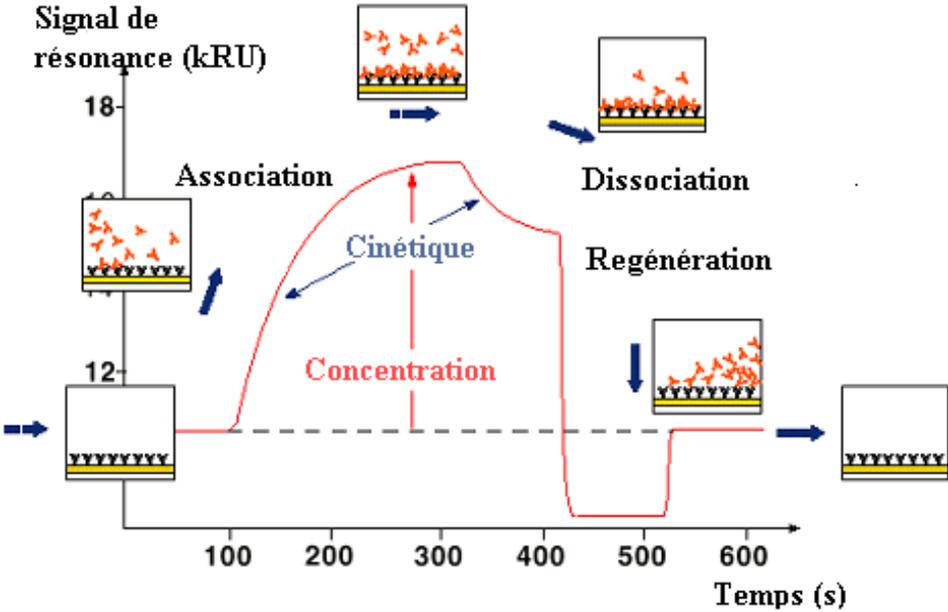


Figure 45. Le sensorgramme.



Au moment de cette validation, la réglementation européenne pour la validation des méthodes analytiques pour les résidus et contaminants était la décision 93/256/CE [313], en vigueur jusqu'en 2002 (abrogée par la décision 2002/657/CE) [13]. Selon cette décision, les caractéristiques de performance à déterminer pour une méthode de dépistage étaient : la spécificité, la limite de détection, la praticabilité (grand nombre d'échantillons, coûts limités) pour les méthodes qualitatives et de surcroît pour les méthodes quantitatives, la fidélité et l'exactitude. La limite de détection était définie comme la concentration la plus basse qui pouvait être déterminée comme statistiquement différente (3 écart-type) d'un lait de contrôle négatif ou de tampon (réponse moyenne de 20 contrôles négatifs). Dans cette étude, la validation de la méthode a consisté à déterminer la concentration minimale inhibitrice à 50% (IC50), la spécificité, la limite de détection et la fidélité. L'IC50, qui correspond à la concentration d'analyte qui inhibe 50 % du signal, est une caractéristique très utilisée pour caractériser les tests ELISA et pour comparer les performances de tests ELISA entre eux, dans le domaine médical par exemple. En effet, un test ELISA avec une IC50 inférieure à celle d'un autre test est un test ELISA qui aura une limite de détection plus basse, donc il sera plus performant. Cette caractéristique est aussi parfois utilisée pour les tests ELISA pour le dépistage des résidus d'antibiotiques [314-316]. Etant donné que l'approche Biacore est très proche du principe de l'ELISA, l'IC50 a aussi été déterminée lors de cette validation, à partir des courbes de calibration, même s'il ne s'agit pas d'une exigence de la décision 93/256/CE. La répétabilité du signal a été mesurée sur les points de la courbe d'étalonnage, en répétant chaque point de la courbe 3 fois par jour, pendant 3 jours, soit 9 réplicats par point de la gamme.

Lors du développement de la méthode, les concentrations actives des anticorps primaires et de l'anticorps secondaires ont été optimisées. L'influence du débit de l'échantillon sur les limites de détection et sur l'IC50 dans le lait et dans le tampon a été montrée avec les 2 anticorps. La limite de détection dans le lait avec les deux anticorps étaient plus élevée à 20 µl/min qu'à 5 µl/min. Cependant, une limite de détection à 8 µg/kg restait bien inférieure à la LMR (100 µg/kg). Etant donné le gain de temps pour l'analyse à 20 µl/min (8 minutes contre 30 minutes à 5 µl/min), le débit de 20 µl/min a été conservé. Les limites de détection obtenues en tampon (2.9 µg/kg) et dans le lait (1.7 µg/kg) avec l'anticorps 2 étaient plus basses que celles obtenues avec l'anticorps 1 (10 µg/kg dans le tampon et 8 µg/kg dans le lait). Aucune réaction croisée n'a été observée pour les deux anticorps primaires avec 6 sulfamides testés (sulfadiméthoxine, sulfaméthoxypyridazine, sulfamonométhoxine, sulfadoxine, sulfadiazine, sulfaphénazole), ni avec des molécules des autres grandes familles d'antibiotiques (pénicilline, céphalosporine, aminoside, tétracycline, chloramphénicol, quinolone). La répétabilité des résultats était un peu plus élevée avec l'anticorps 2 qu'avec l'anticorps 1, mais encore très satisfaisante (< 13%), par rapport aux critères de performance de la décision 93/256/CE (11,5 à 15 % en conditions de répétabilité à 100 µg/kg).

Conclusions/Importance

En conclusion, nous avons démontré l'applicabilité du Biacore au développement de méthodes pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale. Deux méthodes ont été développées, utilisant deux anticorps différents, capables de détecter la sulfaméthazine dans le lait, largement en dessous de la LMR. Les deux méthodes sont rapides (8 minutes par échantillon) et nécessitent une faible préparation de l'échantillon (pasteurisation, écrémage, dilution). En fonction de l'objectif, la spécificité de la méthode pour la sulfaméthazine peut représenter un problème car la LMR des sulfamides est fixée pour la somme des sulfamides. Donc, dans le cadre du développement d'une méthode de dépistage, l'idéal serait de détecter tous les principes actifs de la famille des sulfamides avec la même méthode. Toutefois, dans le cadre d'une application ciblée sur la sulfaméthazine (cinétique de déplétion), la méthode est adaptée. Cette première validation d'une méthode immunologique suivant la décision 93/256/CE a été réalisée en considérant la méthode développée comme une méthode quantitative. C'est pourquoi la fidélité (répétabilité) a été déterminée.

Lors des validations réalisées suivant le protocole recommandé dans la décision européenne 93/256/CE pour des méthodes immunologiques (eg. ELISA, Biacore), la limite de détection était calculée à partir de l'analyse de 20 échantillons blancs et du bruit de fond associé. Cette approche pouvait donner des limites de détection, qui n'étaient pas toujours représentatives de la performance réelle de la méthode, étant donné la variabilité associée aux mesures avec ce type de méthodes, surtout en ELISA. En général, la fidélité des méthodes développées sur le système Biacore étaient meilleures que celles obtenues avec des kits ELISA. Toutefois, nous pouvons dire à présent que l'approche du CC β apporté par la décision européenne 2002/657/CE, est plus adaptée et apporte plus de confiance dans le résultat. En effet, le CC β est déterminé à partir d'échantillons supplémentés à une concentration cible, et non à partir d'échantillons blancs. Enfin, nous pouvons ajouter qu'avec l'expérience, la plupart du temps, les méthodes immunologiques sont validées uniquement comme des méthodes qualitatives et non plus comme des méthodes quantitatives, sauf si leur utilisation l'exige.

Par la suite, nous avons pu développer d'autres applications du système Biacore, telles que le dépistage d'une substance interdite avec une limite de détection inférieure à la Limite Minimale de Performance (LMPR) [317], d'une famille d'antibiotiques (eg. sulfamides [163], pénicillines [162]). Les limites de détection basses et la préparation d'échantillons réduite étaient prometteuses pour une mise en place plus large de ce système de biocapteur dans le contrôle Européen. Le système Biacore présentait d'autres avantages, dont celui de pouvoir réaliser faire son propre développement de méthodes (préparation des biopuces et optimisation de la méthode). De plus, la technologie ne nécessitait pas de marquage de l'analyte ou du biorécepteur, puisque le système détecte les changements de masse à la surface). De plus, le Biacore XTM possédait 4 canaux en parallèle (le Biacore 2000TM avait 8 canaux), ce qui permettait en théorie de combiner plusieurs essais pour plusieurs sulfamides ou d'autres familles d'antibiotiques.

Determination of Sulfamethazine in Milk by Biosensor Immunoassay

VALÉRIE GAUDIN and MARIE-LAURE PAVY

Community Reference Laboratory for Veterinary Drug Residues, CNEVA, BP 203, 35302 Fougeres, France

A biosensor based on surface plasmon resonance (SPR) measurement was developed for use in an immunoassay for detection of sulfamethazine (SMZ) in milk. The biospecific surface was a carboxymethyl dextran-modified gold-surface sensor chip to which SMZ was covalently bound. The assay was based on inhibition of the binding of polyclonal antibodies to immobilized SMZ by SMZ in the sample. The SPR response changed inversely in relation to the antibiotic concentration in the sample. Calibration curves were constructed for SMZ in buffer and in milk at a concentration which included the maximum residue limit (0 to 200 µg/kg). The analysis time per sample varied from 8 to 30 min. Different flow rates and antibodies were modified alternatively during the study to assess their influence on the performance of the assay. The active antibody concentration was calculated at approximately 1880 and 180 nM for the antibody anti-SMZ 1 and the antibody anti-SMZ 2, respectively. No cross-reactivity of antibodies with other antibiotics was found. Under optimal conditions, the detection limits in milk for SMZ were 8 and 1.7 µg/kg, respectively, for antibody 1 and antibody 2, at a flow rate of 20 µL/min.

Sulfamethazine is a member of the sulfonamide family, the oldest and largest group of synthetic antimicrobial agents. Sulfonamides have a broad spectrum of antibacterial activity and are commonly used for prophylactic or therapeutic purposes in veterinary medicine. Therefore, maximum residue limits (MRLs) were established according to European Union (EU) regulations for the protection of consumers of animal products. The MRL for sulfonamides in milk and meat has been set at 100 µg/kg (1).

Analytical methods are needed to detect drug residues in foods of animal origin. Microbiological and immunological methods are used routinely for screening, and physicochemical methods (e.g., liquid chromatography [LC] and mass spectrometry) are used for identification and quantitation of antibiotic residues. However, microbiological

methods lack sensitivity and specificity, and physicochemical methods require qualified staff, sample pretreatment, and high purity chemicals. Although immunological methods such as the ELISA are specific and generally sensitive, they are time-consuming. Therefore, there is a need for new screening methods that are fast, sensitive, and automated, with high sample throughput and minimum preparation of samples. The BIACORE™ system is being evaluated for detection of antibiotics in our laboratory. Analogous methods using this system for SMZ in milk (2, 3) and enrofloxacin/ciprofloxacin (4) were recently described. The published assay reported that sulfamethazine (SMZ) had a concentration of 1 to 10 µg/kg, which did not include the MRL, and an analysis time of 50 min (30 min incubation and 20 min injection). This report describes the development of a faster assay for SMZ in milk with a larger concentration range and underlines the influence of flow rate and quality of the antibody on method performance.

Experimental

Instrumentation

A BIACORE X optical sensor (Biacore AB, Uppsala, Sweden) was used to perform the assay. The use of BIA technology (biospecific interaction analysis) enabled us to study label-free molecular interactions in real time. The biospecific surface was a carboxymethyl dextran-modified gold-surface sensor chip to which one interactant was covalently bound. Other molecules were injected by the microfluidic cartridge. Using the detection principle known as surface plasmon resonance (SPR), we detected changes of mass on the surface which represented association or dissociation of complexes (5).

Reagents

- CM5 sensor chips (research grade).
- HBS buffer.—pH 7.4, as eluent, consisting of 10 mM Hepes (4-[2-hydroxyethyl]piperazine-1-ethane-sulfonic acid), 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, and 0.005% (v/v) Surfactant P 20.
- Amine coupling kit.—Containing NHS (100 mM *N*-hydroxysuccinimide in water), EDC [400 mM *N*-ethyl-*N'*-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide in water], and ethanolamine hydrochloride, pH 8.5 (Biacore AB). SMZ and all other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

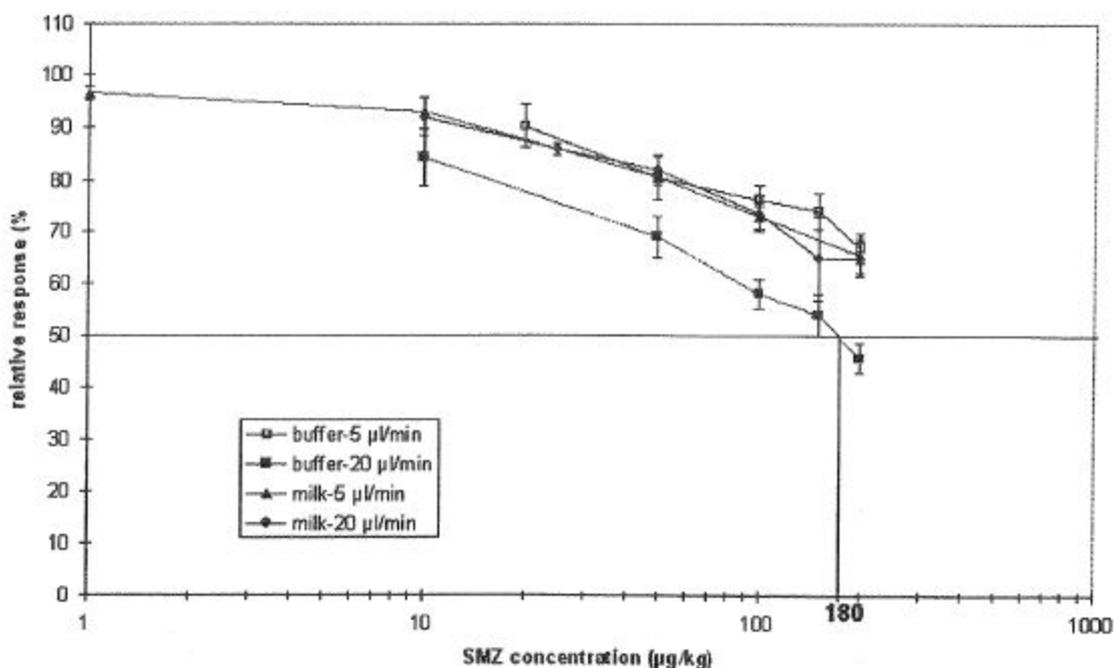


Figure 1. Calibration curves for sulfamethazine in buffer and skim milk. Comparison of 2 flow rates (antibody 1 [2.8 nM], secondary antibody [33.3 nM]). Each point represents the mean of 9 replicates; the error bars indicate the coefficients of variation (CV). The absolute response readings corresponding to the 100% relative response at flow rates of 5 and 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ were 1483.08 ± 109.30 and 588.40 ± 33.47 RU in assay buffer, and 2251.90 ± 28.68 and 712.26 ± 53.96 RU in milk, respectively. Mean IC_{50} values derived from standard curves at flow rates of 5 and 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ were 1000 and 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for assay buffer, respectively, and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for the 2 flow rates for milk.

Antibodies

The first polyclonal antibody, anti-SMZ (antibody 1, produced in rabbits), was obtained from Eurodiagnostica SA (Gentilly, France). The second polyclonal antibody, anti-SMZ (antibody 2, produced in rabbits), was obtained from Philipp Hammer (Institute für Hygiene, Kiel, Germany). The secondary antibody was an IgG fraction of a goat anti-rabbit antiserum obtained from Sigma Chemical Co.

Immobilization of SMZ on Sensor Chip Surface

SMZ was covalently immobilized to the surface of one of 2 channels of the sensor chip by amine coupling (6). All injections were made at a constant flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A solution of 5 mg SMZ/mL was prepared in 10 mM HCl with 10% dimethylformamide (DMF), pH adjusted to 3.0.

The surface was activated by injecting a mixture of NHS-EDC (1 + 1; $2 \times 45 \mu\text{L}$). SMZ was then immobilized by injecting the SMZ solution ($8 \times 45 \mu\text{L}$). Finally, the surface was deactivated by injecting ethanolamine HCl, pH 8.5 ($2 \times 45 \mu\text{L}$). Immediately after immobilization, the surface was conditioned by injecting 100 mM NaOH + 20% DMF (10 μL) and 100 mM HCl + 20% DMF (10 μL).

Determination of Active Antibody Concentration

If mass transport of the analyte to the surface is much slower than association, binding will be limited. Under these conditions, the binding rate at the beginning is directly proportional to analyte concentration and independent of association kinetics. To obtain mass transport conditions, the concentration of surface binding sites must be increased.

A calibration curve in which the binding rate has been plotted against active antibody concentration from 0.5 to 160 nM is valid for a large variety of antibodies (7).

Serial 2-fold dilutions of polyclonal antibodies were prepared in HBS (dilution factors from 20 to 2560 \times) to find a dilution for which the binding rate in resonance units per second (RU/s) was constant over time. The observed binding rate was used to determine active antibody concentration by using the calibration curve.

Preparation of Standards

Standard solutions of SMZ were used to prepare known concentrations of SMZ in HBS or milk. Antibiotic-free milk served as control milk and was also used to prepare spiked samples. SMZ was dissolved at 1 mg/mL in 50 mM borate buffer, pH 8.5, and working solutions were prepared by dilu-

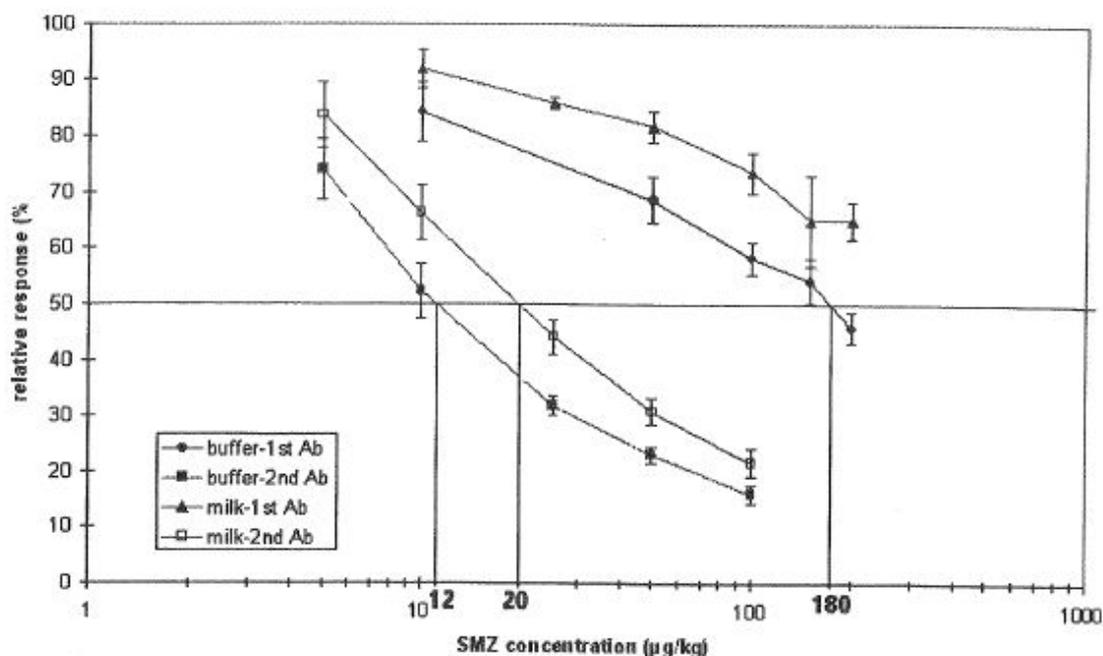


Figure 2. Calibration curves in buffer and skim milk: comparison of 2 antibodies anti-SMZ at 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Antibody 1, 2.8 nM; secondary antibody, 33.3 nM; antibody 2, 2.1 nM; secondary antibody, 33.3 nM. Each point represents the mean of 9 replicates; the error bars indicate CVs. The absolute response readings corresponding to the 100% relative response in assay buffer and in milk at 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ with antibody 2 were 1288.08 ± 68.20 and 1115.73 ± 147.42 RU, respectively. Mean IC_{50} values derived from standard curves made in assay buffer for antibodies 1 and 2 were 180 and 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and in milk 1000 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

tion in HBS. These solutions were finally diluted (1:100) in HBS or milk.

Sample Preparation

Milk samples were pasteurized by heating 15 min at 80°C, and then centrifuged (Jouan GR 4.11) for 10 min at $1000 \times g$. The fat on top was discarded.

Assay Principle

The assay was based on inhibition of the binding of polyclonal antibodies to immobilized SMZ by SMZ in the sample. The SPR response changed inversely in relation to the antibiotic concentration in the sample. The primary antibody was mixed (1 + 1) with HBS or milk; 35 μL of this mixture was injected at a constant flow rate, and 35 μL of secondary antibody was then injected to enhance the signal from the primary antibody.

After each measurement, the surface was regenerated by consecutive injections of 15 μL 50 mM NaOH, pH 12.2, and 15 μL 75 mM HCl, pH 3.3.

Optimization of SMZ Antibody Concentrations

Different concentrations of 2 antibodies anti-SMZ (1.4–11.2 nM and 1.05–8.4 nM, respectively) were tested to

determine the optimal concentration for best sensitivity of the assay. Similar tests were done with the secondary antibody.

Assay Validation

The concentration range for SMZ standard curves was 0–200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Calibration curves were prepared by plotting log (SMZ concentration) against the relative response, as follows:

$$\text{Relative response, \%} = A/A_0 \times 100$$

where A was the response of one sample in RU and A_0 was the response of a negative control sample in RU.

The IC_{50} was defined as the concentration of the inhibitor (antibiotic) required to reduce the signal in RU to one-half the signal measured when no inhibitor was present.

The precision of the assay was estimated by repeating standard curves 3 times per day for 3 days. Coefficients of variation (CVs) were calculated ($n = 9$) for each concentration.

The limit of detection was defined as the lowest concentration that could be determined as statistically different (3 standard deviations) from a negative control milk or HBS (mean response of 20 negative controls).

In order to determine the specificity of the assay, 6 different sulfonamides (sulfadimethoxine, sulfamethoxypyridazine, sulfamonomethoxine, sulfadoxine, sulfadiazine, sulfaphenazole)

and other commonly used antibiotics from major classes (ceftiofur, spiramycin, dihydrostreptomycin, oxytetracycline, penicillin, ampicillin, trimethoprim, chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, enrofloxacin) were tested at a concentration of 1000 µg/kg. The response of each antibiotic was compared with a standard curve of SMZ to determine the corresponding SMZ concentration (equivalent SMZ) and expressed as a percentage:

$$\text{Cross reactivities, \%} = \text{equivalent SMZ}/1000 \times 100$$

Results and Discussion

Primary Antibodies

The active antibody concentrations were calculated at approximately 1880 and 180 nM for antibody 1 and antibody 2 anti-SMZ, respectively. Optimum concentrations which gave the best sensitivity for antibodies 1 and 2 were, respectively, 2.8 and 2.1 nM (data not shown).

Secondary Antibody

Optimum concentrations were those that gave the best sensitivity with maximum reduction of primary antibody concentration and sufficient enhancement of the signal. For the secondary antibody, optimum concentration was 33.3 nM (data not shown), whatever the primary antibody.

Because the secondary antibody enhanced the signal, use of the primary antibody was limited (in this assay, the reduction factor was 1.5–3). However, there were 2 disadvantages when the secondary antibody was used: a decrease of sensitivity (5–20%) of the assay and increase of analysis time.

Specificity and Selectivity

For the 2 primary antibodies, no cross-reactions were observed in milk with either the 6 tested sulfonamides or with molecules of the main families of antibiotics (penicillin, cephalosporin, aminoglycoside, tetracycline, chloramphenicol, quinolone). It was essential that these antibodies were selective for the sulfonamide family because that was the purpose of developing this screening test.

However, the specificity for SMZ was a problem because the MRL has been set for the sum of sulfonamides. It would be interesting, therefore, to find an antibody that would cross-react with the main sulfonamides. Production of this kind of antibody and new technologies in antibody engineering may eventually solve this problem. In the meantime, several antibodies may be used in the assay, each antibody being specific for one sulfonamide; the sum of the results would thus be closer to the real concentration of sulfonamides in the sample. The multichannel system of the BIACORE would permit testing of several sulfonamides in parallel, one by flow cell.

Effect of Flow Rate

The inhibition curves for SMZ in buffer and in milk at 2 different flow rates using antibody 1 are shown in Figure 1. The IC_{50} was estimated in buffer at about 1000 µg/kg at 5 µL/min and 180 µg/kg at 20 µL/min. In milk, the IC_{50} was

1000 µg/kg for the 2 flow rates. Some values of IC_{50} (1000 µg/kg) were determined approximately by extrapolation because they were at the end of the standard curve. Because the IC_{50} was lower in buffer than in milk at 20 µL/min, the effect of the milk matrix was observed at this flow rate and not at 5 µL/min.

For antibody 1, the biosensor immunoassay in buffer had a detection limit of 20 and 10 µg/kg at 5 and 20 µL/min, respectively. In milk, the detection limits were 2.2 and 8 µg/kg at 5 and 20 µL/min, respectively.

The IC_{50} and detection limits in buffer showed better results at 20 µL/min than at 5 µL/min. In milk, the IC_{50} was equivalent for the 2 flow rates and the limit of detection was lower at 5 µL/min. However, we decided to work at 20 µL/min to study antibody 2 anti-SMZ because of the rapidity of the assay (8 min per sample at 20 µL/min instead of 30 min at 5 µL/min) and because a limit of detection of 8 µg/kg in milk was sufficient to detect SMZ near the MRL.

The CVs for each point of the calibration curve were similar in buffer and in milk for both flow rates, between 1.3 and 7.4%. The precision of the assay, therefore, was satisfactory.

Effect of Antibody

The inhibition curves for SMZ in buffer and in milk for antibodies 1 and 2 at 20 µL/min are shown in Figure 2. The estimated IC_{50} was lower in buffer (12 µg/kg) than in milk (20 µg/kg) at 20 µL/min for antibody 2. The effect of the milk matrix was similar to that for antibody 1.

Values for antibody 2 were more precise than those for antibody 1 because the IC_{50} values were included in the middle of the standard curve.

The biosensor immunoassay had a detection limit of about 2.9 and 1.7 µg/kg in buffer and in milk, respectively, with antibody 2 at 20 µL/min. Therefore, whatever the flow rate or antibody, the detection limits were well below the MRL of 100 µg/kg.

Both in buffer and in milk, the assay had a lower IC_{50} and a better limit of detection with antibody 2 anti-SMZ than with antibody 1. The CVs were a little higher with antibody 2, between 5.3 and 12.7%. The precision of the assay was also satisfactory with this antibody.

Conclusions

The development of this biosensor assay led to 2 possible screening tests because 2 antibodies could actually be used. The optimum conditions have been determined at 20 µL/min for the 2 antibodies. Antibody 2 was more sensitive than antibody 1, with a lower detection limit; however, the linear range of the curve did not include the MRL. Moreover, the detection limit of antibody 1 was sufficient to detect SMZ near the MRL. Therefore, antibody 1 could be used directly in the assay or antibody 2 could be used with diluted milk. The advantage of using antibody 2 would be that this dilution step could replace the pasteurization step.

This study demonstrates the impact of flow rate and quality of the antibody on the detection of drug residues by the

immunosensor technique, and would thus be useful for comparing antibodies from different suppliers.

The assay presented here is fast (8 min per sample), sensitive, specific, and repeatable, with minimum preparation of samples, and the concentration range includes the MRL. Therefore, this assay could be used as a routine method for screening of SMZ in milk. Moreover, because the BIACORE system is a multichannel device, it would be possible to measure several different analytes in parallel, either several sulfonamides with very specific antibodies or several families of antibiotics with selective antibodies. For further experiments, a less specific antibody is needed, which would be directed against major molecules of the sulfonamide family, because the MRL was set for the sum of sulfonamides.

Acknowledgments

We gratefully thank Biacore AB for supplying us with consumable product, and Philipp Hammer at the Federal Dairy

Research Institute (Kiel, Germany) for providing us with the anti-SMZ.

References

- (1) Commission Regulation (EEC) No. 675/92 (1992) *Official Journal of the European Community* L 73/8, 19 March 1992
- (2) Sternesjö, A., Mellgren, C., & Björk, L. (1995) *Anal. Biochem.* **226**, 175–181
- (3) Mellgren, C., Sternesjö, A., Hammer, P., Björk, L., & Heeschen, W. (1996) *J. Food Prot.* **59**, 1223–1226
- (4) Mellgren, C., & Sternesjö, A. (1998) *J. AOAC Int.* **81**, 394–397
- (5) Fägerstam, L.G., & O'Shanessy, D.J. (1993) in *Handbook of Affinity Chromatography*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp 229–252
- (6) Johnsson, U., Löfas, S., & Lindquist, G. (1991) *Anal. Biochem.* **198**, 268–277
- (7) Karlsson, R., Fägerstam, L., Nilshans, H., & Persson, B. (1993) *J. Immunol. Methods* **166**, 75–84

II. ARTICLE 2

AFNOR VALIDATION OF PREMI®TEST, A MICROBIOLOGICAL-BASED SCREENING TUBE TEST FOR THE DETECTION OF ANTIMICROBIAL RESIDUES, IN MUSCLES FROM DIFFERENT ANIMAL ORIGINS

Valérie Gaudin, Murielle Juhel-Gaugain, Jean-Pierre Morétain, Pascal Sanders

Food Additives and Contaminants: Part A

Contexte

Les animaux d'élevage peuvent être traités avec des antibiotiques, soit de façon préventive, soit de façon curative. Donc des résidus d'antibiotiques peuvent être retrouvés dans le muscle de ces animaux, soit sous la forme de la molécule mère, soit sous une forme métabolisée. Dans ce cadre, des Limites Maximales de Résidus (LMR) ont été fixées pour tous les antibiotiques autorisés. Les méthodes de dépistage qui sont la première étape du contrôle doivent permettre de détecter ces antibiotiques en dessous ou au moins au niveau de ces LMR. Le kit commercial appelé Premi®Test (commercialisé initialement par la société DSM, Pays-Bas) permet une détection large spectre de plusieurs grandes familles d'antibiotiques, dans le muscle de différentes espèces animales. Ce test microbiologique est basé sur la détection de l'inhibition de la croissance d'une souche bactérienne (*Bacillus stearothermophilus*) pré-ensemencée dans un milieu gélosé prêt à l'emploi. La détection de l'inhibition de la croissance bactérienne en présence de résidus d'antibiotiques dans l'échantillon se fait par un changement de couleur, liée à la présence d'un indicateur de pH, en moins de 4 heures. En effet, cette souche bactérienne possède la propriété d'acidifier le milieu quand elle se développe. En 2008, la société DSM a déposé un dossier de certification AFNOR. En tant que laboratoire expert, nous avons réalisé les études de validation et présenté les résultats au Bureau Technique agro-alimentaire de l'AFNOR.

Méthodologie/Principaux résultats

La validation selon le référentiel AFNOR, spécifique des kits de dépistage des résidus d'antibiotiques, est constituée de deux étapes : l'étude préliminaire et l'étude collaborative. L'un des grands principes de l'étude préliminaire est la comparaison d'une méthode alternative (le kit commercial) avec une méthode de référence. Toute l'étude préliminaire est réalisée avec les 2 méthodes en parallèle ; par contre, l'étude collaborative ne nécessite la pratique des 2 méthodes que chez le laboratoire expert, alors que les laboratoires participants réalisent seulement les analyses avec la méthode alternative. Dans le domaine du dépistage des résidus d'antibiotiques, la méthode de référence est en principe la méthode officielle utilisée pour la réalisation des plans de contrôle et plans de surveillance français. En effet, il n'existe pas de méthodes normalisées dans ce domaine, contrairement au domaine de la microbiologie alimentaire. Dans le cas du Premi®Test, la méthode officielle française, appelée Méthode des 4 Boîtes (M4B), a été choisie comme méthode de référence. La comparaison s'avérait complexe étant donné que les 2 méthodes divergeaient en de nombreux points :

- La préparation des échantillons de muscle est très différente. En effet, pour la M4B, des carottes sont prélevées dans des muscles entiers (non broyés) et congelés. Puis, des rondelles d'une épaisseur de 2 mm sont découpées dans ces carottes et déposées sur les boîtes de milieu gélosé préalablement ensemencé. Dans le cas du Premi®Test, les muscles doivent être entiers, puis pressés pour en obtenir le jus. Ensuite, le jus est déposé sur les ampoules de Premi®Test contenant le milieu gélosé pré-ensemencé. Le spectre de détection des 2 méthodes est différent. En effet, la M4B a un spectre plus large que la méthode alternative, puisque plusieurs germes sont ensemencés dans

différents milieux pour la M4B. alors qu'un seul germe ensemencé dans un seul milieu est utilisé dans la méthode alternative.

- Un problème méthodologique se posait donc pour la supplémentation des muscles. En effet, pour déterminer les limites de détection des méthodes, les matrices sont usuellement supplémentées, avec des quantités connues d'antibiotiques. Dans le cas de la M4B, il est impossible de supplémenter des muscles intacts puisque l'homogénéité de la répartition ne peut pas être garantie. De même, dans le cas du kit, supplémenter du muscle intact puis récupérer le jus ne constituait pas un protocole fiable. De plus, pour déterminer les limites de détection des 2 méthodes, il faut tester de nombreux antibiotiques, chacun à 3 concentrations. Il est impossible de trouver les matériaux naturellement chargés (non broyés), contenant les antibiotiques qui nous intéressent, et de surcroît à 3 concentrations différentes. C'est pourquoi cette étude préliminaire a été décomposée en 3 étapes (**Figure 46**).

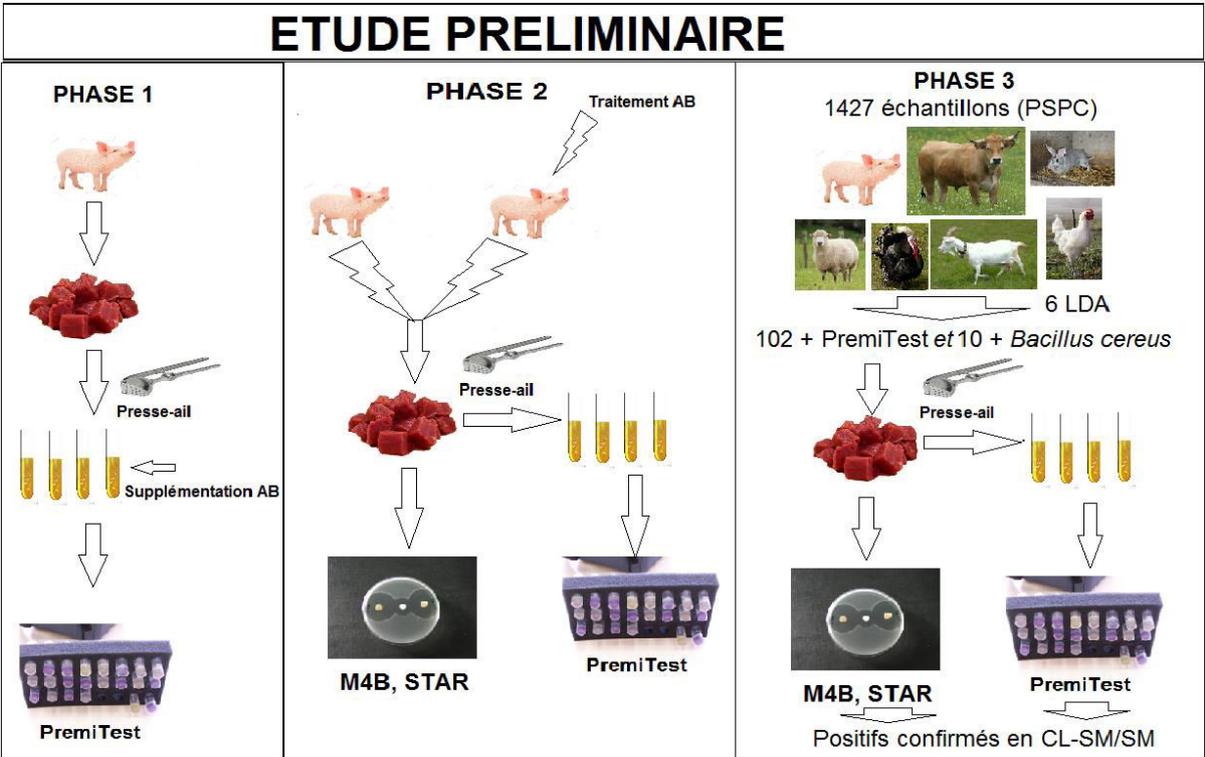
Suite à l'étude préliminaire, une étude collaborative impliquant la participation de 10 laboratoires, a été organisée. Des échantillons de jus de viande supplémentés ont été envoyés aux participants, puis analysés. Chaque matériau a été préparé, codifié et envoyé en double aveugle, soit 32 échantillons à analyser par laboratoire. En plus des échantillons, l'Anses a préparé et fourni à tous les laboratoires collaborateurs 3 témoins négatifs (porc, bœuf, poulet) et un témoin positif bœuf (contenant de la pénicilline G à 10 µg/kg). Les laboratoires participants devaient réaliser les analyses en double aveugle (2 séries distinctes d'analyses).

L'étape 1 a permis de déterminer les limites de détection du Premi@Test pour 6 molécules de 5 familles différentes d'antibiotiques à partir de jus de viande de porc supplémentés. Excepté pour la gentamicine, les limites de détection du Premi@Test se situent au niveau des Limites Maximales de Résidus (LMR). Ces résultats sont en accord avec les performances du test annoncées par le fabricant.

L'étape 2 a permis de déterminer un taux de faux-positifs et un taux de faux-négatifs de 0% pour le Premi@Test. Les taux de faux-négatifs et de faux-positifs étaient meilleurs pour le Premi@Test (0%) que pour la M4B (57% et 15% respectivement). En effet, les limites de détection de la M4B sont insuffisantes pour certains antibiotiques (eg. aminosides). De plus, cette phase de l'étude a montré que la M4B et le Premi@Test donnent des résultats concordants (« les 2 méthodes ne sont pas différentes »).

L'étape 3 a permis de montrer que le Premi@Test était applicable aux muscles de différentes espèces animales (porcins, bovins, volaille, ovin, lapin, ...). La comparaison entre le Premi@Test et la M4B réalisée sur les seuls échantillons analysés au niveau de l'Anses a fait apparaître une différence entre les 2 méthodes. Toutefois, l'intégration des résultats négatifs dans les LVD permet de constater que les 2 méthodes ne sont pas différentes. La capacité de chaque test à détecter les différentes familles d'antibiotiques a été étudiée. Le Premi@Test détecte mieux les antibiotiques de certaines familles (eg. bêta-lactamines) que la M4B et moins bien certaines comme les tétracyclines.

Figure 46. Protocole expérimental de l'étude préliminaire.



Les résultats des laboratoires participants ont été analysés afin de déterminer différents paramètres de validation. Le référentiel AFNOR n'indique pas de limites minimales à atteindre pour les caractéristiques de performance déterminées. La spécificité et la sensibilité au niveau L₃ ont été déterminées respectivement à 95,3 % et 72,5 %. La sensibilité au niveau L₃ est de 100 % pour la sulfaméthazine à 400 µg/kg (4*LMR) dans le muscle de bovin et pour la tylosine à 200 µg/kg (2*LMR) dans le muscle de poulet. Elle est diminuée par un taux de faux-négatifs plus élevé pour le ceftiofur à 800 µg/kg (0,8*LMR) et l'oxytétracycline à 400 µg/kg (4*LMR) dans le muscle de porc. Ces résultats sont satisfaisants en regard des résultats obtenus lors de l'étude préliminaire. Les capacités de détection obtenues lors de l'étude préliminaire (étape 1) par le laboratoire expert étaient plus basses (sulfaméthazine à 2*LMR, tylosine à la LMR, ceftiofur à 0,5*LMR et oxytétracycline à 2*LMR). C'est logique car les résultats d'un seul laboratoire, de surcroît expert dans ce genre de validation, sont le plus souvent meilleurs que les résultats globaux d'une étude collaborative, impliquant des participants plus ou moins habitués à utiliser la méthode alternative. Les résultats des laboratoires participants en termes de répétabilité et de reproductibilité étaient très satisfaisants, avec respectivement un pourcentage moyen de 94,8% pour un même échantillon et de 92,7 % pour 2 échantillons identiques (paire) en répétabilité et un pourcentage moyen de 89,1 en reproductibilité.

Conclusions/Importance

En conclusion, le kit commercial Premi®Test a obtenu la certification AFNOR en 2006 pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans le muscle porcin, bovin et de volaille (hors viande hachée). Cette certification a été reconduite en 2010 et 2014, sur présentation d'un dossier par le laboratoire expert. Le kit est actuellement certifié jusqu'en 2018. La certification AFNOR possède une reconnaissance nationale et européenne, voire internationale. Les études de validation qui conduisent à la certification sont complétées par des audits des sites de production. Ce type de validation permet aux fournisseurs de tests d'obtenir une reconnaissance des performances de leurs tests, de la qualité et de la traçabilité de leur production. Toutefois, nous avons pu voir dans le cadre de cette certification que le principe de base de la certification AFNOR qui repose sur la comparaison de la méthode alternative avec une méthode de référence pose de nombreux problèmes méthodologiques :

- D'une part pour la mise en place de l'étude préliminaire : la préparation des échantillons pour les deux méthodes peut être très différents. La supplémentation de matrices entières, telles que du muscle, ne permettent pas de garantir l'homogénéité de la répartition des résidus. Le spectre de détection des deux méthodes peut être différent. De plus, les méthodes auparavant utilisées comme méthodes de référence sont de moins en moins utilisées dans les laboratoires et ne seront donc plus disponibles dans l'avenir pour réaliser les comparaisons.
- D'autre part pour l'exploitation des résultats de cette l'étude préliminaire : la méthode alternative présente le plus souvent des limites de détection inférieures à celles de la méthode de référence. Donc on ne peut conclure à l'équivalence des deux méthodes, ce qui pose problème dans le cadre de la validation AFNOR. De plus, comme les spectres de détection peuvent être différents, cela renforce la non équivalence des méthodes.

Cependant, le point fort principal de la validation selon le protocole AFNOR est l'organisation d'une étude collaborative. Cette validation inter-laboratoires est très importante car elle permet de déterminer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode alternative, mais aussi de vérifier la robustesse de la méthode. Pour toutes ces raisons, l'Anses en tant que laboratoire expert a proposé à l'AFNOR de réviser le référentiel spécifique des kits antibiotiques. Un groupe de travail réunissant l'Anses, l'AFNOR et d'autres experts est en cours de rédaction d'un nouveau référentiel, qui sera officialisé en 2016. Ce nouveau référentiel conserve les 2 études (préliminaire et collaborative). Par contre, l'étude préliminaire ne sera plus basée sur la comparaison de méthodes, mais sur une approche critère par critère.

AFNOR validation of Premi[®]Test, a microbiological-based screening tube-test for the detection of antimicrobial residues in animal muscle tissue

Valérie Gaudin*, Murielle Juhel-Gaugain, Jean-Pierre Morétain and Pascal Sanders

Community Reference Laboratory, AFSSA Fougères–LERMVD, La Haute Marche, BP 90203, 35302 Fougères Cedex, France

(Received 14 January 2008; final version received 22 August 2008)

Premi[®]Test contains viable spores of a strain of *Bacillus stearothermophilus* which is sensitive to antimicrobial residues, such as beta-lactams, tetracyclines, macrolides and sulphonamides. The growth of the strain is inhibited by the presence of antimicrobial residues in muscle tissue samples. Premi[®]Test was validated according to AFNOR rules (French Association for Normalisation). The AFNOR validation was based on the comparison of reference methods (French Official method, i.e. four plate test (FPT) and the STAR protocol (five plate test)) with the alternative method (Premi[®]Test). A preliminary study was conducted in an expert laboratory (Community Reference Laboratory, CRL) on both spiked and incurred samples (field samples). Several method performance criteria (sensitivity, specificity, relative accuracy) were estimated and are discussed, in addition to detection capabilities. Adequate agreement was found between the alternative method and the reference methods. However, Premi[®]Test was more sensitive to beta-lactams and sulphonamides than the FPT. Subsequently, a collaborative study with 11 laboratories was organised by the CRL. Blank and spiked meat juice samples were sent to participants. The expert laboratory (CRL) statistically analysed the results. It was concluded that Premi[®]Test could be used for the routine determination of antimicrobial residues in muscle of different animal origin with acceptable analytical performance. The detection capabilities of Premi[®]Test for beta-lactams (amoxicillin, ceftiofur), one macrolide (tylosin) and tetracycline were at the level of the respective maximum residue limits (MRL) in muscle samples or even lower.

Keywords: validation; Premi[®]test; screening; antimicrobial residues; muscle; collaborative study; routine analysis

Introduction

Animal treatment can lead to the presence of residues in food of animal origin. The presence of antimicrobial residues could lead to human health and safety risks, such as allergies or toxicity, when foodstuffs containing residues enter the food chain. Different families of antimicrobial residues are concerned: beta-lactams, sulfonamides, macrolides, tetracyclines, quinolones, etc. For these reasons, maximum residue limits (MRL) were set for many antimicrobial residues to protect consumer safety (EEC Directive 2377/90 and amendments). Different methods have been developed for the detection of antimicrobial residues in food of animal origin. These screening methods are usually microbiological, based on the inhibition of bacterial growth by antimicrobial residues. Microbiological plate tests generally give results in 18–24 h; however, they require skilled technicians with specific training. Microbiological-based tests are an interesting screening step because they are capable of detecting a wide range of antimicrobial residues (several families of antimicrobials are detectable with one single method). The levels of detection are also generally satisfactory

with respect to European regulations (EEC, 1990) for beta-lactams, tetracyclines and macrolides (detection capabilities lower or equal to the MRL). The best detected class of compound is generally the beta-lactam family. The detection capabilities of sulphonamides are very variable, depending on the sulphonamide structure. Using microbiological-based tests, the least detected antibiotics are generally some sulphonamides, aminoglycosides and quinolones. None of the existing microbiological screening methods are capable of detecting all MRL substances in animal matrices. Therefore, some countries have implemented other methods in parallel to specifically detect these antimicrobials. In France, the official method for the control of muscle samples is the four plate test (FPT) (Bogaerts and Wolf 1980). In the past, some commercial tube-tests were available but only for the analysis of milk, such as Delvotest[®], or, more recently, the COPAN[®] test. These tests are based on the detection of growth by production of acid, visible by a colour change in the test medium (pH indicator). More recently, the Premi[®]Test, a commercial growth-inhibitor test, was developed by DSM Food

*Corresponding author. Email: v.gaudin@fougères.afssa.fr

Specialities R&D (Delft, The Netherlands) for the detection of antimicrobial residues in muscle. The test is based on inhibition of the *Bacillus stearothermophilus* strain and allows the detection of antimicrobial residues in muscle in less than 4 h (Fabre 2003a,b; Fabre et al. 2004; Stead 2004).

Over the last few years, several evaluations of the Premi®Test have been published, based on spiked meat juice samples (Reybroeck 2000a) or incurred poultry muscles (Reybroeck 2000b). Premi®Test has generally been compared to a reference method, focussing on a family of antimicrobials, such as beta-lactams, using spiked meat juice samples and incurred poultry muscle samples (Popelka et al. 2005) or tetracyclines (Okerman et al. 2004). The detection limits for various antimicrobials, calculated in spiked juice samples, were similar in the different studies. The overall conclusion of these studies was that Premi®Test is unsuited to the detection of tetracyclines at MRL level in spiked and incurred samples. Premi®Test was very sensitive for the screening of beta-lactams, more than the usual microbiological plate tests. Premi®Test was suitable for the detection of beta-lactams and sulphonamides at MRL level or even below.

The AFNOR validation is based on a comparison between a reference and the alternative method. In the present study, the Premi®Test, i.e. the alternative method, was compared with two other microbiological methods: the French Official method (four plate test, FPT) which was the reference method, and the STAR protocol (the CRL protocol) (Gaudin et al. 2004). Thereafter, an interlaboratory study was organised, in which only the Premi®Test was used to analyse spiked meat juice samples. This paper presents the results of preliminary and collaborative studies.

Materials and methods

Presentation of the methods

Principle of the kit

The Premi®Test allows the detection of antimicrobial residues in fresh meat, kidneys, fish and eggs (Arts et al. 2000). The Premi®Test is based on the growth inhibition of *Bacillus stearothermophilus*, in which standardised spores are included in a medium with selected nutrients. The meat juice is placed in ready-to-use tubes and, after 20 min of pre-diffusion at room temperature, the meat juice was removed by three washing steps. Finally, the ampoule was incubated for approximately 3 h at 64°C. The reading of the 'yes/no' result was based on a colour comparison. Without antimicrobials, the spores germinate and develop, involving acidification of the medium and a change of colour (yellow). Conversely, in the presence of antimicrobials, bacterial growth is inhibited and a purple colour indicates the presence of antibiotics at or

above the detection limit of the test. Doubtful and positive samples were confirmed by the multi-residue LC/MS-MS method described below. This broad-spectrum test makes it possible to detect a large number of antimicrobials in less than 4 h in muscle juice samples (extracted by pressing a piece of meat).

Principle of the four plate test (FPT)

The four plate test is the French Official method for monitoring muscle samples (Bogaerts and Wolf 1980). A microorganism, sensitive to antibacterial substances, is inoculated into an agar medium in a Petri dish. The following test organisms are used: *Bacillus subtilis* BGA (reference 10649; Merck, Nogent-sur-Marne, France) (in test agar pH 6.0, Merck), *Bacillus subtilis* BGA (reference 10649, Merck) (in test agar pH 8.0, Merck), *Bacillus subtilis* BGA (reference 10649, Merck) (in agar ASS pH 7.4, Merck) and *Kocuria varians* (ATCC 9341, Pasteur Institute) (in test agar pH 8.0, Merck). Slices of frozen muscle were placed on the surface of the inoculated medium and incubated at the optimal temperature for growth of the test organism. After diffusion, the antibacterial substance should produce an inhibition zone around the sample by inhibiting the growth of the test organism.

Principle of the STAR protocol and *Bacillus cereus*

The STAR protocol is the CRL method (Gaudin et al. 2004), which was developed to improve the performance of the FPT, and the detection principle is the same. The following test organisms are used: *Bacillus subtilis* BGA (reference 10649, Merck) (Antibiotic medium II at pH 8.0, Difco, Detroit, MI, USA), *Kocuria varians* ex. *Micrococcus luteus* (ATCC 9341, Pasteur Institute) (in test agar at pH 8.0, Merck), *Bacillus cereus* Bc6 (ATCC 11778, Pasteur Institute) (in test agar at pH 6.0, Merck), *Escherichia coli* (ATCC 11303, Pasteur Institute) (in test agar at pH 8.0, Merck), *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 10149, Merck) (in DST (Diagnostic Sensitive Test) medium; Oxoid, Basingstoke, UK). The *Bacillus cereus* used by field laboratories at the 3rd step of the preliminary study is plate Bc6 of the STAR protocol, which is selective for the detection of the tetracycline family. Muscle sample slices of 2 mm in thickness were cut from frozen muscle and placed on the plates.

LC/MS-MS method

A multi-residue LC/MS-MS method was developed for the screening of antimicrobials in meat. The principle is based on two different extractions: one with trichloroacetic acid (TCA), allowing the detection of tetracyclines, aminoglycosides and quinolones; the second with acetonitrile (ACN), allowing the detection of

penicillins, cephalosporins, macrolides and sulfonamides. TCA extracts are directly injected after ultracentrifugation and filtration. ACN extracts are evaporated and the residue is then dissolved in 0.6 ml of ammonium acetate before filtration and injection. Two different gradients with pentafluoropropionic acid and ACN are used for the LC analyses. LC/MS-MS is used in multi-reaction monitoring mode (MRM) and two MRM transitions are monitored for each compound. Identification of the detected compounds is based on retention time and the presence of the two specific transitions. Quantitative determination was carried out using calibration curves obtained with spiked samples at 0.5, 1 and 1.5 MRL levels. Internal standard were used for the quantification. All 50 monitored compounds, except some aminoglycosides, were detected at a level below the MRL.

Principle of AFNOR (French Association for Normalisation) validation

Any alternative method should be compared with a reference method. A reference method could be a standardised method, if it exists, an official method or a widely known and used method, taken in reference. An alternative method is a commercial test allowing analysis of, for a category of products given, the same analytes as that measured by the reference method, but presenting one or more of the following criteria: speed of analysis, ease of execution and/or automation, analytical performances (limit of detection, specificity, etc.). A specific guide for validation of alternative methods for the detection of antimicrobial residues in foodstuffs of animal origin is available (Anon. 2005a). It defined the requirements relating to the organisation of preliminary and collaborative studies carried out by one expert laboratory. This document establishes the general principle as well as the technical protocol for the validation of alternative methods for the detection of antimicrobial residues in foodstuffs of animal origin.

Preliminary study

The preliminary step are divided into three parts.

Step 1. Analysis of blank and spiked meat juice samples

Porcine muscles was used from practical experience. The absence of antimicrobial substances in these pig samples, assumed as blank materials, was checked via FPT and the STAR protocol. The negative results confirmed that these pig samples could be used to prepare blank meat juices.

Muscle samples were pressed through a garlic press. Thereafter, meat juice samples were spiked with known

concentrations of six different antimicrobials: sulfamethazine (sulphonamides), oxytetracycline (tetracyclines), tylosin (macrolides), amoxicillin (penicillins), ceftiofur (cephalosporins) and gentamicin (aminoglycosides). Each antimicrobial was spiked at three concentrations: sulfamethazine (50, 100, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), oxytetracycline (50, 100, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), tylosin (50, 100, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), amoxicillin (25, 50, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), ceftiofur (100, 200, 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and gentamicin (50, 100, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Five aliquots (five combinations of sample/antimicrobial/concentration) were prepared "blind to the technician" and analysed in duplicate only with the Premi[®]Test. The aliquots were stored in a freezer (approximately -20°C) before analyses. Blank meat juice and spiked meat juice samples were analysed in duplicate only with the Premi[®]Test.

Step 2. Treatment of animals and analysis of incurred porcine muscle samples

Two untreated pigs were slaughtered before the treatments of three other pigs. These pigs were supplied by a farm guaranteeing that the pigs did not receive prior antimicrobial treatments. Moreover, the absence of antimicrobials in muscle samples was checked with the FPT and STAR protocol.

Three pigs were treated, one each with tylosin, amoxicillin and a oxytetracycline/sulfadimethoxine mixture, and slaughtered. Each material was analysed by a multi-residue LC/MS-MS method to quantify antimicrobials. The following concentrations were obtained: tylosin $750.9 \pm 76.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (material 1), amoxicillin $269.5 \pm 18.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (material 2), oxytetracycline $764.9 \pm 44.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ and sulfadimethoxine $151.1 \pm 13.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (material 3).

Afterwards, five pieces of each material (blank and treated animals) of approximately 20 g were (five combinations of sample/antimicrobial/concentration) prepared "blind to the technician" and analysed in duplicate using three methods: Premi[®]Test, STAR protocol and FPT. These samples were stored in freezer at approximately -20°C before analyses.

Step 3. Analysis of field samples

This step allowed a comparison of the Premi[®]Test, STAR protocol and FPT in "naturally" incurred samples for a wide number of antimicrobials and matrices of different origins (e.g. different species). The samples came from a pilot study on the implementation of a new screening method for antimicrobial residues in meat (Anon. 2005b). The samples were sent regularly to laboratories from the French veterinary services (official control). Six field veterinary laboratories (LVD or "Laboratoire Vétérinaire Départemental" in French) were trained in the

implementation of the Premi[®]Test and one plate *Bacillus cereus* (for detection of tetracyclines) (STAR protocol), analyzing 1427 field samples over a period of 4 months. All their positive samples (with Premi[®]Test and/or *Bacillus cereus*) were sent frozen to the CRL every 15 days. All sample characteristics (species, reception date, analysis date, dispatch date, etc.), as well as the results obtained with Premi[®]Test and *Bacillus cereus*, were also sent to the CRL. All samples from the field laboratories where stored in the freezer upon arrival in our laboratory. Blind analyses were carried out at the CRL with the Premi[®]Test, FPT and STAR protocol, including the *Bacillus cereus* plate. Finally, the positive samples from at least one of these methods were analyzed by the multi-residue LC/MS-MS method (systematic screening, then identification and quantification). Doubtful Premi[®]Test samples were also tested by LC/MS-MS.

Interlaboratory study

Eleven laboratories were contacted to participate to this inter-laboratory study, including the six field laboratories which had already participated to step 3 of the preliminary study. When an AFNOR validation is implemented, an expert laboratory is designated by the AFNOR Technical Office. The expert laboratory performs the intra-laboratory validation and organised the inter-laboratory study. Moreover, during the inter-laboratory study, the results of the expert laboratory are not included with the participants' results, but these results are considered as the reference results (to be obtained by the participants). In this case, the Community Reference Laboratory (CRL) was considered the expert laboratory.

Spiked muscle juice samples were used for the interlaboratory study instead of incurred samples, for several reasons. Firstly, it is very difficult to prepare raw muscle with a target concentration of each antimicrobial owing to the individual variability of animal pharmacokinetic (depletion of the antibiotic in tissues). Moreover, the use of raw pieces of meat did not allow mincing of meat to adjust the concentration. Secondly, the study was based on several animal

species and, therefore, treatment would need to be performed in each species. This would have been very expensive, time-consuming and impossible to implement in our laboratory. Thirdly, when producing incurred muscles and sending raw muscle samples (pieces of meat), it is very difficult to ensure homogeneity of the samples, which is basic when organising a collaborative study.

Preparation of the materials

Porcine, bovine and chicken muscles were pressed. Blank meat juice samples (negative controls and blank unknown samples) were prepared. Furthermore, spiked samples were prepared with four different antibiotics at three concentrations. Oxytetracycline and ceftiofur were added to porcine meat juice samples, sulfamethazine to bovine meat juice samples and, finally, tylosin to chicken meat juice samples. Table 1 presents the content of the 16 combinations.

A stability study was carried out on materials before sending the samples and over the period of analyses by the participants. The samples were analysed with the Premi[®]Test at the CRL. Material stability was proven over the period of analyses. A random codification of the materials was performed and each laboratory was identified by a code (from A to P).

Dispatch of materials

One negative control from each species was sent and one positive control containing penicillin G at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. A total of 32 different frozen meat juice samples (16 materials in blind duplicate: spiked and blank samples) were sent under frozen conditions (dried ice) to the participants to ensure stability of matrix and analyte. The samples were stored in a freezer upon arrival. Eleven laboratories received parcel instructions and a results form. The participants had no information about the antibiotics contained in the materials.

Because it is recommended to test one negative control from each analysed species, each laboratory received a table indicating the species origin of each sample, according to a sample code (1–32), to compare

Table 1. Interlaboratory study: Content of the 16 materials sent in blind duplicates.

Antimicrobial	Level of contamination	Porcine	Bovine	Porcine	Chicken
		Oxytetracycline	Sulfamethazine	Ceftiofur	Tylosin
MRL	–	100	100	1000	100
Spiked concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	L0	Blank	Blank	Blank	Blank
	L1	20	20	40	10
	L2	200	200	400	100
	L3	400	400	800	200

the results of each sample with the negative control of the corresponding species. All analyses were carried out in blind duplicate (two different series of analyses) with Premi®Test only. Analyses were performed within 1 week maximum after receiving samples. A negative control for each species, a positive sample (spiked with penicillin G at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$) and coded materials were analysed. All results were returned rapidly and compiled at the CRL.

Results and discussion

Preliminary study

Step 1. Analysis of blank and spiked meat juice samples

Among the 20 blank meat juice samples analysed in duplicate, only one meat juice was positive twice and four other meat juices were "doubtful" in one of the two replicates and negative in the other. A total of 15 meat juices were negative twice. The false positive rate is the number of positive results for blank samples (free of antibiotic substances) divided by the total number of positive samples (the same number plus the number of contaminated samples showing positive results) and multiplied by 100: $18\% (=6/(6+27)100)$ of results were false positive. The result was satisfactory because the false positive rate should be minimal for a screening method, since the samples declared positive should be confirmed by a physicochemical method for identification and quantification.

The detection limit corresponded to the lowest concentration which gave a positive or a doubtful result for each of the five replicates. Table 2 presents the determination of limits of detection of Premi®Test for the six antimicrobials tested.

The study of spiked pig meat juice samples showed that, for five molecules belonging to four different classes of antibiotics, the detection limit of Premi®Test was at a level of one or two MRL maximum. For only one antibiotic (gentamicin), the detection limit was two times higher than the MRL (40% of positive results at $2 \times \text{MRL}$). The false negative rate corresponds to the number of negative results obtained for contaminated samples (spiked samples) divided by the total number of negative samples (the same number plus the number of blank samples giving a negative result) and multiplied by 100. The false negative rate calculated at $1 \times \text{MRL}$ was $22\% (=10/(10+34)100)$. However, the false negative rate calculated at twice the MRL was $8\% (=3/(3+34)100)$.

Step 2. Treatment of animals and analysis of incurred porcine muscle samples

Concentrations in naturally incurred samples were much higher than the respective MRL of the four

antimicrobials (from 1.5 to $7.6 \times \text{MRL}$). However, the analyses of incurred materials with known antimicrobial concentrations was of significant interest. Table 3 summarises the results of step 2.

Data exploitation was carried out according to the reference document of AFNOR validation (Anon. 2005a). Exploitation is based on a comparison of two methods: the reference method and the alternative method. The FPT was set as the reference method and the Premi®Test as the alternative method.

Three different parameters were calculated which allowed a comparison of reference and alternative method: relative accuracy ($AC = (PA + NA)/N \times 100\%$), relative specificity ($SP = (NA/N-) \times 100\%$), relative sensitivity ($SE = (PA/N+) \times 100\%$), where NA is the negative agreement (negative result obtained with both methods), PA is the positive agreement (positive result obtained with both methods), ND is the negative discrepancy (positive result obtained with reference method and negative result with alternative test), PD is the positive discrepancy (negative result obtained with reference method and positive result with alternative test); $N = NA + PA + PD + ND$ is total number of samples; $N-$ is the total number of negative samples obtained with the reference method ($NA + PD$); $N+$ is the total number of positive samples obtained with the reference method ($PA + ND$).

Relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity were calculated as 70, 42.9 and 84.6%, respectively. Relative accuracy and specificity were satisfactory, but the low relative specificity value could be explained because the sensitivity of the FPT was sometimes insufficient for certain antibiotics.

In conclusion, FPT and Premi®Test gave similar results for performance characteristics (relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity). However, at this step, the false negative and the false positive rates were lower for the Premi®Test (both 0%) than for FPT (33 and 40%, respectively).

Step 3. Analysis of field samples

A total of 1427 field incurred samples, from six French field veterinary laboratories, were analyzed via Premi®Test and *Bacillus cereus* plate, of which, 1325 were negative, and 102 samples doubtful (36) and positive (66) with the Premi®Test.

Among the 1325 negative results, 10 samples were positive with the *Bacillus cereus* plate. Therefore, 112 muscle samples were sent to the CRL for confirmation. The correlation between the Premi®Test results from LVD and AFSSA was examined (Table 4). A total of 76% of the samples (78/102) found positive or doubtful with Premi®Test in the LVD were found positive or doubtful with Premi®Test at the CRL. A total of 24 samples were positive or doubtful at the

Table 2. Results of Premi®Test analyses on spiked juice samples (step 1).

Antibiotic family	Sulphonamide		Tetracycline		Macrolide		Beta-lactam		Aminoglycoside		Beta-lactam	
	Sulfamethazine		Oxytetracycline		Tylosin		Amoxicillin		Gentamicine		Ceftiofur	
MRL (muscle, $\mu\text{g kg}^{-1}$)	100	100	100	100	100	100	50	50	50	50	1000	1000
Tested concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	50/100/200	50/100/200	50/100/200	50/100/200	50/100/200	50/100/200	25/50/100	25/50/100	50/100/200	50/100/200	100/200/400	100/200/400
Detection rate at 0.5 MRL	0%	60%	60%	80%	80%	80%	100%	100%	0%*	0%*	—	—
Detection rate at MRL	20%	80%	80%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	(100%)	(100%)
Detection rate at 2 × MRL	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	40%	40%	(100%)	(100%)
Detection capability	2 × MRL	2 × MRL	2 × MRL	2 × MRL	MRL	MRL	0.5 × MRL	0.5 × MRL	> 2 × MRL	> 2 × MRL	0.5 × MRL	0.5 × MRL

*MRL in bold character in tested concentrations.

Percentage is between brackets when no were analyses performed at this concentration, i.e. all the tested concentrations for ceftiofur were below MRL and even 0.5 MRL. At $400 \mu\text{g kg}^{-1}$, 100% of the results were positive or doubtful.

LVD and negative at AFSSA. This could be due either to false positive results from the field laboratories or to antibiotic instability between the two analyses, although the recommended storage and transport conditions were strictly respected. Among the 10 samples negative with Premi[®]Test and positive with *Bacillus cereus* in the field laboratories, six were positive or doubtful with Premi[®]Test at the CRL and confirmed positive with *Bacillus cereus*. The four other samples were positive only on plate Bc6. Finally, the presence of a tetracycline was confirmed by LC/MS-MS in nine of these samples. Therefore, *Bacillus cereus* plate (one plate of the STAR protocol, which is selective for the detection of tetracyclines) is more sensitive for tetracyclines than Premi[®]Test.

The false positive rate in the field laboratories was occasionally high, mainly at the beginning of the study. Thereafter, with reading experience, most of the positive results with Premi[®]Test at the field laboratories were confirmed positive with Premi[®]Test at the CRL.

Many animal species were studied in step 3 because samples were from field laboratories, while the first two steps were based only on pig muscle. The distribution of species samples is presented in Table 4.

The confirmatory rate of the LC/MS-MS method (number of samples really containing antimicrobial residues divided by the number of tested samples (positive screening) multiplied by 100) was 41% (25/61). The confirmatory rate varied between species and there were more false positive results in some species (37% for bovine samples compared to 75% for poultry samples).

The results of the comparative analysis between the alternative method (Premi[®]Test) and the reference method (FPT) are presented in Table 5.

When data analysis was based only on the 112 samples reanalysed in the expert laboratory, relative accuracy (33.9%) and relative specificity (33.4%) were very low. Only relative sensitivity (70%) was satisfactory, as in the first step of the validation study. However, in this case, Premi[®]Test negative samples (1315 negative/1427 analyzed samples) obtained in the field laboratories were not taken into account. Only the positive samples in the field laboratories were reanalysed at the CRL with Premi[®]Test and FPT. None of the 1315 negative samples was analysed with the FPT. From experience (a previous study in 2005; data not shown), all samples which were declared negative with Premi[®]Test and negative with

Table 3. Analyses of naturally incurred samples with the three screening methods (step 2).

Antibiotic				Global results of			
	OTC/SDMX	Amoxicillin	Tylosin	incurred samples	Blank	Fp+ (%)	Fp- (%)
MRL (pig muscle) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100/100	50	100	–	–	–	–
Concentrations by LC/MS-MS ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	760/150	270	750	–	–	–	–
Number of positive results with Premi [®] Test	5/5	5/5	5/5	15/15	0/5	0	0
Number of positive results with STAR	5/5	5/5	5/5	15/15	3/5	60	0
Number of positive results with FPT	5/5	4/5	1/5	10/15	2/5	40	33

Fp+: false positive rate; Fp-: false negative rate; OTC: oxytetracycline; SDMX: sulfadimethoxine.

Table 4. Correlation between field laboratories and AFSSA: comparison of the three screening tests and LC/MS-MS method in relation to the species (step 3).

Species		Bovine	Porcine	Poultry	Others	Unknown	Total
LVD	Number of samples analysed at LVD ^b	379	671	205	26	146	1427
	Number of positive and doubtful results at LVD Premi [®] Test	63	26	1	5	7	102
AFSSA	Number of samples analysed at AFSSA	65	31	4	5	7	112 ^a
	Number of positive and doubtful results with Premi [®] Test	45	19	2	5	7	78
	Correlation LVD/AFSSA (%)	69	61	50	100	100	76
	Number of positive samples with FPT	3	5	2	0	0	10
	Number of positive samples with STAR	13	13	4	0	2	32
AFSSA	Number of tested samples	38	18	4	1	0	61
LC/MS-MS	Number of positive samples (identified molecule)	14	8	3	0	0	25
	Rate of positive confirmation (%)	37	44	75	0	–	41

^aTotal of samples sent to AFSSA for confirmation.

^bLVD is Laboratoire Vétérinaire Départemental in French, which is a field veterinary laboratory.

Bacillus cereus were also all negative with the FPT (28 samples). Therefore, it was assumed that the 1315 samples, found negative with both Premi[®]Test and *Bacillus cereus*, would have also been negative with the FPT. In this case, the agreement (94.8% relative accuracy and 95% relative specificity) between the results of Premi[®]Test and FPT was very satisfactory. The two methods were different by a statistical test owing to a high rate of positive deviation (Premi[®]Test+/FPT-), which may be caused partially by false positive results of the Premi[®]Test and/or by the lack of sensitivity of the reference method towards some antimicrobial residues.

The agreement (relative accuracy) between the results of Premi[®]Test and STAR was 42.99%, relative specificity 31.3% and relative sensitivity 71.9%. Therefore, it is similar to the comparison of the

FPT with Premi[®]Test. Agreement between the FPT and STAR protocol was higher (70%; data not shown). Only one sample was negative with the STAR protocol and positive with the FPT. The absence of antimicrobial residues in this sample was confirmed by LC/MS-MS.

The results obtained in the field laboratories, and then at the CRL, with the Premi[®]Test, FPT, STAR protocol and the confirmatory method by LC/MS-MS are compared in Table 6. The number of positive results with the Premi[®]Test (78) was much higher than the number of positives with the multi-plate tests (FPT: 10; STAR: 31 samples). Among the 112 samples analysed at the CRL, only the positive or doubtful samples with one of the screening methods (Premi[®]Test, FPT or STAR) were confirmed by LC/MS-MS (88 samples).

Table 5. Correlation between Premi[®]Test and FPT (step 3).

	1st analysis (112 samples)	2nd analysis (1427 samples)
Relative accuracy AC (%)	33.9	94.8
Relative specificity SP (%)	30.4	95.0
Relative sensitivity SE (%)	70.0	70.0

Relative accuracy: $AC = (PA + NA)/N \times 100\%$.

Relative specificity: $SP = (NA/N-) \times 100\%$.

Relative sensitivity: $SE = (PA/N+) \times 100\%$.

NA is the negative agreement; PA is the positive agreement; ND is the negative discrepancy; PD is the positive discrepancy.

$N = NA + Pa + PD + ND$ is total number of samples.

$N-$ is the total number of negative samples obtained with the reference method ($NA + PD$).

$N+$ is the total number of positive samples obtained with the reference method ($PA + ND$).

Table 6. Identification of positive samples with LC/MS-MS at AFSSA: comparison of Premi[®]Test, FPT and STAR protocol in 2005 (step 3).

Identified AB family	Quantification/MRL	Number of analysed samples	Premi [®] Test results			FPT results		STAR results	
			-	D	+	-	+	-	+
MACRO	<MRL	1		1			1		1
SULFA	<MRL	1		1		1		1	
TTC	<MRL	10	4	3	3	6	4	2	8
TTC	>MRL	2	1		1		2		2
BL	<MRL	10		2	8	10		7	3
BL	>MRL	2			2	1	1		2
TTC+SULFA	<MRL	1			1		1		1
BL+sulfa	>MRL	1			1	1		1	
MACRO + TTC + BL	<MRL	1			1	1		1	
TTC + BL	<MRL	1			1	1		1	
AMINO + BL	<MRL	1			1	1		1	
Global	<LMR	26	4	7	15	20	6	13	13
	>LMR	5	1	0	4	2	3	1	4
	Total	31	5	7	19	22	9	14	17
Absence		57	5	8	44	56	1	43	14
Not analysed		24	24			24		24	
Total		112	34	15	63	102	10	81	31

D: doubtful.

After confirmatory analyses, 31 samples really contained antimicrobial residues (35% of the confirmed samples) at different levels (26 samples at concentrations lower than the respective MRLs and five only at concentrations higher than the respective MRLs).

False positive rates for the FPT, Premi®Test and STAR protocol were 3% ($(1/(1+31)) \times 100$), 62% ($(52/(52+31)) \times 100$) and 31% ($(14/(14+31)) \times 100$), respectively. The false positive (rate of each method was calculated as the number of positive results for blank samples (free of antibiotic substances) divided by the total number of positive samples (the same number plus the number of contaminated samples showing positive results) and multiplied by 100.

A total of 52 samples were Premi®Test positive or doubtful, but no antibiotic residue could be identified when analyzed by LC/MS-MS. However, a false-positive result could be due to degradation of the antimicrobials initially contained in the sample (too long a delay before analysis by LC/MS-MS, very unstable molecules, etc.). Furthermore, it could be false compliant results of the confirmatory method. The antimicrobial present in the sample may not be detected and identified by the multi-residue LC/MS-MS method if the molecule is not present in the spectrum of detection of the method (metabolites, etc.), or sensitivity may be insufficient.

After a positive result with Premi®Test, the presence of antimicrobial residues was confirmed in 26 samples (33%), of which four samples contained antimicrobials at concentrations higher than the MRL. Three of the 10 positive FPT samples and four of the STAR positive samples were at concentrations greater than the MRL. Premi®Test and STAR screened positive 22 and 13 samples, respectively, which actually contained antimicrobial compounds at concentrations lower than the MRL. The FPT detected only six of these samples. Therefore, the sensitivity of Premi®Test and STAR protocol was lower than the FPT.

The highest confirmatory rate was obtained for the FPT (90%). The false negative rates of the FPT, Premi®Test and the STAR protocol were 8, 28 and 20%, respectively. The false negative rate was calculated as the number of false negative results divided by the total of the true negative samples plus the number of false negative results for each method.

The most common antimicrobial classes detected during this pilot study were beta-lactams (penicillin and amoxicillin) (15 samples) and tetracyclines (doxycycline, tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline) (15 samples). Premi®Test (12 positive samples) was much more sensitive for the detection of beta-lactams than the FPT (one positive sample) and the STAR protocol (five positive samples), even too sensitive in some cases (10 positive samples confirmed at concentrations lower than MRL). Premi®Test was

also more sensitive for the screening of sulphonamides than the two other methods (FPT and STAR failed to detect one sample at a concentration higher than the MRL). Finally, Premi®Test was less sensitive than the FPT, and especially the STAR protocol, for the detection of tetracyclines. Therefore, this study has demonstrated the capability of Premi®Test to detect samples at the MRL level for sulphonamides and beta-lactams, but not for tetracyclines. These conclusions have confirmed the results of different teams over recent years (Reybroeck 2000a,b; Okerman et al. 2004; Popelka et al. 2005).

Table 7 presented the combined results of a previous study carried out in 2003 and 2004 (64 samples actually containing antimicrobial residues) with the pilot study.

After the confirmatory analyses of positive samples, 31 samples contained antimicrobial residues at concentrations lower than the respective MRLs and 33 samples at concentrations higher than the respective MRLs. The total number of positive samples reported with Premi®Test (52) was higher than with FPT (38). However, the number of samples detected positive with Premi®Test (26) or FPT (25), which really contained antimicrobial compounds at concentrations higher than MRL, was identical. Moreover, six false negative results were obtained with Premi®Test and seven with FPT.

The presence of beta-lactams was confirmed in 17 samples by the LC/MS-MS method. All 17 samples were positive or doubtful with Premi®Test, while only seven samples were detected positive with the FPT (1 < MRL and 6 > MRL). Therefore, the detection capability of Premi®Test for beta-lactams was better than FPT. Sensitivity was also lower for sulphonamides (four positive Premi®Test samples, four negative FPT samples). Two of these samples actually contained sulphonamides at concentrations higher than the MRL, which the FPT failed to detect but Premi®Test succeeded in detecting. However, the sensitivity of FPT for tetracyclines was better (15 doubtful or positive samples with Premi®Test compared to 19 positive samples with FPT).

The most detected antimicrobials were tetracyclines (25 samples) and beta-lactams (17 samples), followed by macrolides (6), sulphonamides (4), quinolones (3) or a mix of antimicrobials (8).

Collaborative study

Results of the expert laboratory

The expert laboratory obtained only one false positive result for the two series of analyses on white chicken sample (code 10), whereas the same sample (code 27) was found negative for the two series. The L1 concentration was selected to give negative results

Table 7. Identification of positive samples with LC/MS-MS at AFSSA: comparison of alternative (Premi®Test) and reference method (FPT) from 2003 to 2005 (step 3).

Identified AB family	Quantification/MRL	Number of analysed samples	Premi®Test results			FPT results	
			-	D	+	-	+
Beta-lactams	< MRL	9		1	8	8	1
	> MRL	8			8	2	6
	Sum	17					
Tetracyclines	< MRL	13	5	4	4	6	8
	> MRL	12	5	1	6		11
	Sum	25					
Sulphonamides	< MRL	2		1	1	2	
	> MRL	2			2	2	
	Sum	4					
Quinolones BL + Sulfa	> MRL	3	1		2		3
	< MRL	2			2	1	1
	> MRL	2			2	2	
Tetra + Sulfa	Sum	4					
	< MRL	1			1		1
	> MRL	3			3		3
Tetra + BL Macrolides	Sum	4					
	< MRL	1			1	1	
	< MRL	3	1	1	1	1	2
Global	> MRL	3			3	1	2
	Sum	6					
	< MRL	31	6	7	18	19	13
Total	> MRL	33	6	1	26	7	25
	Sum	64	12	8	44	26	38

D: Doubtful.

MRL: Maximum Residue Limit.

Sum: sum of samples confirmed lower and higher than respective MRLs.

(Table 1). The expert laboratory did not obtain any false negative result because the L3 concentration was designed to give positive results, whereas the L2 concentration was at the limit of sensitivity of the test.

It should be noted that later analyses were carried out assuming doubtful results as positive results, as applied at the time for routine analyses.

The results of the expert laboratory were very satisfactory (Table 8): 14 blank samples of 16 were negative (only two positive results for chicken samples) (L0). Below the assumed limit of detection, 14 samples of 16 were negative (L1). At the assumed limit of detection, all samples were positive (L2). Above the assumed limit of detection, all samples were positive (L3).

Results of the participants

Before the study, the expert laboratory stated that the results of one laboratory would be ignored if the negative control was detected positive, the positive control was detected negative, if samples were in bad condition at reception, or if a storage problem was established. Two laboratories were eliminated from analysis of the results: Laboratory L for several reasons: parcel delivery was delayed, samples were defrosted and chicken negative controls were detected

positive for the two series of analyses; Laboratory H because chicken negative controls were detected positive for the 1st series of analyses. The raw data of the participants for the 16 combinations are presented in Table 9. Each participant received 32 samples (16 materials in blind duplicate) that they analysed in two different series.

The results were homogeneous between laboratories, as analysed and summarised in Table 10. Concerning negative samples (L0) (16 by laboratories corresponding to three different species), four laboratories reported 100% negative results, five laboratories found one or two samples doubtful or positive, sometimes in only one series of analyses (laboratories M and N).

For the samples containing antibiotics at a concentration below the detection limit (L1), six laboratories found 100% negative results; three laboratories found one or two samples doubtful or positive. When the concentration was considered near the detection limits (L2), tylosin was generally detected (83% of positive results), whereas the other antibiotics were less detected (oxytetracycline 11%; ceftiofur 11%; sulfamethazine 17%).

The average rate of positive samples for the L3 concentration was 81%. The rate of detection at the L3 concentration was 100% for four antibiotics and for

Table 8. Number of positive results from the expert laboratory (AFSSA) during interlaboratory study.

Level of contamination	Oxytetracycline Porcine	Sulfamethazine Porcine	Ceftiofur Bovine	Tylosin Chicken
L0	0	0	0	2
L1	0	0	0	2
L2	4	4	4	4
L3	4	4	4	4

three laboratories (B, D, N). This rate was 100% for the totality of the laboratories concerning tylosin and ceftiofur.

The results of the participating laboratories were analyzed to calculate different validation parameters. A laboratory was removed from the analysis due to a delay in transport and samples arriving in defrosted conditions.

Table 10 also presents analysis of the results of all the participating laboratories in term of reproducibility, by material (combination animal/antibiotic species) and globally. The reproducibility, expressed as a percentage, is the ratio of the number of identical results, the most common type (e.g. negative results for blank samples or positive result for samples contaminated with an antimicrobial concentration exceeding the detection limit), to the total number analysed.

The results of the participating laboratories in term of reproducibility are very satisfactory, with an average of 89.1%. The worse reproducibility was observed for the bovine/sulfamethazine combination. A slightly higher concentration of sulfamethazine would undoubtedly have given better results in term of reproducibility.

The percentage specificity (SP) for levels L0 and L1 was calculated as: $SP = [1 - (FP/N-) \times 100\%]$, where N-: is total number of tests L0 and L1, and FP is number of false positive results. The percentage sensitivity (SE) for each positive contamination level L2 and L3 was calculated using the following equation: $SP = (TP/N+) \times 100\%$, where: N+ is total number of tests L2 or L3, respectively, and TP is number of true positives.

Specificity (953%) and sensitivity (72.5%) of the Premi®Test to the L3 level were very satisfactory.

Repeatability was estimated for each laboratory by (1) comparing the results of the two tests performed on each sample (two different sets of analyses), where knowledge of the initial result can influence the reading at the second analysis, and (2) comparing the results obtained with the two samples of each pair. Repeatability, expressed as a percentage, is the ratio of the number of identical results per couple of analyses on the total number of couples. Table 11 presents total analysis of the results of all the

participants obtained with the Premi®Test in term of repeatability.

The results of the participating laboratories in term of repeatability are very satisfactory with an average of 94.8% for the same sample and 92.7% per two identical samples (pair). The limits of detection of the Premi®Test during the preliminary study were confirmed by the collaborative study.

Conclusions

This paper presents a significant dataset on the performance of the Premi®Test for different samples: spiked meat juice samples, incurred samples and routine field samples (confirmed by a LC/MS-MS method). The detection capabilities of Premi®Test for beta-lactams (amoxicillin, ceftiofur), one macrolide (tylosin) and tetracycline were at the respective maximum residue limits (MRL) in muscle samples or even lower. Applicability of the test to different animal species was proven. Moreover, applicability of Premi®Test to routine analysis of samples was demonstrated. The FPT (reference method) and the Premi®Test showed comparable performances in term of sensitivity and specificity. The false negative rate of Premi®Test was always lower than that of the FPT. In a screening method for antibiotic residues, this is the most important parameter to minimise. On the other hand, the false positive rate of Premi®Test was, in step 3, higher than that of the FPT. This means that the number of samples requiring confirmation by physico-chemical methods would be higher if the laboratories used the Premi®Test alone. However, it also means that more actual positive samples would be detected because Premi®Test was more sensitive than FPT for some antimicrobials (beta-lactams and sulphonamides). Beta-lactams and some sulphonamides were satisfactorily detected at the MRL level by the Premi®Test.

To the best of our knowledge, this is the first time that an interlaboratory study, organised for the detection of antibiotics with Premi®Test, has been described. The results of the collaborative study were very satisfactory: nine laboratories were finally analyzed plus the expert laboratory. Specificity was

Table 9. Raw data of the participants for each material and 16 combinations.

Porcine oxytetracycline																
Lab	L0 (0)				L1 (20*)				L2 (200)				L3 (400)			
	Mat 1		Mat 5		Mat 2		Mat 6		Mat 3		Mat 7		Mat 4		Mat 8	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D	D	D
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Porcine ceftiofur																
Lab	L0 (0)				L1 (40)				L2 (400)				L3 (800)			
	Mat 9		Mat 13		Mat 10		Mat 14		Mat 11		Mat 15		Mat 12		Mat 16	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	+	D	+	+
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D	+	+
F	D	D	D	D	-	-	D	D	-	D	+	+	+	+	+	+
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Bovine sulfamethazine																
Lab	L0 (0)				L1 (20)				L2 (200)				L3 (400)			
	Mat 17		Mat 21		Mat 18		Mat 22		Mat 19		Mat 23		Mat 20		Mat 24	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	D	+	+	+	+
E	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	D
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D
M	-	D	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-
N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+	D	+
Chicken tylosin																
Lab	L0 (0)				L1 (10)				L2 (100)				L3 (200)			
	Mat 25		Mat 29		Mat 26		Mat 30		Mat 27		Mat 31		Mat 28		Mat 32	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	D	-	D	D	+	D	+
B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+	+	+	+
F	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	D	+	+	+	+
M	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	D	D	+	+	+	+
N	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+	+	+	+	+	+	+

A1: first analysis; A2: second analysis; Mat: material; L0, etc.: concentrations (ng ml⁻¹).

Table 10. Results of all participating laboratories in term of % positive results for each material and in term of reproducibility by material (combination animal/antibiotic species) and global reproducibility.

Material	Number of sample (number of the pair)	Level of contamination	False positive and true positive rates	Positive results for each material (%)	Reproducibility (%)
Porcine OTC	1	L0	FP0 a)*	0	100.0
	2	L1	FP1 b)	0	100.0
	3	L2	TP2 c)	11**	88.9***
	4	L3	TP3 d)	69	69.4
Porcine ceftiofur	5	L0	FP0 a)	11	83.3
	6	L1	FP1 b)	8	94.4
	7	L2	TP2 c)	17	88.9
	8	L3	TP3 d)	53	100.0
Bovine sulfamethazine	9	L0	FP0 a)	17	91.7
	10	L1	FP1 b)	6	91.7
	11	L2	TP2 c)	11	83.3
	12	L3	TP3 d)	100	52.8
Chicken Tylosin	13	L0	FP0 a)	0	100.0
	14	L1	FP1 b)	0	100.0
	15	L2	TP2 c)	83	83.3
	16	L3	TP3 d)	100	100.0
Total				100	89.1

FP: false positive rate.

TP: true positive rate.

a) False positive at level L0.

b) False positive at level L1.

c) True positive at level L2.

d) True positive at level L3.

*At each level of contamination, nine laboratories reported four results for two materials in blind duplicates. The total number of samples per level is $9 \times 4 = 36$ samples.

**TP2 c) = 4 TP/36 samples at level L2 $\times 100 = 11\%$.

***Reproducibility at L2 = 32 negative results divided by 36 samples $\times 100 = 88.9\%$.

Table 11. Global analysis of the results of all participants in term of repeatability with the Premi®Test.

Lab	(Number of identical results for the same sample/N) $\times 100\%$	(Number of identical results for 2 identical samples (pair)/N) $\times 100\%$
A	87.5	87.5
B	100.0	100.0
C	100.0	93.8
D	93.8	100.0
E	71.9	96.9
F	96.9	78.1
G	96.9	90.6
M	90.6	90.6
N	96.9	96.9
Total	94.8	92.7

N: total number of samples (32).

estimated at 95.3% and sensitivity of the test to the L3 level was 72.5%. These results were similar to other validation results for kits for the detection of antibiotic residues in milk. The results, in term of repeatability and reproducibility, are very satisfactory, with averages of 94.8 and 92.7% for repeatability and 89.1% for reproducibility.

In conclusion, Premi®Test is easy to perform. It is ideal for "on site" use (slaughterhouses, test

laboratories), as no special laboratory equipment is needed to perform the test. The rapidly response "yes/no" result is simply read by colour comparison. Premi®Test is applicable to muscle tissue of various species (porcine, bovine, ovine), using a "blank" muscle of each analyzed species as negative control to optimise reading time.

Finally, since 2006, field laboratories in France are authorised to use the Premi®Test as for pre-screening.

All positive samples with Premi[®]Test are then subjected to mandatory analysis by the FPT (Anon. 2006). All positive samples with the FPT are sent to our laboratory (CPL) for confirmation as usual.

Acknowledgements

The authors thank Annie Rault, Anne de Courville, Sophie Gautier and Marie-Pierre Fourmond for their technical participation in the preliminary study and Catherine Creff-Froger, responsible of the Four Plate Test analyses. We also thank Jean-Michel Fabre (Phylum, Labège, France) for help with data analysis. Thanks to Françoise Goeijen (DSM, The Netherlands) and to the six French field veterinary laboratories (LVD) that participated to the preliminary study. Thanks finally to all the participants of the collaborative study.

References

- Anon. 2005a. AFNOR Document. Requirements relating to the preliminary and collaborative studies undertaken by an expert laboratory/application to the detection methods of antimicrobial residues and another molecules for related purpose. Revision 0.
- Anon. 2005b. Memorandum DGAL/SDRRCC/N2005-8217 of the 08/09/2005. New method of analysis for the research of antimicrobial residues in meat with Premi[®]Test and *Bacillus cereus*: implementation of a pilot action. Available: <http://agriculture.gouv.fr/>. Accessed: 11 January 2008.
- Anon. 2006. Memorandum DGAL/SDRRCC/N2006-8240 of the 04/10/2006. Control plan for antimicrobial residues in slaughter meats, poultry, game, rabbits and breeding fish. Available: <http://agriculture.gouv.fr/>. Accessed: 11 January 2008.
- Arts CJM, Geijp E, Stark J, Witkamp R. 2000. Premi[®]Test: a broad spectrum screening test for detection of antimicrobial compounds in meat, organs and urine. In: Van Ginkel LA, Ruiter A, editors. Proceedings of the EuroResidue IV Conference, Veldhoven, The Netherlands. pp 186–192.
- Arts CJM, Witkamp RF. 1999. The PremiTest for screening for residues of antimicrobial compounds in meat. A summary report. TNO project number 50.736/01.01. Zeist, The Netherlands: TNO Nutrition and Food Research Institute.
- Bogaerts R, Wolf F. 1980. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. *Die Fleischwirtschaft*. 60:672–674.
- Cantwell H, O'Keeffe M. 2006. Evaluation of the Premi[®]Test and comparison with the One Plate Test for the detection of antimicrobial substances in kidney. *Food Addit Contam.* 23:120–125.
- Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
- Fabre JM. 2003a. Des Méthodes de recherche d'antibiotiques dans la viande se développent en France. *La Semaine Vétérinaire* July 2003.
- Fabre JM. 2003b. Recherche des résidus d'antibiotiques dans la viande: De nouvelles méthodes pour de nouveaux besoins. *La Semaine Vétérinaire* July 2003.
- Fabre JM, Mircovich C, Geijp E. 2004. Antibiotic residues in pork and poultry meat in France: the current situation and an evaluation of a new screening test. *Bull GTV.* 23:305–309.
- Gaudin V, Maris P, Fuselier R, Ribouchon JL, Cadieu N, Rault A. 2004. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Addit Contam.* 21: 422–433.
- Okerman L, Croubels S, Cherlet M, De Wasch K, De Backer P, Van Hoof J. 2004. Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. *Food Addit Contam.* 21:145–153.
- Popelka P, Nagy J, Germuska R, Marcincak S, Jevinova P, de Rijk A. 2005. Comparison of various assays used for detection of beta-lactam antibiotics in poultry meat. *Food Addit Contam.* 22:557–562.
- Reybroeck W. 2000a. Performance of the Premi[®]Test using naturally contaminated meat. In: Van Ginkel LA, Ruiter A, editors. Proceedings of the EuroResidue IV Conference, Veldhoven, The Netherlands. pp 909–912.
- Reybroeck W. 2000b. Detection of residues of antibiotics in foodstuffs with microbiological tests using bacillus. In: Proceedings of the Bacillus symposium, August 30–31; Brugge, Belgium.
- Stead S, Sharman M, Tarbin JA, Gibson E, Richmond S, Stark J, Geijp E. 2004. Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. *Food Addit Contam.* 21:216–221.

III. ARTICLE 3

APPLICATION OF TOTAL ERROR APPROACH IN
VALIDATION OF A BIOLOGICAL METHOD
(ELISA) TO DETECT RESIDUES OF
NICARBAZINE IN EGGS

Gaudin V, Laurentie M

Journal of Chromatography B

Contexte

La nicarbazine est un médicament vétérinaire de la famille des anticoccidiens. Ce principe actif est utilisé chez la volaille pour lutter contre les coccidioses, en supplémentation dans les aliments. Son utilisation est interdite chez les poules pondeuses. Toutefois, une contamination croisée des aliments pour la volaille lors de leur production peut entraîner la présence de résidus de nicarbazine dans les œufs. La nicarbazine possède un Niveau d'Action Différentiel (NAD) de 100 µg/kg. Nous avons donc utilisé cette limite comme la cible à atteindre par la méthode validée ici. La nicarbazine est un mélange équimolaire de 4,4-dinitrocarbanilide (DNC) et de 2-hydroxy-4,6 diméthyl pyrimidine (HDP). Le résidu marqueur est le DNC. Donc, comme dans la plupart des méthodes analytiques publiées, c'est le DNC qui était recherché dans les œufs, par le test ELISA sélectionné (CER, Belgique).

Méthodologie/Principaux résultats

Nous avons tout d'abord validé cette méthode selon la décision européenne 2002/657/CE [13]. Nous avons déterminé les caractéristiques de performance de la méthode selon cette décision, c'est-à-dire selon une approche « critère par critère ». L'objet de cet article est de montrer qu'à partir des résultats obtenus lors de la validation, nous pouvons aussi analyser les mêmes données grâce à une approche globale, c'est-à-dire selon une approche basée sur l'erreur totale et le profil d'exactitude. Nous pourrions ainsi conclure sur les performances de la méthode, en utilisant une autre approche et comparer les conclusions des deux approches quant aux performances de la méthode.

Dans un premier temps, pour construire le profil d'exactitude, nous avons analysé 6 standards d'étalonnage en tampon fournis avec le kit (0,2 ; 0,5 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 µg/L). Six séries d'analyse ont été réalisées et chaque standard d'étalonnage a été analysé en double. Le nombre total de standards d'étalonnage était de 72, ce qui est suffisant pour établir la fonction de réponse. En effet, pour construire un modèle d'étalonnage logistique à 4 paramètres, il faut un minimum de 5 niveaux de concentration. De plus, 3 standards de validation (70, 140 et 210 µg/kg) dans les œufs ont été analysés. Après l'étape d'extraction des œufs, les extraits étaient dilués au 1/10 pour obtenir des niveaux de concentration rentrant dans le domaine couvert par la gamme d'étalonnage. Six séries d'analyse ont été réalisées et chaque standard de validation a été analysé en triple. Un total de 54 standards de validation a permis d'établir le profil d'exactitude. Nous avons alors procédé à une analyse quantitative des résultats.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé 52 échantillons d'œufs blancs (sans résidus de nicarbazine) et 40 échantillons d'œufs supplémentés à 70 µg/kg en DNC. Nous avons alors effectué une analyse qualitative des résultats. Pour cela, nous avons fixé une valeur seuil, en utilisant la valeur du percentile 95, c'est-à-dire la valeur pour laquelle 95 % des échantillons sont en dessous. Au-dessus de cette valeur seuil, les échantillons sont considérés négatifs et inversement.

Tableau 21. Indices correspondant aux différents modèles de régression testés, classés selon l'indice d'Exactitude (I_A).

Modèle	I_A	I_{DR}	I_P	I_T
Régression Quadratique Pondérée ($1/X^2$)	0.6389	0.7183	0.7032	0.5162
Régression Quadratique Pondérée ($1/X$)	0.5614	0.4766	0.6085	0.6102
Régression Quadratique non Pondérée	0.5021	0.3403	0.5717	0.6506
Régression Logistique Pondérée à 4 Paramètres	0	0	0	0
Régression Logistique non Pondérée à 4 Paramètres	0	0	0	0
Régression Logistique Pondérée à 5 Paramètres	0	0	0	0
Régression Log-Log non Pondérée	0	0	0	0
Régression Logistique non Pondérée à 5 Paramètres	NC	NC	NC	NC
Régression Linéaire Pondérée	NC	NC	NC	NC
Régression Linéaire	NC	NC	NC	NC

I_A : indice d'Exactitude; I_{DR} : indice d'intervalle de dosage; I_T : indice de Justesse; I_P : indice de fidélité; NC: Indices impossibles à calculer

Nous avons analysé les résultats de validation grâce au logiciel e.noval, version 2.0. Nous avons utilisé différents indices qui reflètent les caractéristiques majeures de validation, pour sélectionner le meilleur modèle de fonction de réponse. Ces indices ont été définis dans un article de Rozet *et al.* [318]. Le **Tableau 19** résume les différents indices obtenus pour les différents modèles testés. En ce qui concerne l'indice d'exactitude I_A , qui est un indicateur global de la performance de la méthode, les meilleurs indices sont obtenus pour les régressions quadratiques avec ou sans pondération. Toutefois, les valeurs d'indices sont basses et reflètent une grande variabilité et un manque de justesse. La meilleure valeur de justesse (I_T), parmi les 3 modèles précédemment cités, a été obtenue avec le modèle quadratique non pondéré, alors que les meilleurs indices d'exactitude et de fidélité ont été obtenus avec le modèle quadratique pondéré ($1/X^2$). Ce résultat montre que l'indice d'exactitude I_A seul ne peut servir au choix du modèle le mieux adapté. Dans le meilleur des cas (modèle quadratique pondéré ($1/X^2$)), seul 70% de l'intervalle de dosage est valide.

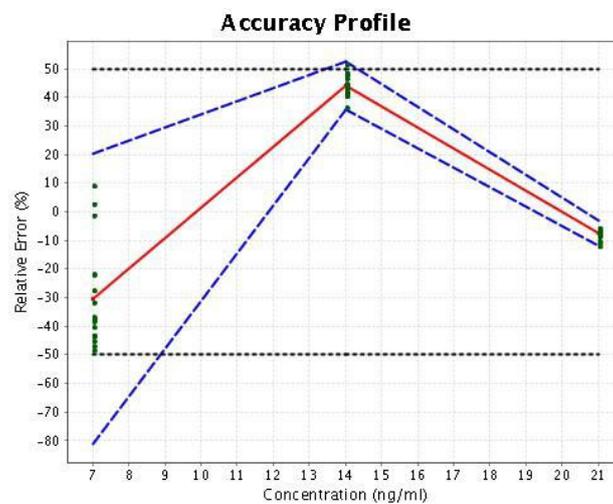
L'indice de fidélité I_P le meilleur a été obtenu pour le modèle quadratique pondéré ($1/X^2$). Cependant, la variabilité pour ce modèle à la concentration la plus basse est très élevée (23,62 % en fidélité intermédiaire). Pour les 3 modèles retenus plus haut, la répétabilité est conforme aux critères de la décision 2002/657/CE [13], mais pas la fidélité intermédiaire pour cette concentration. La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont conformes aux critères réglementaires aux concentrations plus élevées. Le manque de justesse vient probablement d'un effet matrice. Pour résoudre ce problème de justesse et de fidélité, trois solutions ont été testées. Premièrement, les valeurs de concentrations ont été corrigées par un coefficient de correction. Le modèle corrigé est présenté dans la **Figure 47**. Dans ce cas, l'indice de justesse était de 1 mais la fidélité était moins bonne à tous les niveaux. La seconde solution était de travailler dans un intervalle de dosage plus restreint, de 14 à 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sans correction. Dans ce cas, le meilleur modèle était la régression quadratique pondérée ($1/X$) (**Figure 46**).

La troisième solution était d'utiliser la méthode seulement comme une méthode qualitative, grâce à la valeur seuil déterminée à 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ce qui est acceptable en regard du Niveau d'Action Différentiel (NAD) de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cette valeur seuil correspond à un taux de faux-négatif inférieur ou égal à 5 %, comme exigé dans la réglementation européenne. Le taux de faux-positifs à cette valeur est de moins de 1 %.

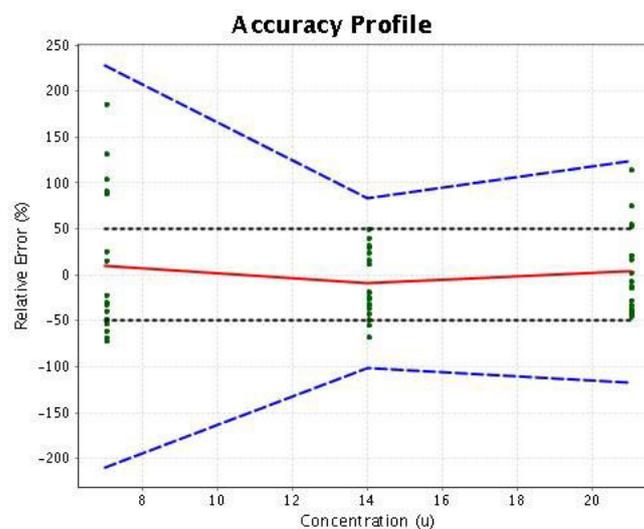
Il est impossible de comparer nos résultats issus de l'approche globale avec ceux de la validation de ce même kit réalisée par Huet *et al.* selon une approche critère par critère [319]. En effet, la méthode a été validée uniquement comme une méthode qualitative. Les auteurs avaient rapporté une capacité de détection $\text{CC}\beta$ inférieur à 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les œufs.

Figure 47. Profils d'exactitude obtenus à partir de la mesure de la concentration de nicarbazine dans les œufs (a) avec une régression quadratique pondérée ($1/X$) sans correction et (b) le modèle corrigé. Les lignes pleines rouges sont les biais relatifs, les lignes pointillées noires sont les limites de tolérance (intervalles de tolérance β), les courbes bleues avec des tirets représentent les limites d'acceptabilité, les points représentent the concentrations relatives calculées des standards de validation.

(a) Modèle quadratique pondéré ($1/X$)



(b) Modèle corrigé



Conclusions/Importance

Nous avons pu analyser les données de validation du kit ELISA pour le dépistage de la nicarbazine dans les œufs, grâce à l'approche basée sur l'erreur totale et le profil d'exactitude. Les conclusions de l'approche globale sont que cette méthode ne peut être utilisée comme une méthode quantitative, en raison de son manque de justesse et de fidélité, dans l'intervalle de dosage qui nous intéressait. Cette méthode doit donc être utilisée seulement comme une méthode qualitative, ce qui est suffisant pour une méthode de dépistage. Cette étude a permis de conclure sur les performances de la méthode, en utilisant une nouvelle approche d'exploitation des données.

Quand nous avons validé ce kit selon la décision européenne 2002/657/CE, l'analyse qualitative des données avait montré une différence significative entre les œufs blancs et les échantillons supplémentés à $0.7 \times \text{NAD}$. La capacité de détection était donc bien inférieure au NAD pour les œufs. Aucun résultat faux-positif, ni aucun résultat faux-négatif au niveau du NAD n'avait été obtenu. Donc les résultats étaient aussi satisfaisants au niveau qualitatif. Le kit avait montré une grande spécificité pour la nicarbazine. Il ne reconnaissait pas les grandes familles d'antibiotiques et reconnaissait très faiblement d'autres coccidiostatiques (réactions croisées 0.008 % à 0.025 %). Concernant l'analyse quantitative, les coefficients de variation (CV) intra-jour étaient compris entre 11.2 et 27.6% et les CV inter-jours entre 25.5 et 33.9 %. Donc, les conclusions de cette approche étaient similaires à celle de l'approche globale, c'est-à-dire que la méthode ne devrait pas être utilisée comme une méthode quantitative, étant donné les problèmes de répétabilité et surtout de fidélité intermédiaire. De plus, nous avons aussi conclu que la justesse n'était pas satisfaisante (comprise entre 48 et 67%).

Donc, l'approche critère par critère et l'approche globale du profil d'exactitude conduisent à la même conclusion, c'est-à-dire qu'il faut utiliser ce kit ELISA uniquement pour le dépistage qualitatif de la nicarbazine dans les œufs et non pour des analyses quantitatives. L'avantage du profil d'exactitude est de pouvoir comparer plusieurs modèles rapidement grâce au logiciel d'analyse des données et de visualiser graphiquement les problèmes de justesse et de fidélité, en fonction des concentrations. De plus, même si cela n'a pas fonctionné dans ce cas, il est possible grâce à un facteur de correction de corriger des effets matrices pour améliorer la justesse d'une méthode.



Application of total error approach to assess the performance of a biological method (ELISA) to detect nicarbazin residues in eggs[☆]

V. Gaudin^a, M. Laurentie^{b,*}

^a *Veterinary Drug Residues Unit, Laboratory for the Research and Investigation of Veterinary and Disinfectants, Afssa Fougères, BP 90203, La Haute Marche, 35302 Fougères, France*
^b *Pharmacokinetics-Pharmacodynamics Unit, Laboratory for the Research and Investigation of Veterinary and Disinfectants, Afssa Fougères, BP 90203, La Haute Marche, 35302 Fougères, France*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2008

Accepted 3 March 2009

Available online 19 March 2009

Keywords:

Elisa

Eggs

Nicarbazin

Accuracy profile

Validation

ABSTRACT

Nicarbazin, a coccidiostat, is used as a feed additive in poultry but not in laying hens. Feed contamination may however occur resulting in residues being present in eggs. As a Maximum Residue Limit (MRL) does not exist for nicarbazin residues in eggs a "Differential Action Level" (DAL) of 100 µg/kg has been established by the Veterinary Medicines Directorate (VMD). We have studied a commercial ELISA kit validated to detect and quantify nicarbazin in eggs with a sensitivity of 3 µg/kg. We used the total error approach to assess the performance of and validate the kit at the DAL level. The accuracy profile has been successfully obtained for the ELISA kit. The method cannot however be validated as a semi-quantitative method and we have consequently determined a cut-off based on 5% false negative rate according to European Decision 2002/657 on blank and spiked samples (70 µg/kg). The cut-off value established was 20 µg/kg using the 95th percentile.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nicarbazin belongs to the family of coccidiostats and is used as a zootechnical feed additive for poultry. Coccidiostats are widely used compounds to prevent and treat coccidiosis, a contagious parasitic disease affecting livestock, particularly poultry, that is associated with warm and humid conditions [1].

According to Regulation 1831/2003/EC [2], anticoccidials are licensed as feed additives. Nicarbazin is authorised for use in broilers but not in laying hens [3]. Accidental cross-contamination of feed, however, has been shown to result in residues of the compounds in eggs [4,5]. Relatively high nicarbazin residue levels have also been found in the liver of poultry and a clear cause-effect relationship has been established between contaminated feed supplied from the feed mill and contaminated feed on the farm. Birds can also be exposed to alternative sources of nicarbazin near to slaughter including older nicarbazin-medicated feed from the feeding system or from litter. According to the Veterinary Medicines Directorate (VMD, United Kingdom), the likely cause of these residues is contamination at the feed mill, during transport and/or inadequate cleaning of hoppers and lines between batches of feed in farms [6].

Nicarbazin is an equimolar mixture of 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC) and 2-hydroxy-4,6 dimethylpyrimidine (HDP). Its marker residue is DNC. Most of the residue analyses for nicarbazin are based on methods detecting the DNC molecule.

The European Commission has concerns over consumer health and has set Maximum Residue Limits (MRLs) for number of veterinary drugs in different matrices (Regulation 2377/90/EC) [7]. There is, however, no MRL for nicarbazin residues in eggs in Europe. In the absence of an MRL a zero tolerance approach should be used.

Several immunoassays for nicarbazin, using different platform technologies as ELISA, BiacoreTM, lateral flow device or dry chemistry immunoassay have been developed [8–11]. In particular, the developer of the ELISA kit (CER, Laboratory of Hormonology, Marloie, Belgium) has published the development and validation of this ELISA kit for nicarbazin in eggs according to decision EC/2002/657 [12]. The detection capability (C_c), i.e. the smallest amount of the substance that can be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β , for the egg nicarbazin kit has been established as being 3 µg/kg [8].

In practice, some European Member States have used an alternative approach. In 1998, the VMD in the United Kingdom set a "Differential Action Level" (DAL) of 100 µg/kg body weight as a decision threshold for follow-up action.

Because the kit has only been validated in house by the producer, before it can be used in routine analysis by National Reference Laboratories (NRL), we wished to validate it in our laboratory at a DAL level of 100 µg/kg to verify its performance.

[☆] This paper is part of a special issue entitled "Method Validation, Comparison and Transfer", guest edited by Serge Rudaz and Philippe Hubert.

* Corresponding author.

E-mail address: m.laurentie@fougères.afssa.fr (M. Laurentie).

We have analysed the validation data using the total error approach in this work. The total error approach is based on constructing an accuracy profile [13–15], and has been widely discussed for physicochemical methods as described in this special review and in a previously published work [16]. In 2003, the American Association of Pharmaceutical Scientist (AAPS) and the Food and Drug Administration (FDA) [17] recommended that this approach be used for macromolecule ligand binding assays.

We therefore proposed to use this approach to assess the performance of an ELISA method in this study.

To construct an accuracy profile a validation study determining trueness of fit and precision simultaneously is required. From the results of the validation experiments a two-sided β expectation tolerance interval was calculated for each concentration level and the accuracy profile was constructed. We needed to define acceptance limits and the risk of the procedure resulting in a $(1 - \beta)$ proportion of measurements falling outside of these limits. The risk was set at 5% and acceptance limits at $\pm 50\%$ in accordance with European Decision 2002/657 [12] and as described previously [16].

2. Materials and methods

2.1. immunoassay procedure

We used the CER ELISA kit (ref E.E.2, Laboratory of Hormonology, Marloie, Belgium).

The test principle and sample extraction methods have been extensively described by Huet et al. [8].

We used different apparatus to that described by Huet et al: a micro-titre plate washer ELP40 (ADIL Instruments, France) and micro-titre plate reader SpectraCount™ (Packard, France) to wash and read the micro-titre plate.

2.2. Total error profile

2.2.1. Calibration standards

Calibration standards were contained ready-to-use in the kit box from the manufacturer. Vials containing standard solutions of DNC of 0.2, 0.5, 2, 5, 10 and 20 $\mu\text{g/l}$ in buffers were provided.

Six series of analysis were performed and calibration samples were analysed in duplicate. The total number of calibration standards are 72 and are sufficient to establish the response function including 4p or 5p logistic models as recommended by Hubert et al. [14].

2.2.2. Validation standards

Validation standards were prepared at 70, 140 and 210 $\mu\text{g/kg}$ in homogenised eggs and were diluted after extraction (1/10), to obtain similar levels to those of the calibration standards before loading onto the micro-titre plate.

Six series of analyses were performed for the validation standards and were measured in triplicate. The total number of validation standards are 54 and are sufficient to establish the accuracy profile as recommended by Hubert et al. [14].

2.2.3. Validation analysis

The validation data were processed on e.noval software, version 2.0, and Seelva Version 1.0 beta 8, for logistic functions (Arlenda, Liège, Belgium).

2.3. Cut-off assessment

In a second process we used the kit as a qualitative tool. To do this we set cut-off criteria and determined concentration values based on positive or negative responses by testing 52 blank samples and 40 samples spiked to 70 $\mu\text{g/kg}$. We used the 95th percentile value

to establish the cut-off, i.e. the value at which samples are deemed to be positive.

3. Results and discussion

3.1. Response function and accuracy profile

The relationships between response and concentrations were analysed using different regression models: linear, weighted linear, quadratic, weighted quadratic, 4 or 5 parameter logistic functions, weighted logistic functions and log–log regression.

We used a number of indexes reflecting the major validation criteria to select the best model. These were defined in a recent paper by Rozet et al. [18] and are contained in the software used. The first is the accuracy index (I_A). This is a global indicator of method performance depending on dosing range index (I_{DR}), trueness index (I_T) and precision index (I_P). The I_{DR} indicates that fraction of the range which is valid; when $I_{DR} = 1$, the whole range studied is accepted. The trueness index is an index describing method bias. An index close to 1 implies that the method is almost unbiased. The precision index describes random variation. An index close to 1 indicates that the method offers good precision.

Table 1 summarises the different indices obtained for the response functions tested. The best I_A was obtained for quadratic regressions with or without weighting. The index values, however, were low, ranging from 0.63 to 0.50. Considering the I_{DR} , the best model was the weighted ($1/X^2$) quadratic regression with a value of 0.72, i.e. only 70% of the dosing range is acceptable.

Several models have an I_A value of 0 indicating that trueness or precision are poor, outside of the acceptance limits and consequently these models cannot be used directly.

Accuracy profiles for seven response functions tested are shown in Fig. 1. Visual examination confirms considerable variation and lack of trueness.

No calculation was possible for three models (unweighted five parameter logistic regression, weighted linear regression, and linear regression).

3.2. Trueness

Examination of I_T values (Table 1) shows that the best value (unweighted quadratic regression) obtained from a different model to that which had the best I_A (weighted ($1/X^2$) quadratic regression). This indicates that the choice of model must be based not only on I_A but must take all indices into account.

Considerable lack of trueness is seen for the logistic and log–log models with bias values of close to -50 , implying that the I_T and consequently I_A indices are 0.

This bias may be due to a matrix effect between the calibration and validation standards: the calibration standards are provided in buffer but the validation standards are in a complex matrix (homogenised eggs).

3.3. Precision

Two sets of precision values were calculated: repeatability and intermediate precision. Precision was better for the weighted ($1/X^2$) quadratic regression model than for other quadratic models (Table 1). Considerable variability however was seen at the lowest concentration (7 ng/ml). The relative standard deviation (R.S.D.) of repeatability and the R.S.D. of the intermediate precision are shown in Table 2 for three models. These findings show acceptable repeatability but the intermediate precision which did not comply with the limits set in Decision 2002/657 [12].

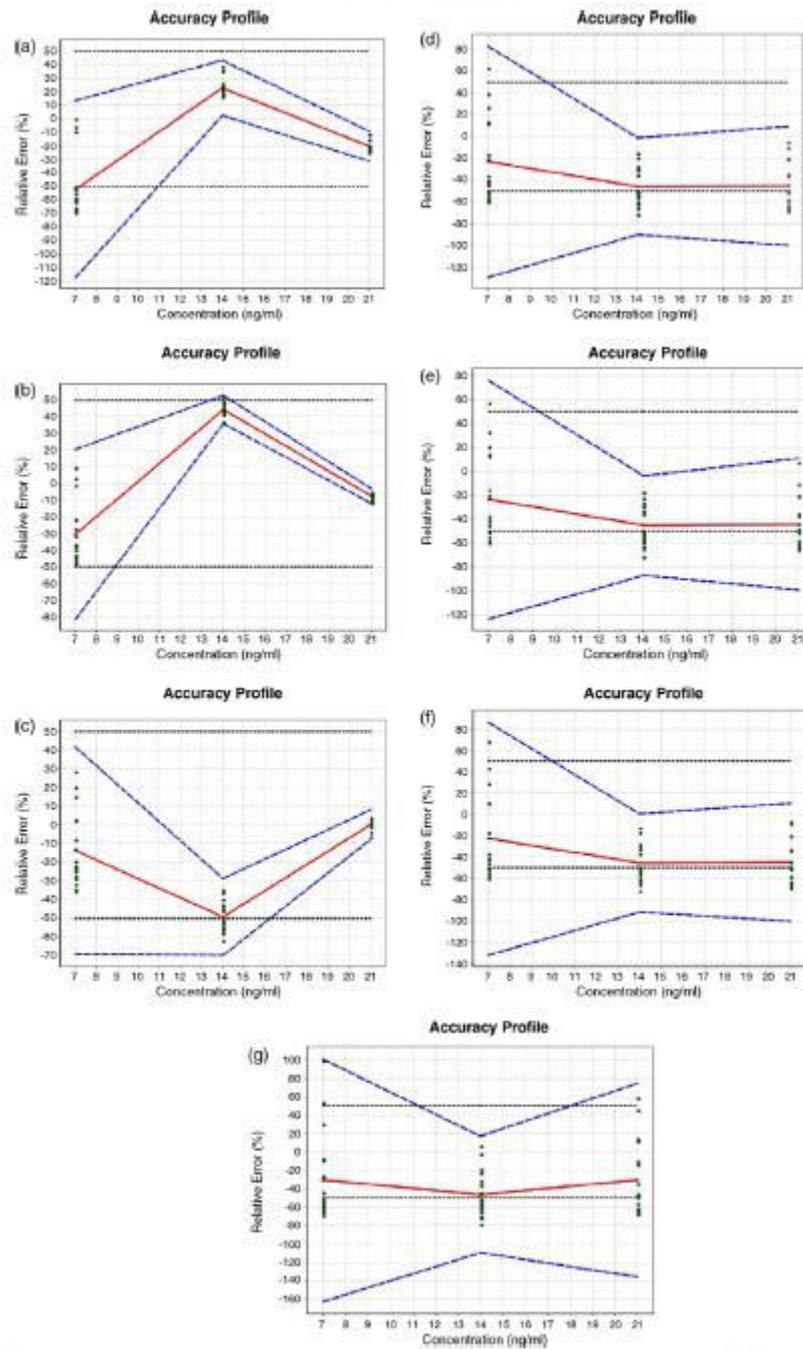


Fig. 1. Accuracy profile obtained for the measurement of the level of nicarbazin in eggs with (a) weighted $(1/X^2)$ quadratic regression, (b) weighted $(1/X)$ quadratic regression, (c) unweighted quadratic regression, (d) weighted four parameter logistic regression, (e) unweighted four parameter logistic regression, (f) weighted five parameter logistic regression, (g) log-log regression. Plain lines are the relative bias, the dashes lines are the β -expectations tolerance limits, the dotted curves represent the acceptance limits, the dots represent the relative back-calculated concentrations of the validation standards.

Table 1
Indices of the different regression models tested ranked by accuracy index (I_A).

Model	I_A	I_{DR}	I_T	I_P	Figure
Weighted ($1/X^2$) quadratic regression	0.64	0.72	0.70	0.52	1a
Weighted ($1/X$) quadratic regression	0.56	0.48	0.61	0.61	1b
Unweighted quadratic regression	0.50	0.34	0.57	0.65	1c
Weighted four parameter logistic regression	0	0	0	0	1d
Unweighted four parameter logistic regression	0	0	0	0	1e
Weighted five parameter logistic regression	0	0	0	0	1f
Unweighted log-log regression	0	0	0	0	1g
Unweighted five parameter logistic regression	NC	NC	NC	NC	
Weighted linear regression	NC	NC	NC	NC	
Linear regression	NC	NC	NC	NC	

I_A : accuracy index; I_{DR} : dosing range index; I_T : trueness index; I_P : precision index; NC: not calculated.

Table 2
Precision (repeatability and intermediate precision) obtained for models used, by concentration level tested.

Models	Concentration level (ng/g)					
	7		14		21	
	Repeat. (R.S.D. %)	IP (R.S.D. %)	Repeat. (R.S.D. %)	IP (R.S.D. %)	Repeat. (R.S.D. %)	IP (R.S.D. %)
Weighted ($1/X^2$) quadratic regression	2.72	23.62	1.36	7.49	1.01	4.11
Weighted ($1/X$) quadratic regression	4.23	18.69	2.26	3.53	1.34	1.90
Unweighted quadratic regression	6.30	20.75	3.52	7.98	2.09	3.27

Repeat: repeatability, IP: intermediate precision, R.S.D.: relative standard deviation (precision) (%).

3.4. Solutions tested

A number of solutions can be used to resolve the trueness problem. The first is to use a correction coefficient as described by Hubert et al. [19] to correct the matrix effect. The correction coefficient was computed from the slope of the linear equation linking theoretical spiked concentration to recovered concentration computed by inverse prediction. The correction coefficient used is the reciprocal of the slope achieved with the validation standards.

The equation of the line is:

$$[\text{Recovered}] = 1.867 + 0.454 [\text{Added}]$$

and the correction coefficient to be applied to the instrument response is therefore: new results = (old results - 1.87)/0.45.

Fig. 2 shows the new accuracy profile then obtained. For trueness the I_T was close to 1, i.e. bias was close to 0 although preci-

sion was amplified at all levels. This solution cannot therefore be used.

The second solution is to work in a dosing range from 14 to 21 ng/ml without correction. In this case the best response function is the weighted ($1/X$) quadratic regression.

The third solution is to use the method as a qualitative test.

3.5. Cut-off determination

A cut-off value was determined using blank samples and samples spiked to 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Because the high variability seen in the validation and according to Decision 2002/657 [12] it is reasonable to set a false negative rate of 5%. A cut-off value of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was established by calculating the 95th percentile of our samples. This value is acceptable as it is well below the DAL of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The false positive rate at this cut-off is less than 1%.

3.6. Comparison with initial data published

It is difficult to compare our validation results with those obtained by Huet et al. [8]. This author has not really calculated trueness and precision so the point by point comparison on these criteria is not possible. However, Huet has compared results obtained by an LC-MS-MS method and its ELISA method from incurred or spiked eggs and not from quantitative validation study with standard curves. The results have shown a high variability, i.e. accuracy, depending on concentration as shown by our validation results.

4. Conclusion

We have used the accuracy profile successfully to assess the performance of the ELISA kit for nicarbazin in eggs. The performance of the method was compared to the acceptance limits set in accordance with European Decision 2002/657 [12]. Under our conditions, however, the method cannot be validated for use as a semi-quantitative method as both trueness and precision are not within regulatory acceptable limits.

We have tested alternative solutions to solve the problem of trueness. The best solution found was to reduce the dosing range.

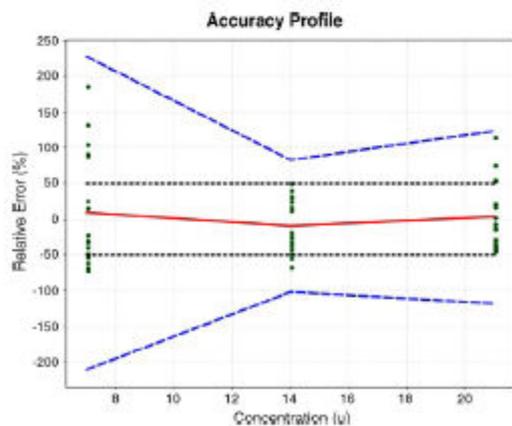


Fig. 2. Accuracy profile obtained with corrected results. Plain lines are the relative bias, the dashes lines are the β -expectations tolerance limits, the dotted curves represent the acceptance limits, the dots represent the relative back-calculated concentrations of the validation standards.

The method should be used as a qualitative method to detect the presence of nicarbazin in eggs with a cut-off of 20 µg/kg.

References

- [1] L. Mortier, A.-C. Huet, C. Charlier, E. Daeseleire, P. Delahaut, C. van Peteghem, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 1120.
- [2] Council Regulation (EC) No. 1831/2003, *Off. J. Eur. Commun.* L268 (2003) 29.
- [3] Council Directive (EC) No. 70/524/EEC, *Off. J. Eur. Commun.* L270 (1970) 1.
- [4] C.T. O'Keefe, M. Capurro, E. Danaher, M. Campbell, K. Elliott, *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 923.
- [5] A. Cannavan, G. Ball, D.G. Kennedy, *Food Addit. Contam.* 17 (2000) 829.
- [6] R. Young, A. Craig (Eds.), *The Use and Misuse of Antibiotics in UK Agriculture—Part 3*, Soil Association, Bristol, UK, 2001, p. 1.
- [7] Council Regulation (EEC) No. 2377/90, *Off. J. Eur. Commun.* L224 (1990) 1.
- [8] A.-C. Huet, L. Mortier, E. Daeseleire, T. Fodey, C. Elliott, P. Delahaut, *Food Addit. Contam. Part A* 22 (2005) 128.
- [9] B. McCamey, L.M. Traynor, T.L. Fodey, S.R.H. Crooks, C.T. Elliott, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 165.
- [10] K. Campbell, T. Fodey, C. Flint Danks, M. Danaher, M. O'Keefe, G. Kennedy, C.T. Elliott, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2497.
- [11] V. Hagren, S.R.H. Crooks, C.T. Elliott, T. Lovgren, M. Tuomola, *J. Agric. Food Chem.* 9 (2004) 2429.
- [12] Commission Decision 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.* L221 (2002) 8.
- [13] Ph. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet, *Anal. Chim. Acta* 391 (2) (1999) 135.
- [14] Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, *STP Pharma* 13 (2003) 101.
- [15] Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (3) (2004) 57.
- [16] E. Chéneau, J. Henri, Y. Protais, J.P. Abjena, B. Roudaut, P. Sanders, M. Laurentie, *J. Chromatogr. B* 850 (2007) 15.
- [17] B. DeSilva, W. Smith, R. Weiner, M. Kelley, J.M. Smolec, B. Lee, M. Khan, R. Tracey, H. Hill, A. Celniker, *Pharm. Res.* 20 (11) (2003) 1885.
- [18] E. Ruzet, V. Wascotte, N. Lecouturier, V. Prêat, W. Dewé, B. Boulanger, Ph. Hubert, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 239.
- [19] Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, *STP Pharma* 16 (2) (2006) 87.

IV. ARTICLE 4

VALIDATION OF A FIVE PLATE TEST, THE
STAR PROTOCOL, FOR THE SCREENING OF
ANTIBIOTIC RESIDUES IN MUSCLE FROM
DIFFERENT ANIMAL SPECIES ACCORDING TO
THE EUROPEAN DECISION 2002/657/EC

Valérie GAUDIN, Céline HEDOU, Annie RAULT, Eric
VERDON

Food Additives and Contaminants: Part A

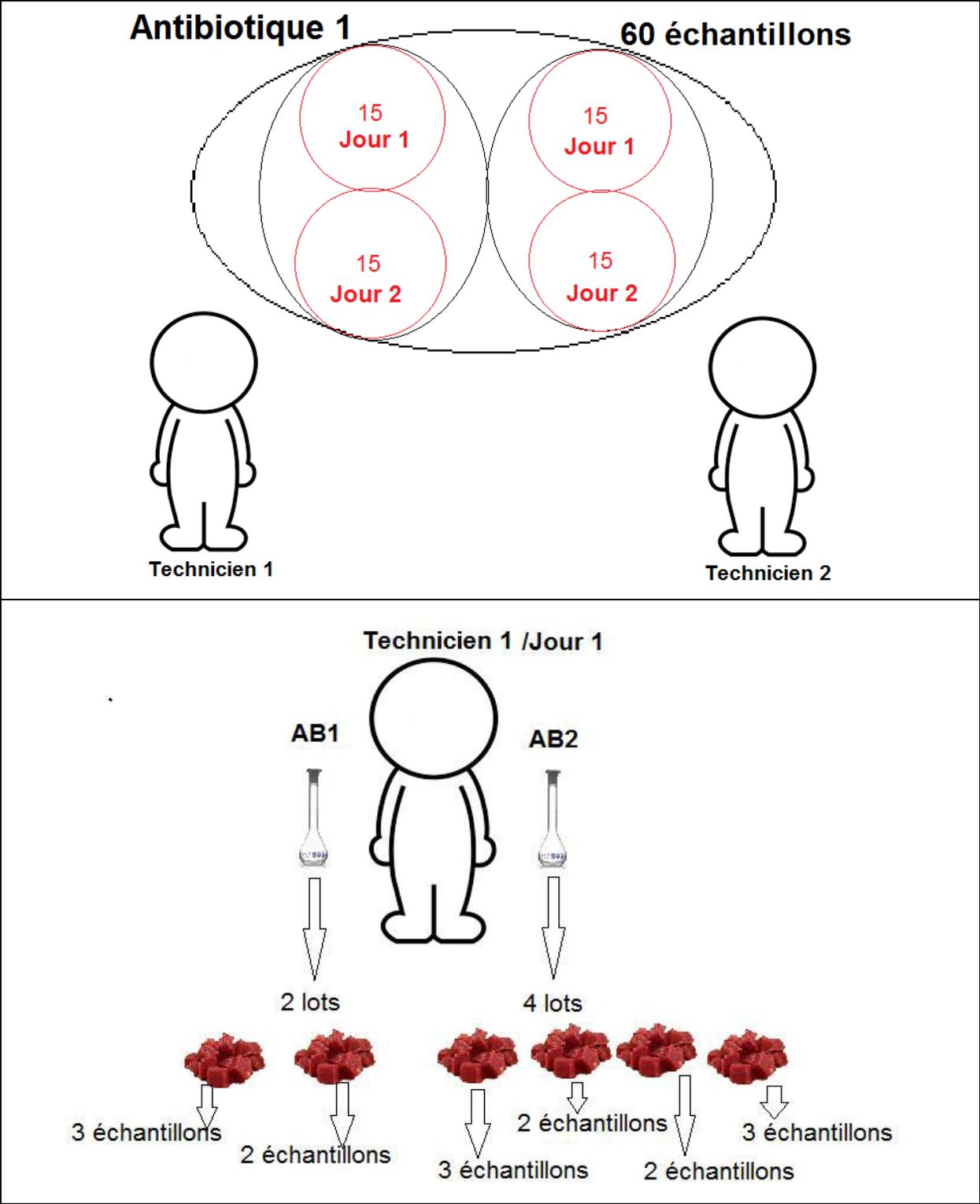
Contexte

Depuis des décennies, les méthodes microbiologiques sont couramment utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les matrices d'origine animale, telles que le muscle, le rein, le lait, etc. La méthode nommée « Screening Test for Antibiotic Residues » (STAR) a été développée par notre laboratoire dans le cadre de nos activités de laboratoire de référence de l'union européenne (LRUE) pour les résidus d'antibiotiques. L'objectif de ce développement était l'amélioration des performances des méthodes microbiologiques et l'harmonisation des méthodes au niveau européen. Cette méthode dite « 5 boîtes » est basée sur la combinaison de 5 germes (*Bacillus cereus* (Bc6), *Bacillus stearothermophilus* (Bst), *Escherichia coli* (Ec8), *Micrococcus luteus* (Ml8) et *Bacillus subtilis* (Bs8)) inoculés dans 5 milieux différents par leur pH et leur composition. Cette combinaison permet de détecter plusieurs familles d'antibiotiques, grâce à l'inhibition de la croissance des bactéries en présence du résidu dans le muscle. La méthode STAR a été précédemment validée dans le lait [29], suivant la décision Européenne 2002/657/CE [13]. Nous avons alors décidé de valider cette méthode pour le muscle, suivant cette même décision. Toutefois, l'approche de la validation a été un peu différente et plus complexe, en raison de la spécificité du muscle qui est une matrice solide.

Méthodologie/Principaux résultats

Des échantillons de muscle de différentes espèces animales (porc, bovin, ovin, volaille) ont été préparés. Il s'agissait de muscle broyé grossièrement, qui ont été supplémentés avec une quantité connue d'antibiotique. Ensuite, le mélange a été homogénéisé avec un agitateur rotatif pendant 15 minutes, puis broyé plus finement. Enfin, les tissus « simulés » ont été aliquotés, puis conservés au congélateur à -20°C pendant un mois au maximum avant analyse. Dans un premier temps, 16 antibiotiques différents, appartenant à 9 familles d'antibiotiques (macrolides, aminosides, quinolones, tétracyclines, pénicillines, céphalosporines, sulfamides, lincosamides et divers), ont été testés à trois concentrations dans les tissus « simulés » (la LMR, et en fonction du niveau de détection attendu, 2 fois la LMR ou même plus). Cette phase préliminaire a permis de définir les concentrations cibles pour la validation. Les capacités de détection CC β de 16 antibiotiques ont été déterminées dans le muscle de porc, en analysant 60 échantillons de muscle supplémentés (tissus « simulés »), provenant de lots différents. La préparation des tissus supplémentés a été réalisée par 2 techniciens, en suivant le protocole détaillé à la **Figure 48**. Ce protocole a été déterminé afin d'introduire le maximum de variabilité dans la préparation et l'analyse des échantillons (techniciens, espacement dans le temps (conditions ambiantes, lots de standards, de milieu gélosé, de bactéries, etc), lots différents de muscle de porc, solutions filles différentes), jours différents), pour obtenir des CC β au plus près des conditions de routine. De plus, 49 lots différents de muscle de porc blancs (dépourvus de résidus d'antibiotiques) ont été analysés afin de déterminer la spécificité de la méthode. Toutes les analyses ont été réalisées en aveugle et tous les échantillons ont été déposés sur les cinq boîtes de la STAR. La méthode STAR avait été appliquée pendant 5 ans pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans le muscle de différentes espèces, en parallèle de la méthode des 4 boîtes (méthode officielle française).

Figure 48. Organisation de la préparation des échantillons pour la validation de la méthode STAR dans le muscle.

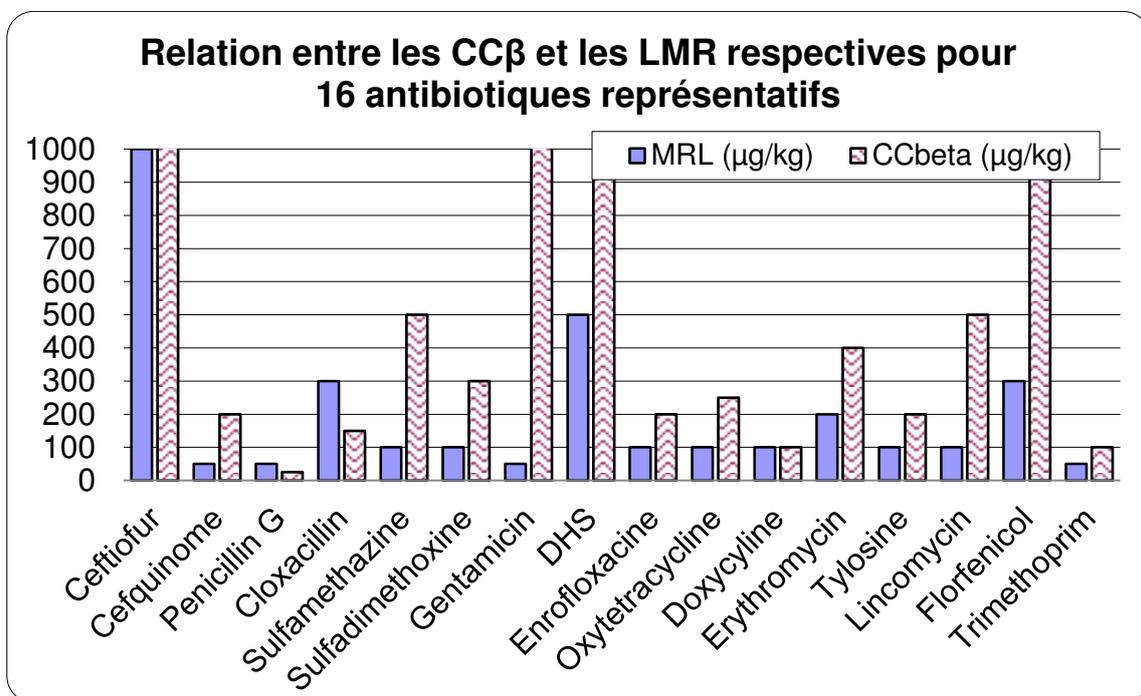


Toutefois, l'applicabilité de la méthode à d'autres espèces animales que le porc a été testée. Dans ce but, nous avons déterminé la spécificité et les CC β de 5 antibiotiques (pénicilline G à 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, doxycycline à 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, érythromycine à 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, gentamicine à 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enrofloxacin à 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), à partir de l'analyse de 20 échantillons de 3 espèces différentes, pendant 5 jours. Enfin, une étude de robustesse a été réalisée afin de tester les paramètres analytiques qui pourraient avoir une influence sur le résultat.

Le taux de faux-positifs de la méthode STAR était de 4 %, dans le muscle de porc, seulement sur la boîte *Bst* (0 % sur les autres boîtes). Bien qu'il n'existe pas de critère maximal pour le taux de faux-positifs dans la décision 2002/657/CE, un taux inférieur à 5 % pour une méthode microbiologique de dépistage est généralement considéré comme satisfaisant. Les CC β de 3 antibiotiques (pénicilline G, cloxacilline et doxycycline) sont inférieurs ou égaux à leurs LMR respective (**Figure 49**). Les CC β de 8 antibiotiques (tylosine, sulfadiméthoxine, oxytétracycline, triméthoprim, érythromycine, ceftiofur, enrofloxacin et cefquinome) sont compris entre 1,5 et 3 fois leur LMR respective. Enfin, les CC β des 5 derniers antibiotiques (lincomycine, gentamicine, dihydrostreptomycine, et florfenicol) sont supérieurs à 4 fois leur LMR respective. Chaque boîte est spécifique de la détection d'une famille d'antibiotiques, excepté si les concentrations en antibiotiques sont élevées. L'applicabilité de la méthode STAR pour l'analyse de muscles d'autres espèces a été prouvée. En effet, la zone d'inhibition moyenne obtenue avec les autres espèces était comprise dans un intervalle de plus ou moins 25 % par rapport à celles obtenues avec le muscle de porc, ce qui était notre critère pour valider l'applicabilité. Un seuil de positivité plus élevé est appliqué à la boîte *Bst* (4 mm au lieu de 2 mm d'inhibition pour les autres boîtes), car les échantillons blancs donnent des zones d'inhibition plus élevées sur cette boîte que sur les autres. Deux résultats faux-positifs ont été obtenus sur la boîte *Bst*, sur 30 échantillons analysés (bovin, volaille, ovin). Aucun résultat faux-positif n'a été observé sur les 4 autres boîtes, quelle que soit l'espèce animale.

Concernant la robustesse, quelle que soit la boîte, aucun effet significatif de 3 facteurs testés (concentrations en bactéries, quantité de milieu, et temps d'incubation) n'a été démontré sur le taux de faux-négatifs et de faux-positifs, excepté pour la boîte *Bst* avec la sulfadiméthoxine. L'augmentation de la concentration de bactéries et de la quantité de milieu pour cette boîte augmente le taux de faux-négatifs, ce qui est bien connu pour ce type de méthodes. Enfin, seul le temps de pré-incubation a un impact sur plusieurs boîtes. Une pré-incubation d'une heure à température ambiante améliore les limites de détection de certaines boîtes (*Ec8*, *Bst* pour les sulfamides et *Kv8*).

Figure 49. Relation entre les CC β et les LMR respectives pour 16 antibiotiques représentatifs.



Les 16 antibiotiques représentatifs sont représentés sur l'axe des x. Les CC β pour les 16 antibiotiques représentatifs testés et leurs LMR respectives sont représentés sur l'axe des y. LMR = Limite Maximale de Résidu.

Conclusions/Importance

En conclusion, la méthode STAR est une méthode robuste, simple, peu couteuse, et qui permet le dépistage de 9 familles d'antibiotiques dans le muscle de différentes espèces animales. Toutefois, la méthode STAR n'est pas applicable pour le dépistage de la famille des aminosides et du florfénicol au niveau des LMR, de même pour certaines molécules de la famille des sulfamides, des macrolides, des quinolones et des tétracyclines.

La validation d'une méthode microbiologique de type boites est très lourde et longue pour plusieurs raisons :

- Les substances à LMR dans le spectre de ces méthodes sont très nombreuses (eg. plus de 50 dans le muscle).
- Un échantillon supplémenté ne peut pas contenir un mélange d'antibiotiques car ce type de méthode n'est pas spécifique. Donc le nombre d'échantillons à analyser est un multiple du nombre d'antibiotiques pour lequel on va déterminer un CC β . De plus, si on mélangeait des antibiotiques, il y a un risque d'effet synergique ou antagoniste sur la croissance bactérienne.
- Du fait des résultats qualitatifs, le nombre d'échantillons nécessaires pour déterminer les capacités de détection CC β avec une certitude statistique, est le plus souvent plus élevé que pour les méthodes de confirmation, excepté quand la concentration cible est au niveau ou en dessous de la LMR.
- Les matrices solides, comme le muscle, rendent la validation encore plus complexe. La production de muscles naturellement chargés nécessite des phases animales couteuses. De plus, obtenir une concentration cible dans la matrice (si elle est utilisée intacte pour la validation) s'avère complexe, en raison e la grande variabilité entre les animaux. De plus, l'homogénéité de muscles intacts est difficile à garantir puisque le principe actif ne se répartir pas de façon homogène dans le muscle. Enfin, réaliser une validation de méthodes sur la base de disques supplémentés en antibiotiques, en absence de la matrice, ne donne qu'une indication partielle des performances de la méthode dans les conditions réelles de la matrice. C'est pourquoi nous avons produit des tissus dits « simulés » pour réaliser la validation. L'utilisation de tissus « simulés » tente de s'approcher au plus près des performances réelles de la méthode, mais le muscle broyé n'est pas la matrice utilisée pour l'analyse d'échantillons en routine. Donc les tissus simulés peuvent produire des biais par rapport à des tissus entiers.

La décision européenne 2002/657/CE donne très peu d'informations pour la validation des méthodes de dépistage et surtout aucune recommandation technique pour la mise en place de la validation. C'est pourquoi le guide Européen pour la validation des méthodes de dépistage [256], qui aide à l'application de la décision 2002/657/CE [13] pour les méthodes de dépistage, a été rédigé par trois LRUE, en lien avec la DGSANTE. Ce guide recommande l'utilisation de tissus simulés et propose de restreindre la validation au minimum à une liste de substances représentatives. Cette liste n'est pas figée et le choix des antibiotiques se fait en fonction des antibiotiques détectés par la méthode, des substances ayant une LMR dans la matrice d'intérêt, des usages particuliers dans certains pays et des connaissances préalables sur les limites de détection de la méthode. Ces deux points ont constitué une grande avancée dans la validation de ce type de méthodes. Toutefois, valider ce type

de méthodes microbiologiques représente quand même beaucoup de temps et d'effort, quelle que soit la matrice d'intérêt. De ce fait, le guide Européen propose que cette validation dite initiale soit réalisée dans un seul laboratoire (le développeur ou un autre). Ensuite, les résultats de la validation doivent être mis à disposition d'un laboratoire dit récepteur qui veut mettre en place la méthode. Ce deuxième laboratoire pourra faire une validation réduite, dite de transfert (moins d'échantillons, pas d'étude de robustesse). Les caractéristiques de performance (*eg.* $CC\beta$) obtenues dans le laboratoire récepteur seront alors comparées avec celles obtenues lors de la validation initiale. Ces performances devront être équivalentes. Enfin, la participation du laboratoire récepteur à des tests inter-laboratoires d'aptitude permettra de confirmer son aptitude à mettre en place la méthode dans son laboratoire.

Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC

V. Gaudin*, C. Hedou, A. Rault and E. Verdon

Community Reference Laboratory, AFSSA Fougères – LERMVD, La Haute Marche – BP 90203, F-35302 Fougères Cedex, France

(Received 20 August 2009; final version received 4 February 2010)

The STAR protocol is a Five Plate Test (FPT) developed several years ago at the Community Reference Laboratory (CRL) for the screening of antimicrobial residues in milk and muscle. This paper presents the validation of this method according to European Decision 2002/657/EC and to an internal guideline for validation. A validation protocol based on 'simulated tissues' and on a list of 16 representative antimicrobials to be validated was implemented in our laboratory during several months for the STAR protocol. The performance characteristics of the method were determined (specificity, detection capabilities CC_{β} , applicability, ruggedness). In conclusion, the STAR protocol is applicable to the broad-spectrum detection of antibiotic residues in muscles of different animal species (pig, cattle, sheep, poultry). The method has good specificity (false-positive rate = 4%). The detection capabilities were determined for 16 antibiotics from different families in relation to their respective maximum residue limit (MRL): beta-lactams (penicillins and cephalosporins \leq MRL), tetracyclines (\leq MRL and ≤ 2.5 MRL), macrolides (2 MRL), quinolones (≤ 2 MRL), some sulphonamides (≤ 3 MRL), and trimethoprim (2 MRL). However, the sensitivity of the STAR protocol towards aminoglycosides (> 8 MRL) and florfenicol (≤ 10 MRL) was unsatisfactory ($> >$ MRL). The two objectives of this study were met: firstly, to validate the STAR protocol according to European Decision 2002/657/EC, then to demonstrate that the validation guideline developed to implement this decision is applicable to microbiological plate tests even for muscle. The use of simulated tissue appeared a good compromise between spiked discs with antibiotic solutions and incurred tissues. In addition, the choice of a list of representative antibiotics allowed the reduction of the scope of the validation, which was already costly in time and effort.

Keywords: in-house validation; screening – microbial screening; residues; antibiotics; antimicrobials; veterinary drugs; meat

Introduction

Due to the preventive or curative treatment of livestock, the presence of antibiotic residues could be found in food of animal origin. Traces of these antibiotics could cause various problems: problems of technological processing (e.g., milk), allergies to antibiotics following the ingestion of contaminated food (e.g., penicillins), antibiotic resistance of bacteria in humans, which could be transferred to pathogenic bacteria for humans. Therefore, maximum residue limits (MRLs) were set for the antibiotics approved for use in veterinary medicine for livestock. European Regulation No. 470/2009 of 6 May 2009 (European Commission 2009) establishes procedures for the establishment of MRLs of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin and repeals Regulation No. 2377/90 of 26 June 1990 (European Commission 1990). To monitor the presence of residues, the first step is the screening step, which is to conclude whether or not a sample contains

antibiotic residues at or above the MRL, in the case of permitted substances. Then, in case of positive screening, it is necessary to use physicochemical methods for the confirmation of identity and the quantification of the substance (European Commission 2002). The screening step is often based on microbiological screening methods that are cheap, easy to perform, and do not need specific and expensive equipment. These methods were used for many years. Some of them were developed even before the establishment of the MRLs (European Commission 1990) and many of them before the implementation of the rules for the validation of analytical methods (European Commission 2002).

The STAR protocol (for Screening Test for Antibiotic Residues), developed at the Community Reference Laboratory (CRL) for antimicrobial residues in food (AFSSA Fougères, France), is intended for the qualitative detection of residues of substances with antimicrobial activity in milk and muscle by using

*Corresponding author. Email: v.gaudin@fougères.afssa.fr

bacterial strains sensitive to antibiotics. This method is based on five different plates (Five Plate Test), dedicated to the detection of specific families of antibiotics. The first validation of the STAR protocol was organized in 1999 by way of a collaborative study with spiked discs, blank muscles and incurred muscles (Fuselier et al. 2000). Seven antibiotics from six families were tested. The detection levels were included between 1 and 4 MRLs, but it was dependent on the production of incurred materials. These results were promising for the implementation of the STAR protocol. The STAR protocol was then validated for the screening of antibiotics in milk (Gaudin et al. 2004). Sensitivity was established by the analysis of milk samples spiked with 66 antibiotics at eight different concentrations. Ten different groups of antibiotics were studied: macrolides, aminoglycosides, cephalosporins, penicillins, quinolones, tetracyclines, sulphonamides, lincosamides, phenicols and miscellaneous drugs. The STAR protocol was able to detect 21 antibiotics at or below the MRL, and a further 27 drugs could be detected at levels from the MRL up to four times the MRL. The STAR protocol was at least twice as sensitive as conventional methods for macrolides, quinolones and tetracyclines. Each plate was preferentially sensitive for one or two families of antibacterials: the plate *Bacillus cereus* for tetracyclines, the plate *Escherichia coli* for quinolones, the plate *Bacillus subtilis* for aminoglycosides, the plate *Kocuria rhizophila* for macrolides and the plate *Bacillus stearothermophilus* for sulphonamides and beta-lactams.

Since 2002, every analytical method used for the analysis of monitoring routine samples has to be validated according to European Decision 2002/657/EC (European Commission 2002), which concerns the performance of analytical methods and the interpretation of results. The level of validation of confirmatory methods is now quite satisfactory. However, very little information is contained in that decision concerning the validation of screening methods. Two main information are contained in the decision: firstly, which performance characteristics have to be determined for a screening method and; secondly, the following information about the detection capability required for screening methods. Screening methods are:

only those analytical techniques, for which it can be demonstrated in a documented traceable manner that they are validated and have a false compliant rate of <5% (β -error) at the level of interest shall be used for screening purposes in conformity with Directive 96/23/EC (European Commission 1996). In the case of a suspected non-compliant result, this result shall be confirmed by a confirmatory method.

Finally, the difficulty is how to use this information to implement a validation for a screening method.

Moreover, the validation of microbiological screening methods presents specific issues, different from physicochemical methods which are often specific methods. Firstly, the number of antibiotics to be validated is very high because all the antibiotics having an MRL in the corresponding matrix should be validated. It could be also the case for newly developed multi-residue methods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). However, microbiological methods do not allow one to identify the antibiotic residue present in the sample. Therefore, each antibiotic has to be tested independently and the number of analyses increased. Secondly, these kind of methods are only qualitative methods giving a response as negative, positive or doubtful. Deciding on a sample size for a qualitative enquiry can be even more difficult than for a quantitative enquiry because there are no definite rules to be followed. In general, sample size depends on the nature of the analysis to be performed and on the desired precision of the estimates one wishes to achieve. The larger the sample size, the more sure one can be that the answers truly reflect the population. This indicates that for a given confidence level (e.g., 95%; β error = 5%), the larger the sample size (n), the smaller the confidence interval (interval estimate of a population parameter). For $n=20$ and a percentage of answers of 50% (i.e., 50% answers positive; 50% answers negative), the confidence interval is 22%. For $n=60$ and a percentage of answers of 50% (50% positive; 50% negative), the confidence interval is 13%. A greater sample is then required to decrease the confidence interval and therefore the chance of error. Therefore, from a statistical point of view, the number of samples to be analysed should be higher than for quantitative methods. Thirdly, spiking liquid matrices (e.g., milk, juice meat) are easy and validation could be performed on spiked samples. The problem is specific to solid matrices like muscle. In fact, plate tests are based on the analysis of raw muscle (slices of meat). Therefore, the validation should be conducted on blank and incurred raw muscle. However, the production of incurred materials for each antimicrobial at one concentration would be time and money consuming. Consequently, very few microbiological methods were validated in the matrix, especially in muscle and other solid matrices according to Decision 2002/657/EC (European Commission 2002). A new guideline document supplements Decision 2002/657/EC regarding the validation of screening methods. The CRL in Fougères, in collaboration with the CRL in Berlin and in agreement with the CRL in Bilthoven, and after consultation through the NRL (National Reference Laboratories) network, has drafted this document with the purpose of assisting residue laboratories to validate screening methods. This document is now finalized and officially published on the DGSANCO website since

21 January 2010 (Anon 2010). This guideline deals with the initial validation and also a shortened or 'abridged' validation, which under certain conditions allows for the transfer of methods already validated in one laboratory to a second one. The guideline proposes some recommendations to implement a validation protocol for screening methods. It explains the performance characteristics to be determined (specificity, detection capability, robustness, etc.) and how to determine them in practice. Moreover, the number of samples necessary to validate a screening method is discussed. Finally, some new concepts were introduced in the guideline: the preparation of 'simulated tissues' and a list of representative substances to be validated. These two concepts will be detailed below in the validation protocol.

The validation conducted in this study is based on this validation guideline which is also the internal guideline in our laboratory for the validation of screening methods. Two objectives were set: firstly, to validate the STAR protocol for its application to the detection of antibiotic residues in muscles from different animal species according to Decision 2002/657/EC (European Commission 2002); and secondly, to show that the European guideline for the validation (Anon. 2010) and based on Decision 2002/657/EC (European Commission 2002) was applicable to the validation of a microbiological screening method.

This paper will present the validation protocol and then the results of the validation of the STAR protocol for the screening of antibiotic residues in muscles of different animal species.

Material and methods

Chemicals and standard solutions

Antibiotic and sulphonamide standards were provided by Sigma (Lyon, France), except cefquinome (Intervet, Angers, France), ceftiofur (Upjohn, Val-de-Reuil, France), enrofloxacin (Bayer, Puteaux, France), and doxycycline (Virbac, Carros, France).

STAR protocol

The STAR protocol is a Five Plate Test already published for the analysis of milk (Gaudin et al. 2004). Five test organisms – *Bacillus subtilis* B.G.A spores (Merck), *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 11303 (all Pasteur Institute, France), and *Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149 (Merck) – were inoculated in five different media. The five following culture media were used respectively: Antibiotic medium II at pH 8.0 (plate Bs8), test agar at pH 8 (Merck) (plate Kv8), test agar at pH 6 (Merck) (plate Bc6), test agar at pH 8 (Merck) (plate Ec8), and Diagnostic Sensitive Test (DST) (Oxoid

commercialized by Unipath Ltd, Basingstoke, UK) (plate Bst). Culture media were prepared as recommended by the supplier and sterilized. Then, 5 ml of inoculated medium were added to a Petri dish placed on a cold horizontal surface. In routine use, a cylindrical plug of 8 mm in diameter and 2 cm long is cut in frozen muscle using a cork borer. Slices of muscle samples of 2 mm in thickness are then cut and placed on the plates. The same protocol was applied to 'simulated tissues'. Finally, the plates are incubated: at 30°C for at least 18 h for Bs8 and Bc6, at 37°C for at least 24 h for Kv8, at 37°C for at least 18 h for Bc6, and at 55°C for 15 to 16 h for Bst.

A muscle sample was considered positive when the inhibition zone (IZ) around the meat sample was equal or superior to 2 mm in width on plates Bs8, Kv8, Bc6 and Ec8 and/or the IZ equal or superior to 4 mm in width on plate Bst.

Since 2004, the medium test agar pH 7.2 was replaced by antibiotic medium II at pH 8.0 (Difco, reference no. 259310) because it was not commercialized anymore. Moreover, the positive control of plate Bst was modified for practical reasons: sulfamethazine at 1000 µg l⁻¹ was replaced by amoxicillin at 40 µg l⁻¹. Positive controls consist of 30 µl of antibiotic solutions which are put on paper discs of 9 mm diameter (Durieux, France). There is a specific positive control for each plate: streptomycin at 2000 µg l⁻¹ on plate Bs8, tylosin at 1000 µg l⁻¹ on plate Kv8, oxytetracycline at 800 µg l⁻¹ on plate Bc6, enrofloxacin 800 µg l⁻¹ on plate Ec8, and amoxicillin at 40 µg l⁻¹ on plate Bst. The validity of each day of analysis depends on the results of the positive controls that have to be included in the following intervals: 5.5 ± 1.5 mm, 6.5 ± 1.5 mm, 6.0 ± 1.5 mm, 7.0 ± 1.5 mm and 6.0 ± 1.5 mm for Bs8, Kv8, Bc6, Ec8 and Bst respectively.

Validation protocol

Simulated tissues

In 2002, we studied the sensitivity of 35 antibiotics by way of antibiotic-spiked discs. However, this way of working was not completely satisfactory because the interference of the muscle matrix was absent. In fact, Okerman, De Wasch et al. (1998) showed that the tissue matrix has an effect on the sensitivity of the test plates. During that study, pieces of frozen meat laid on paper discs impregnated with antibiotic standard solutions were used for validation. Usually, IZ decreased when spiked meat samples were analysed, compared with antibiotic spiked discs without meat. The same conclusions were reported by Pikkemaat et al. (2007). Because of the difficulty and the high cost of production of the incurred materials for validation of a microbiological plate test, it was decided to work on what we called 'simulated tissue'. Furthermore,

it was impossible to mix several antibiotics in the same sample, since the method was not specific and did not identify the molecule that produced an inhibitory effect. Moreover, one could observe a cumulative effect of antibiotics in their inhibitory activity when several antibiotics are contained in one sample.

Therefore, a preliminary study was conducted to determine what was the best way to prepare simulated tissues and what kind of preparation would give the closest result to the actual samples. This study was based on the experience of two National Reference Laboratories (Vicente Calderon, AESAN, Spain; Anna Liisa Myllyniemi, EVIRA, Finland) that had already worked on such samples. During this preliminary study, the way of preparation of simulated tissue was also tested for homogeneity of the material. Regarding the results, the homogeneity was satisfactory.

Production of spiked materials ('Simulated tissue')

A preliminary study was conducted to determine the concentrations of antibiotics to be spiked in muscle samples for later validation. Sixteen different antibiotics were tested at various concentrations (the MRL and according to the assumed detection limit at half MRL, two times the MRL or more) in simulated tissues. The tested concentrations were based on the results of the validation of the STAR protocol in milk (Gaudin et al. 2004). These tests were repeated several times. The concentration that always gave positive results (IZ higher than 2 mm, generally between 3 and 4 mm) and if possible concentrations lower than or equal to the respective MRLs were chosen.

The antibiotics and the corresponding concentrations chosen for the validation are presented in Table 1. Sixteen different antibiotics were used in this study. Nine different groups of antibiotics were studied: macrolides, aminoglycosides, cephalosporins, penicillins, quinolones, tetracyclines, sulphonamides, lincosamides and miscellaneous drugs. Stock solutions of the 16 different antimicrobials were prepared at a

concentration of 1 mg ml⁻¹, after correction for potency. Working solutions were then prepared by dilutions in distilled water. Different batches of muscle were purchased in supermarkets. Muscle was first coarsely minced. To prevent antibiotic contamination, finely minced blank muscle samples were prepared first, on the same day, with the four different batches of muscle, to be tested in parallel with the spiked samples. Then 1 ml of working solution was added to 100 g of blank minced muscle. Spiked muscle was homogenized during 15 min in the same rotary hatcher. At the end, the meat was finely minced. Each muscle material was finally put in plastic bottles or plastic bags. Each material was codified by the director of the study and then frozen at -20°C. The 'simulated tissues' were always analysed in a maximum period of 1 month.

Specificity

A total of 49 batches of pork muscle of different origins were analysed in the end. Most of them (40 batches) were tested in blind duplicate on two different days and by two different technicians.

Detection capabilities CC β

According to Decision 2002/657/EC (European Commission 2002), the detection capability (CC β) of a method is defined as:

the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β . In the case of substances with an established permitted limit, this means that the detection capability is the concentration at which the method is able to detect permitted limit concentrations with a statistical certainty of $1 - \beta$.

Given the expected detection capabilities for many antibiotics, which are often close to the MRLs, it was chosen to determine the detection capabilities by analysing 60 minced muscle samples spiked at one

Table 1. Chosen antibiotics and corresponding concentrations for the validation study.

Antibiotic family	Representative antibiotic	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Chosen concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cephalosporins	<i>Ceftiofur</i> /Cefquinome	1000/50	1500/200
Penicillins	Penicillin G/Cloxacillin	50/300	25/150
Sulfonamides	<i>Sulfamethazine</i> / <i>Sulfadiazine</i> / <i>Sulfathiazine</i>	100/100	500/300
Aminoglycosides	Gentamicin (GTM)/ <i>Dihydrostreptomycin</i> (DHS)	50/500	2000/4000
Quinolones	Enrofloxacin	100	200
Tetracyclines	<i>Oxytetracycline</i> / <i>Doxycycline</i>	100/100	250/100
Macrolides	Erythromycin/ <i>Tylosin</i>	200/100	400/200
Lincosamides	Lincomycin	100	500
Phenicol	<i>Florfenicol</i>	300	3000
Miscellaneous	Trimethoprim	50	100

Note: Antibiotics shown in italics are those that were substitutes for the antibiotics initially included in the list of representative antibiotics.

antibiotic concentration, instead of 20 samples to reach the most statistically significant determination of the $CC\beta$ (European Commission 2002).

The preparation of the samples is detailed in Figure 1. To introduce a maximum of variability in the determination of the detection capabilities, 30 samples were prepared and analysed by one technician and another 30 samples by other technician. In addition, the 30 samples were divided into two sets of preparation. In each set, 15 samples for the same antibiotic concentration were prepared and analysed by each technician. For each antibiotic and each technician, the two sets were spaced out to introduce variability in the period of analysis (ambient conditions) and therefore variability of batches (media, bacteria, antibiotic standard, etc.). Moreover, in each set of preparation of four antibiotics, four different batches of porcine muscle were used. Finally, on each day of preparation, two different working solutions were prepared from the stock solution of antibiotic and used to spike the different batches of muscle. The coding of the samples was performed by the head of the study to ensure that the analyses would be performed blindly, and then frozen at -20°C .

In the determination of specificity and detection capabilities, all samples were analysed on the five

plates of the STAR protocol to check the specificity of the plates for the different families of antibiotics. Five days of analyses were performed with the STAR protocol for each set of preparations and each technician. Each day, 14 samples were analysed blindly (twelve spiked samples and two blank samples). Therefore, all blank and spiked samples were analysed twice or thrice, on 2 or 3 different days.

It must be underlined that the analysis of the 60 samples for each antimicrobial was performed step by step. When one false-negative result or more was obtained after the analysis of ten samples, either the validation was stopped at this concentration and started again with an increased concentration if it was of interest (e.g., near the MRL), or the validation went on with the same antibiotic and the same concentration because the concentration was already much higher than the concerned MRL.

Determination of $CC\beta$

After the analysis of the 60 spiked samples, the concentration level, where only less than 5% of false compliant results remain, was the detection capability $CC\beta$ of the method (three false compliant results in a maximum of 60 spiked samples).

Applicability study

The STAR protocol has been implemented in parallel with the Four Plate Test for the analysis of muscles from different animal species during the routine analysis of field samples (cattle, sheep, poultry, etc.) in National Monitoring Plans for at least 5 years. The positive samples at the screening step are then confirmed by a multi-residue LC-MS/MS method (data to be published). Therefore, we have a lot of experience concerning the applicability of the method to muscles from different animal species.

However, to complete this study, we decided to perform a study to determine the $CC\beta$ of some antibiotics in cattle, sheep and poultry muscles, antibiotics for which the $CC\beta$ were determined previously in porcine muscle. Therefore, the $CC\beta$ of five antimicrobials (penicillin G at $25\ \mu\text{g kg}^{-1}$, doxycycline at $100\ \mu\text{g kg}^{-1}$, erythromycin at $400\ \mu\text{g kg}^{-1}$, gentamicin at $6000\ \mu\text{g kg}^{-1}$, and enrofloxacin at $200\ \mu\text{g kg}^{-1}$) were determined with 20 samples from each of the three species over 5 days and compared with the $CC\beta$ calculated for porcine muscle. In the applicability study, only the specific plate (which has presented IZ for pig muscle) was tested with the corresponding antibiotic.

The applicability would be proved if the $CC\beta$ determined for these species are similar to the $CC\beta$ determined for porcine muscle (the average IZ obtained for each species on the specific plate should

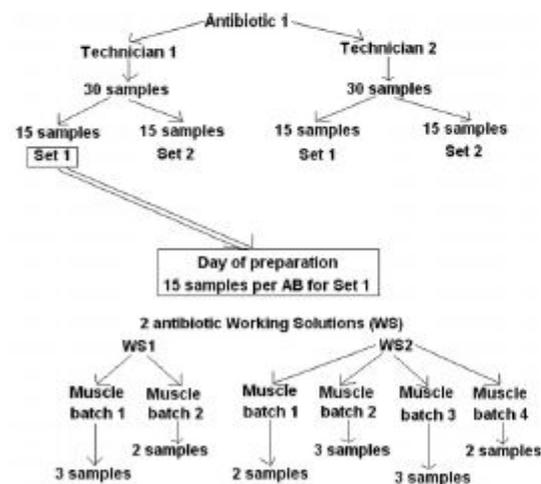


Figure 1. Preparation of the simulated tissues. Two technicians each prepared 30 samples per antibiotic (AB), divided in two sets of 15 samples each (Sets 1 and 2). The two sets were spaced out to introduce variability in the period of analysis (ambient conditions) and, therefore, variability of batches (media, bacteria, antibiotic standard, etc.). The example of preparation of Set 1 by technician 1 is presented here. Four different batches of porcine muscle were used. Two different working solutions (WS) were prepared from the stock solution of antibiotic and used to spike the different batches of muscle. Finally, 15 samples were prepared per antibiotic.

be similar: accepted deviation $\pm 25\%$). A variability of 25% is usually accepted with microbiological methods (for positive controls or spiked muscles). Moreover, this range of variability was observed during the validation in porcine muscle. The specificity of the STAR protocol with other species was also studied by the analysis of different blank muscle samples.

Ruggedness study

The ruggedness of the method was partly evaluated during the validation study, since different batches of media, bacterial strains, antimicrobial standards were used. In addition, two technicians were involved in the study, analysing each half of the samples and the variability between technicians could be estimated.

In Decision 2002/657/EC (European Commission 2002), ruggedness is defined as 'the susceptibility of an analytical method to changes in experimental conditions [...] under which the method can be applied as presented or with specified minor modifications'. A ruggedness study based on an experimental design was carried out and thus allowed the testing of analytical parameters which were different from those tested during the first step of validation. A full factorial design was chosen for the analysis of the effects and interactions of four independent factors (Renard et al. 1992). The design matrix is presented in Table 2.

Factors that may influence the measurement results were selected: bacteria concentration (A), medium quantity (B) in the plate, incubation time (C) and pre-incubation time at room temperature (D). These factors were modified in an order of magnitude

corresponding to the usual differences: factor A concentration in bacteria: $\pm 30\%$; factor B quantity of medium 5 ± 0.5 ml; factor C incubation time $\pm 10\%$; and factor D pre-incubation time (the period at room temperature before incubation in the incubator: 1 h of pre-incubation or no pre-incubation).

The ruggedness of the study was focused on six different representative antimicrobials which were specifically detected on each of the five plates on muscle: penicillin G at $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ and sulfadimethoxine at $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ on plate Bs1, doxycycline at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ on plate Bc6, erythromycin at $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ on plate Kv8, gentamicin at $6000 \mu\text{g kg}^{-1}$ on plate Bs8, and enrofloxacin at $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ on plate Ec8. The chosen concentrations were equal to the detection capabilities determined in the first part of the validation study for each of these antibiotics, except for gentamicin. The samples were prepared from pig muscle only. All blank and spiked minced muscle samples were prepared the day before starting the ruggedness study, and were frozen at -20°C . The study was performed blindly (codified samples). Then on each day of analysis (each run), four different blank materials and four different spiked materials per antibiotic were analysed.

Results and discussion

Specificity

Specificity and detection capabilities were determined for pig matrix because it is the most common species analysed in the laboratory. A total of 49 different batches of porcine muscle were tested. Few variations were observed. Of 176 analyses in total, only seven gave false-positive results (4%). These seven false-

Table 2. Design matrix of the ruggedness study.

Run	Levels	A ^a	B ^b	C ^c	D = ABC ^d	AB + CD	AC + BD	BC + AD
1	+	- ^c	-	-	-	+	+	+
2	+	+	-	-	+	-	-	+
3	+	-	+	-	+	-	+	-
4	+	+	+	-	-	+	-	-
5	+	-	-	+	+	+	-	-
6	+	+	-	+	-	-	+	-
7	+	-	+	+	-	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

Notes: Run 1 = day 1.

^aConcentration of bacteria.

^bMedium quantity.

^cIncubation time.

^dPre-incubation time.

^eEach factor was modified in an order of magnitude corresponding to the usual differences: factor A concentration in bacteria, $\pm 30\%$; factor B quantity of medium, 5 ± 0.5 ml; factor C incubation time, $\pm 10\%$; factor D pre-incubation time (period at room temperature before incubation in the incubator), 1 h of pre-incubation or no pre-incubation.

+, Increasing of the factor (i.e., $+30\%$); -, decreasing of the factor (i.e., -30%). AB + CD, AC + BD and BC + AD are the evaluation of the impact of the combination of the different factors.

positive results were obtained with five different muscle batches (two false-positive results for two batches and one false-positive result for each of three batches). All false-positive results appeared on the plate Bst, none on the other plates. The specificity of the STAR protocol for the detection of antimicrobial residues in porcine muscle was very satisfactory.

Detection capabilities

The results presented in Table 3 are those obtained from 60 samples for each antibiotic at at least one tested concentration.

For some antibiotics, after 15 or 30 analyses by one or two technicians, either it turned out that too many false-negative results were obtained at the selected concentration or oppositely the first tested concentration gave higher IZ than anticipated, suggesting that the validation could be performed at a lower concentration. At these concentrations, fewer than 60 samples were analysed; however, it was helpful for the determination of the detection capability.

Figure 2 shows the relationship between detection capabilities calculated for the 16 representative antibiotics and their respective MRLs. It allows one to quickly visualize the difference between $CC\beta$ and MRLs. The respective MRLs ($\mu\text{g kg}^{-1}$) are represented in plain bars. The hatched bars represent the respective $CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Therefore, the greater the hatched area, the less sensitive is the STAR protocol for the corresponding antibiotic. On the contrary, when the plain zone and hatched zone are very close, the sensitivity of the method for the corresponding antibiotic is satisfactory. When the $CC\beta$ is higher than $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, the value of the $CC\beta$ is written on the top of the corresponding bar.

As a conclusion, the detection capabilities of penicillin G, cloxacillin and doxycycline were equal to or lower than their respective MRLs. The detection capabilities of tylosin, sulfadimethoxine, oxytetracycline, trimethoprim, erythromycin, ceftiofur, enrofloxacin and cefquinome were between 1.5 and three times their respective MRLs. The detection capability of lincomycin was between four and five times its MRL. Finally, the detection capabilities of gentamicin (GTM) ($>40 \times \text{MRL}$), dihydrostreptomycin (DHS) ($>8 \times \text{MRL}$) and florfenicol ($>10 \times \text{MRL}$), were much higher than their respective MRLs. The STAR protocol is not suitable for the detection of the two aminoglycosides and probably not for the detection of the entire family, given the activity profiles obtained during the validation in milk (Gaudin et al. 2004). In fact, these activity profiles showed that GTM and DHS were the two aminoglycosides that were detected at the lowest concentrations, especially GTM. The sensitivities for GTM in milk ($\text{MRL} = 100 \mu\text{g l}^{-1}$) and to DHS

($\text{MRL} = 200 \mu\text{g l}^{-1}$) were equal to three and five times the respective MRLs. The sensitivities determined in milk for the other aminoglycosides were: neomycin $1500 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\text{MRL} = 1500 \mu\text{g l}^{-1}$), streptomycin $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\text{MRL} = 200 \mu\text{g l}^{-1}$), kanamycin $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\text{MRL} = 150 \mu\text{g l}^{-1}$), spectinomycin $40,000 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\text{MRL} = 300 \mu\text{g l}^{-1}$), paromomycin $2000 \mu\text{g l}^{-1}$ (not authorized in milk), and apramycin $4000 \mu\text{g l}^{-1}$ (not authorized in milk). Therefore, the sensitivities for GTM and DHS were much better in milk than in muscle.

During the determination of detection capabilities in porcine muscle, it was demonstrated that the STAR protocol could help in confirming the identity of a family of molecules present in the sample. Table 4 shows the plates on which each antibiotic reacted preferentially. Some antibiotics (e.g., cefquinome, ceftiofur, doxycycline, enrofloxacin and florfenicol) caused inhibitions on several plates at the tested concentrations (including $CC\beta$).

The results are obviously similar to the global orientation given in the STAR protocol: beta-lactams and sulphonamides were detected preferentially on plate Bst, tetracyclines on plate Bc6, quinolones on plate Ec8 and macrolides on plate Kv8. However, there were two exceptions. The aminoglycosides were detected on plate Bst with the concentrations tested for the determination of $CC\beta$, whereas for higher concentrations than $CC\beta$ they were detected on plate Bs8 (=Bs7.2). However, when the validation of the STAR protocol was performed in milk, Bs8 was the specific plate for the detection of aminoglycosides. Secondly, tylosin was detected preferentially on Bst instead of Kv8 at this concentration, which had already been observed during the validation of the STAR protocol in milk. Therefore, if a positive result is reported on plate Bst, the confirmation should be directed onto beta-lactams, sulphonamides, but also tylosin and aminoglycosides.

Applicability study

Given the unsatisfactory results for aminoglycosides ($>> \text{MRL}$), an additional study was conducted on GTM and DHS to choose one of these antibiotics and the good concentration for applicability and ruggedness studies. This study determined that the detection capability of GTM was around $4000 \mu\text{g kg}^{-1}$ and DHS around $6000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Therefore, GTM at $6000 \mu\text{g kg}^{-1}$ was chosen, a concentration higher than the estimated detection capability ($4000 \mu\text{g kg}^{-1}$) due to reading difficulties (partial inhibition zone (PIZ) and regrowth in the IZ).

Figure 3 shows the average IZ on the five different plates (Bst, Bc6, Kv8, Ec8 and Bs8) for blank muscles of different animal species and muscles spiked with five different antibiotics (each reacted specifically

Table 3. Detection capabilities $CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) for the 16 antimicrobials.

Antibiotic family	Antibiotic	MRL muscle ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mean IZ ^a (mm) \pm SD	Qualitative results	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Penicillins	Penicillin G	50	9.7 \pm 1.1	60+	≤ 25
	Cloxacillin	300	6.4 \pm 0.2	56+/4- (at 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Between 150 and 300
	Cefquinome	50	6.0 \pm 0.3	14+/1D (at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 60+ (at 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Between 100 and 200
Tetracyclines	Ceftiofur	1000	5.3 \pm 0.7	56+/2D/2-	1500
	Oxytetracycline (OTC)	100	5.1 \pm 0.5	60+	≤ 250
	Doxycycline	100	5.4 \pm 0.5	60+	≤ 100
Macrolides	Erythromycin	200	5.0 \pm 1.6	56+/1D/3-	400
	Tylosan	100	5.1 \pm 0.7	55+/3D/2-	200
	Enrofloxacin	100	5.9 \pm 1.9	8+/4D/3- (at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 60+ (at 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Between 100 and 200
Sulfonamides	Sulfadimethoxine (SDMX)	100	8.8 \pm 1.3	12+/1D/2- (at 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 59+/1D (at 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Between 200 and 300
	Sulfamethazine (SMZ)	100	5.4 \pm 2.5	37+/2D/21-	> 500
	Dihydrostreptomycin (DHS)	500	2.0 \pm 0.7	24+/3D/33-	> 4000
Aminoglycosides	Gentamicin (GTM)	50	4.3 \pm 0.4	45+/3D/12-	> 2000
	Lincomycin	100	5.8 \pm 0.6	60+ (at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Between 350 and 500
	Trimethoprim (TMP)	50	7.9 \pm 0.8	5+/10- (at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 59+ out of 59 (at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 8+/3D/19- (at 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 60+ (at 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Between 50 and 100
Miscellaneous	Florfenicol	300	4.8 \pm 0.2		Between 1000 and 3000

Notes: ^aIZ, inhibition zone (mm); +, positive result; -, negative result; D, doubtful result ($0 < \text{IZ} < 2$ mm), SD, standard deviation.

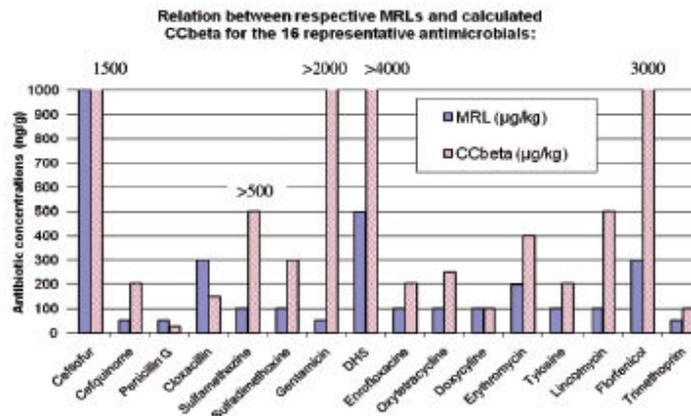


Figure 2. Relationship between the calculated detection capabilities and the respective MRLs of the 16 representative antibiotics. The 16 representative antibiotics are represented on the *x*-axis. The calculated $CC\beta$ of the 16 tested representative antimicrobials and the respective MRLs are represented on the *y*-axis. MRL, maximum residue limit.

Table 4. Specificity of the plates.

Antibiotic family	Antibiotic	Specific plate
Penicillins	Penicillin G	Bst
	Cloxacillin	Bst
Cephalosporines	Cefquinome	Kv8 (Bst and Ec8)
	Ceftiofur	Bst (and Ec8)
Tetracyclines	Oxytetracycline (OTC)	Bc6
	Doxycycline	Bc6 (and Bs8)
Macrolides	Erythromycin	Kv8
	Tylosin	Bst
Quinolones	Enrofloxacin	Ec8 (and Bst)
Sulfonamides	Sulfadimethoxine (SDMX)	Bst
	Sulfamethazine (SMZ)	Bst
Aminoglycosides	Dihydrostreptomycin (DHS)	Bst
	Gentamicin (GTM)	Bst
Lincosamides	Lincomycin	Bst
Miscellaneous	Trimethoprim (TMP)	Bst
	Florfenicol	Bs8 (Bc6 and Bst)

on one of the plates): penicillin G at $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ on Bst (Figure 3a), doxycycline at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ on Bc6 (Figure 3b), erythromycin at $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ on Kv8 (Figure 3c), enrofloxacin of $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ on Ec8 (Figure 3d) and gentamicin at $6000 \mu\text{g kg}^{-1}$ on Bs8 (Figure 3e). The results for the porcine muscle were those obtained during the determination of $CC\beta$ for four plates (Bst, Bc6, Kv8, Ec8) and during the additional study on aminoglycosides for plate Bs8.

The overall mean inhibition zone inter-species was equal to $9.0 \pm 1.3 \text{ mm}$, $5.2 \pm 1.0 \text{ mm}$, $5.2 \pm 1.4 \text{ mm}$, $6.1 \pm 1.1 \text{ mm}$ and $5.4 \pm 0.9 \text{ mm}$ for Bst, Bc6, Kv8, Ec8 and Bs8 respectively. Whichever was the tested antibiotic and the plate, the discrimination between blank and spiked samples was very clear and easy for each species. Moreover, the average IZ for cattle, sheep and poultry muscle was in the fixed interval of $\pm 25\%$

compared with the average IZ for porcine muscle for plates Bst, Bc6, Ec8 and Bs8. Concerning plate Kv8, the average IZ for cattle and sheep muscle was in the fixed interval of $\pm 25\%$ compared with the average IZ for porcine muscle. The poultry muscle was out of the interval for plate Kv8, but with an average IZ of 33% higher than the porcine muscle, so the sensitivity was better in poultry muscle.

Two blank samples of cattle, two sheep and two poultry were analysed for each plate and the analyses were repeated for 5 days. Over 10' cattle tested, two false-positive results, one for sheep and one for poultry on the Bst plate, were obtained. The blank bovine and ovine samples gave IZ of 3.7 ± 0.7 and $3.3 \pm 0.4 \text{ mm}$, higher than porcine ($1.8 \pm 1.4 \text{ mm}$) and poultry ($2.0 \pm 1.4 \text{ mm}$) blank samples. All blank samples gave non-specific inhibition on the plate Bst, higher than for

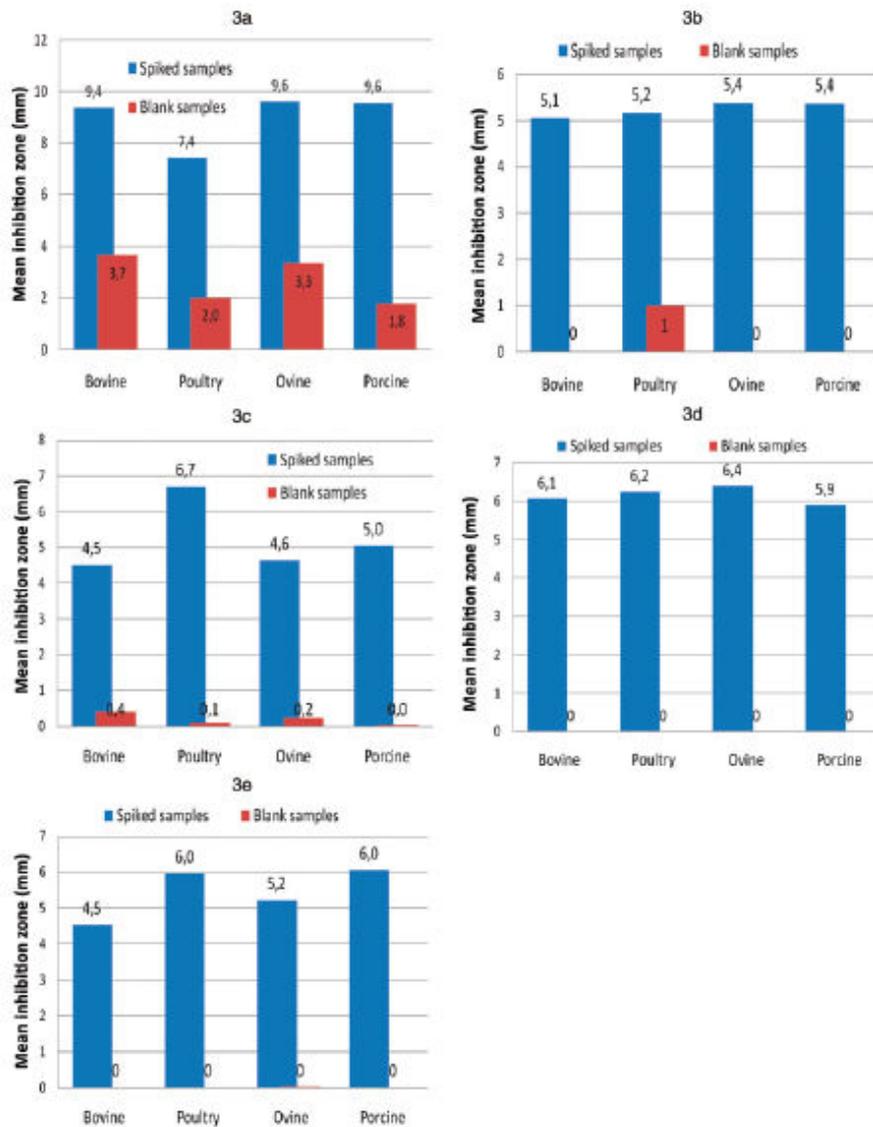


Figure 3. Results of the applicability study of the STAR protocol to muscles from different animal species, on the five different plates. The results of the applicability study for the five plates are represented: (a) penicillin G at 25 µg kg⁻¹ on plate Bst, (b) doxycycline at 100 µg kg⁻¹ on Plate Bc6, (c) erythromycin at 400 µg kg⁻¹ on Plate Kv8, (d) enrofloxacin of 200 µg kg⁻¹ on Plate Ec8, and (e) gentamicin at 6000 µg kg⁻¹ on Plate Bs8. The x-axis shows the four different animal species tested are represented. The y-axis shows the average inhibition zone (mm) on the five different plates obtained during the applicability study for bovine, ovine and poultry muscles; and during the determination of CCβ for porcine muscle are represented for blank samples and spiked samples.

the other plates. That is why the positivity threshold of the plate Bst was set at 4 mm, while the positivity threshold for the other plates was set at 2 mm (Fuselier et al. 2000). No false-positive results were obtained on the plate, whatever the species, on the four other plates.

In conclusion, the STAR protocol is applicable for the screening of antibiotic residues in the muscle of the four major species: pig, cattle, sheep, poultry and by extension the muscle of minor species, whatever is the plate.

Table 5. Comparison of the mean inhibition zones (IZ) and the standard deviations (SD) calculated during the determination of the $CC\beta$ and during the ruggedness study.

Antibiotic family	Antibiotic	Tested concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Plate	Mean IZ ^a (mm) \pm SD $CC\beta$	Mean IZ ^a (mm) \pm SD ruggedness
Penicillins	Penicillin G	25	Bst	9.7 \pm 0.2	8.5 \pm 1.2
Sulfonamides	Sulfadimethoxine (SDMX)	300	Bst	8.8 \pm 1.3	5.3 \pm 1.6
Tetracyclines	Doxycycline	100	Bc6	5.4 \pm 0.5	4.3 \pm 0.6
Macrolides	Erythromycin	400	Kv8	5.1 \pm 1.1	4.0 \pm 1.0
Quinolones	Enrofloxacin	200	Ec8	6.2 \pm 1.0	6.7 \pm 1.2
Aminoglycosides	GTM	6000	Bs8	6.0 \pm 0.7	6.2 \pm 0.5

Notes: ^aIZ, inhibition zone of the specific plate, mean of the values of the four sets (two technicians). SD, standard deviation.

Ruggedness study

During the determination of specificity and detection capabilities of the 16 antimicrobials, lots of different media (different preparation and validity date), different preparations of bacteria, and different batches of antibiotic standards were used over a period of 9 months of testing. Looking at the quantitative results (IZ) obtained by the two technicians on muscle samples, the variability (standard deviations) was rather low, similar to or lower than the variability that is fixed for the positive controls of the method. During this period, the positive controls were included in the intervals set in the STAR protocol. This is the first track to conclude that the STAR method is robust.

The average IZ and the standard deviations obtained during the ruggedness study and during the first part of the validation (determination of $CC\beta$) were compared and are presented in Table 5.

When the standard deviation in ruggedness conditions (SDi) is significantly larger than the standard deviation of the method in terms of reproducibility, the conclusion is predictable that all factors taken together have an impact on the results, even if no single factor has significant influence. In this case, the method is not sufficiently robust regarding the range of tested variations. From a quantitative point of view, we did not observe significant differences between the SD in ruggedness conditions and the SD during the first part of the validation for the six tested antibiotics. Therefore, the STAR protocol seemed to be robust for the five plates regarding the range of tested variations.

If we look at the mean IZ obtained at each day (run) during the ruggedness study to the mean IZ obtained during the determination of detection capabilities, it seemed that the sensitivity is very near, even if the average IZ were often lower during the ruggedness study. In fact, the average IZ of SDMX on plate Bst was significantly lower during the ruggedness study (Table 5). Therefore, some of the tested factors had an effect on the sensitivity.

Sulphonamides tested concentrations often gave PIZ, which are sometimes quite tricky to read for someone not trained in the technique. On the hand, beta-lactams usually gave clear IZ. Therefore, slight variations, like in the ruggedness study, even for trained people, lead to greater effect on these PIZ than on a clear IZ. Therefore, it is logical that the Bst plate is less robust for the detection of SDMX than for penicillin G.

The ruggedness of the STAR method was evaluated using an experimental design. The influence of the four factors (concentration of bacteria, quantity of medium, incubation time and pre-incubation time) on the mean IZ (quantitative result), repeatability (coefficient of variation, CV%), and false-positive and false-negative rate (qualitative result), as well as the interactions between factors, were evaluated (Table 2). The responses for each plate for each run (day) were indicated (mean IZ, CV% on the IZ, and false-positive and false-negative rates when influence was observed). From these results, the exploitation of the experimental design was performed. The results are presented in Table 6 for the six antibiotics and the five plates.

In conclusion, whatever the plates, there was no significant effect of the analytical factors tested on the qualitative results of the STAR method (no influence on the false-positive and false-negative rates), except for plate Bst with SDMX (Table 6). When testing SDMX, on day 4 the four tested samples gave false-negative results (Table 7). Therefore, it has a strong impact on the combination of factors tested that day: A+, B+, C-, D-, i.e., increasing the concentration of bacteria, increasing the amount of medium, reducing the incubation period, and without pre-incubation. In the optimization of microbiological methods, it is well known that increasing the concentration of bacteria or increasing the amount of medium may decrease the sensitivity of the plate. Moreover, as seen with other plates, a decrease of the incubation period can indeed reduce the sensitivity. It is also logical that a lack of pre-incubation may decrease the sensitivity of the plate. It was observed in fact that an increase of factors A and B may increase the

Table 6. Exploitation of the factorial design: influence of the four experimental factors on the detection of six tested antibiotics on the five plates of the STAR protocol.

		Factor				Interaction				Mean
Bc6	Response	A ^a	B ^b	C ^c	D ^d = ABC	AB + CD	AC + BD	BC + AD	I	
	Mean IZ	-0.12	-0.01	-0.15	0.05	-0.13	0.01	-0.16	4.32	
	CV (%)	-2.03	-3.08	5.23	2.75	2.91	-3.09	-1.88	11.21	
Kv8	Response	A	B	C	D = ABC	AB + CD	AC + BD	BC + AD	I	
	Mean IZ	-0.07	0.00	0.50 ^f	0.28	0.12	-0.41	0.22	3.97	
	CV (%)	-1.27	4.04	0.58	5.43	0.07	2.69	-1.93	16.07	
Ec8	Response	A	B	C	D = ABC	AB + CD	AC + BD	BC + AD	I	
	Mean IZ	-0.25	-0.58	-0.22	0.77	-0.45	-0.03	-0.33	6.72	
	CV (%)	0.38	0.97	-0.07	-1.14	-0.47	-0.08	1.88	4.82	
Bst SDMX	Response	A	B	C	D = ABC	AB + CD	AC + BD	BC + AD	I	
	Mean IZ	0.34	-0.38	0.17	0.92	-0.30	-0.03	0.91	5.30	
	CV	-0.26	0.15	-2.72	-0.01	0.25	-0.76	1.70	4.70	
	False+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	False-	0.50	0.50	-0.50	-0.50	0.50	-0.50	-0.50	0.50	
Penicillin	Mean IZ	0.25	-0.20	-0.44	0.02	0.59	-0.42	0.03	8.55	
	CV	-1.44	1.61	-2.91	1.74	-2.60	3.17	0.12	9.18	
	False+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	False-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Response	A	B	C	D = ABC	AB + CD	AC + BD	BC + AD	I	
Mean IZ	-0.11	0.00	0.03	0.02	-0.11	-0.23	0.00	6.16		
CV (%)	0.67	-0.84	0.65	0.53	0.01	0.14	0.81	6.07		

Notes: ^aConcentration of bacteria.^bMedium quantity.^cIncubation time.^dPre-incubation time.^fIncreasing the incubation time (C) for plate Kv8 increased the sensitivity of the plate a little (13%).

IZ, inhibition zone 5 mm; CV, coefficient of variation of the mean IZ (%); False+, false-positive rate; False-, false-negative rate. The mean false-negative rate is equal to 0.50, which means 50% of false-negative results.

Table 7. Ruggedness study for plate Bst: design matrix and experimental design calculation.

Run	Mean IZ SDMX	CV	False+	False-	Mean IZ Penicillin	CV	False+	False-
1	4.8	17.5	0	0	9.1	10.9	0	0
2	8.0	18.0	0	0	9.3	10.3	0	0
3	4.7	13.9	0	0	7.5	22.5	0	0
4	3.0	15.4	0	100 ^a	10.0	4.6	0	0
5	5.3	10.2	0	0	9.1	2.0	0	0
6	4.6	7.6	0	0	7.5	7.1	0	0
7	5.1	13.4	0	0	7.5	7.1	0	0
8	6.9	11.8	0	0	8.4	8.9	0	0

Notes: Run 1 = day 1.

^aA strong impact of the combination of factors tested on day 4 was observed on false-negative rate: A+, B+, C-, D-, i.e., increasing the concentration of bacteria, increasing the amount of medium, reducing the incubation period, and without pre-incubation.

IZ, inhibition zone (mm); False+, false-positive rate; False-, false-negative rate; CV, coefficient of variation (%) = (mean IZ)/(SD IZ)*100; SD, standard deviation.

false-negative rate, while an increase of the incubation time and pre-incubation of 1 h may increase the sensitivity. It is noticeable that 1 h of pre-incubation at room temperature increased the mean IZ of SDMX by 17%.

Regarding the classical variability of results of microbiological plate tests, none of the factors or

combination of factors had a significant effect on the mean IZ (quantitative result) for any of the tested antibiotics on the five plates. Finally, no significant effect was observed on the repeatability of the method. Moreover, slight changes in the CV never had an effect on the qualitative results of the test for the tested antibiotics.

Therefore, the STAR protocol is a robust method for the detection of antibiotic residues in muscle. Some recommendations are given in the STAR protocol concerning the different incubation periods for the five plates, because incubation time is already known to be a critical parameter. In the range recommended in the protocol, the method is robust. It should be noticed that increasing the incubation time for plate Kv8 increased the sensitivity of the plate of 13% (Table 6). This is the reason why a longer incubation time (at least 24 h) compared with the other plates is recommended in the STAR protocol. However, even at the lowest incubation time (21 h), the results were satisfactory.

Finally, it was demonstrated that a pre-incubation of 1 h at room temperature could have a positive effect on the sensitivity of the test (plates Ec8, Bst (SDMX), Kv8) or no effect (plates Bc6, Bs8, Bst (penicillin G)) compared with no pre-incubation. However, pre-incubation is not a critical parameter because if people do not apply a pre-incubation, the results would be satisfactory, and if pre-incubation is performed, the results would be equal or better. A recommendation of a pre-incubation of 1 h at room temperature should be added in the next version of the STAR protocol. Moreover, on every day of the analysis, specific positive control antibiotic paper discs are placed on each plate. The results of these positive controls should be included in the range given in the STAR protocol. If it is the case, the results are valid.

Discussion

At this time, very few laboratories have tried to validate their screening methods (microbiological or immunological methods) according to Decision 2002/657/EC (European Commission 2002) for two main reasons. Firstly, Decision 2002/657/EC gave very little information and no technical recommendations for the implementation of the validation of a screening method. Secondly, especially for the validation of microbiological plate tests, the validation requires a much work, is time consuming and is quite expensive. In our laboratory, which is the Community Reference Laboratory (CRL) for antibiotic residues, the validation of screening methods has been a subject of interest for many years. At this time, the validation of immunological tests and microbiological tests (tube tests and plate test) were performed in our laboratory according to European Decision 2002/657/EC (Gaudin et al. 2004, 2007; Gaudin, Hedou, Rault 2009; Gaudin, Hedou, and Verdon 2009). The former 'detection limit' was replaced by a new performance characteristic called 'detection capability $CC\beta$ '. To our knowledge, the other validation studies of microbiological plate tests according to the European

Decision (European Commission 2002) were from a National Reference Laboratory in the Netherlands (Pikkemaat et al. 2007, 2008; Pikkemaat, Oostrav van Dijk et al. 2009).

Regarding the time needed for this validation study, it would have been impossible to validate the STAR protocol for all the antibiotics having an MRL in muscle matrix (more than 50 antibiotics). The validation work would be too long, expensive and laborious. Therefore, the recommendation to use a list of representative antibiotics was a very good compromise and allowed to reduce drastically the scope of the validation. It has been proposed since the first version of the European guideline for the validation of screening method in 2005 to validate wide range tests only for a list of representative antibiotics. It was adopted in the final version of the guideline (Anon 2010). The choice of the representative antibiotics is not fixed and is dependent on different factors: the activity patterns of different antibiotics in one family, the matrix, the use of antibiotics in one specific country, and the assumed sensitivity of the method towards some antibiotics. The first step is to conduct a preliminary study that should allow one to determine a common pattern of activity for one family or at least several substances of the family on a specific class of bacteria. Therefore, one compound could be chosen to be representative of the other substances of the family in terms of the activity profile on bacteria. Then different antibiotics should be chosen, e.g., for milk or muscle matrices. In fact, the antibiotics used for intra-mammary treatment or for oral use could be different. Therefore, the interest of one antibiotic only used as an intra-mammary treatment is very limited for validation in muscle. Furthermore, if some antimicrobials are not used or not registered in some countries, there is no interest to validate for this compound if the method is intended for national control. Finally, the selected analytes are dependent of the analytical method. Therefore, if the method to validate clearly badly detect one antimicrobial, it is needless to determine its detection capability because this antibiotic would not be included in the scope of the method.

A similar proposition for validating a list of representative antibiotics was made by Pikkemaat, Oostrav van Dijk et al. (2009). After the determination of the activity profiles of 36 antibiotics for the NAT-post-screening test for the detection of antibiotic residues in kidney, the authors suggested that the validation could be performed on a list of representative antibiotics to reduce the scope of validation for routine field laboratories, for example.

One list of representative antibiotic was initially included as an example in the guideline which was extracted from the validation of the STAR protocol in milk (Gaudin et al. 2004). In fact, activity patterns were determined for 66 antimicrobials having an MRL.

in milk. The conclusion was that several antibiotics in one family could be gathered into one group because they showed similar activity profiles (the same specific plate, a similar sensitivity). Each family could be divided into two or more groups. Finally, one or two antibiotics per family were chosen because their activity patterns were representative of one or two groups of antimicrobials in the same family. Compared with this list of representative antibiotics, some molecules were replaced by others during the validation study of the STAR protocol for the following reasons.

Some antibiotics are only used as intra-mammary treatment (e.g., cefalonium was replaced by ceftiofur because ceftiofur is widely used in cattle and swine to treat respiratory diseases, while cefalonium is only administered intra-mammarily). Moreover, it was determined during the validation of the STAR protocol in milk (Gaudin et al. 2004) that the least detected cephalosporins were cefquinome (MRL = $50 \mu\text{g l}^{-1}$) and cefalexin (MRL = $200 \mu\text{g l}^{-1}$). Oppositely, the best detected cephalosporins were ceftazidime (Annex II for all tissues except milk) and cephapirin (MRL = $50 \mu\text{g l}^{-1}$). Finally, ceftiofur (MRL = $1000 \mu\text{g l}^{-1}$) was better detected than cefquinome, but less detected than ceftazidime. Therefore, we have chosen to validate for ceftiofur and cefquinome because one was the least detected antibiotic of the family, with a low MRL (cefquinome), and the other (ceftiofur) has an intermediary detection with a high MRL. Regarding the activity profiles on the STAR protocol, it was assumed that if cefquinome is detected at $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CC β), ceftazidime and cephapirin would be easily detected.

The antibiotic should be largely used in the country of implementation of the method (e.g., in France, sulfamethazine replaced sulfathiazole). Moreover, colistin, which belongs to the polymyxin family, was replaced by a second macrolide, tylosin, because macrolides are often used for animal treatment (cattle, swine, poultry).

During the development of the STAR protocol, it was already shown that the method had a very poor sensitivity for some antibiotics (e.g., flumequine, sulfaguanidine, colistin and spectinomycin), largely above the respective MRLs. Therefore, dihydrostreptomycin (DHS) replaced spectinomycin (level of detection in milk = $20,000\text{--}40,000 \mu\text{g l}^{-1}$). During validation of the STAR protocol in milk (Gaudin et al. 2004), the level of detection of colistin was included between 200 and 2000 times its MRL (MRL = $50 \mu\text{g l}^{-1}$ in milk and $150 \mu\text{g l}^{-1}$ in muscle). Therefore, the STAR protocol is not fitted to the detection of colistin or of spectinomycin.

Some antibiotics are frequently detected in routine monitoring of samples: the tetracyclines, particularly oxytetracycline (OTC). Thus, tetracycline was replaced by oxytetracycline and doxycycline was added instead

of flumequine. During the validation of the STAR protocol in milk, the limits of detection for OTC and TTC were both equal to $250 \mu\text{g l}^{-1}$ (Gaudin et al. 2004). The detection limits of doxycycline ($50 \mu\text{g l}^{-1}$) and CTC ($75 \mu\text{g l}^{-1}$) were better. Therefore, the tetracycline family was divided into two groups from which OTC (the least detected) and doxycycline (the best detected) were chosen as representative compounds.

In a similar way, penicillin and cloxacillin were chosen as the representative compound for the penicillin family because penicillin G (LOD = $5 \mu\text{g l}^{-1}$) was the best detected penicillin during the validation of the STAR protocol in milk, and cloxacillin (LOD = $60 \mu\text{g l}^{-1}$) was the least detected penicillin (Gaudin et al. 2004). Moreover, they belong to two groups of MRL (penicillin G = $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ in muscle and cloxacillin = $300 \mu\text{g kg}^{-1}$). Similarly, erythromycin (LOD = $30 \mu\text{g l}^{-1}$) and tilmicosin (LOD = $50 \mu\text{g l}^{-1}$) were the best detected macrolides in milk. On the contrary, tylosin (LOD = $200 \mu\text{g l}^{-1}$) was the least detected and was representative of the group of spiramycin (LOD = $300 \mu\text{g l}^{-1}$) and neospiramycin (LOD = $200 \mu\text{g l}^{-1}$). Moreover, they also belong to two groups of MRL (tylosin = $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ and erythromycin = $200 \mu\text{g kg}^{-1}$). Concerning quinolones, enrofloxacin was considered as being representative of the quinolones family, except flumequine. In fact, flumequine is usually badly detected by many microbiological methods. When the STAR protocol was validated in milk, it was observed that enrofloxacin (LOD = $20 \mu\text{g l}^{-1}$), ciprofloxacin ($10 \mu\text{g l}^{-1}$), marbofloxacin ($30 \mu\text{g l}^{-1}$) and danofloxacin ($15 \mu\text{g l}^{-1}$) had the same activity profiles, with similar sensitivities (Gaudin et al. 2004). The quinolone that was badly detected was flumequine ($>600 \mu\text{g l}^{-1}$). During validation in milk, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfadoxine, sulfacetamide, and sulfaquanidine were the least sensitive sulphonamides (3.5–20 times the MRL (MRL = $100 \mu\text{g l}^{-1}$)) and the most sensitive sulphonamides were sulfaphenazole, sulfathiazole, and sulfachloropyridazine (MRL). The LODs of sulfadimethoxine (SDMX) (1.75 times the MRL) and sulfamethazine (2.5 times the MRL) were in between. The choice of sulphonamide was not based on the least detected compounds because it was too far from the MRL but was focused on two antibiotics that had intermediary sensitivities. Moreover, these two sulphonamides are commonly used for animal treatment. Concerning the aminoglycosides, gentamicin in milk was the best detected antibiotic (LOD = $300 \mu\text{g l}^{-1}$) and spectinomycin was the least detected aminoglycoside ($20,000\text{--}40,000 \mu\text{g l}^{-1}$). The LOD for neomycin, kanamycin, streptomycin and DHS was $1000 \mu\text{g l}^{-1}$. Therefore, DHS is representative of the three other aminoglycosides. Lincomycin was detected at $350 \mu\text{g l}^{-1}$ and pirlimycin at $100 \mu\text{g l}^{-1}$. Therefore, lincomycin was

the least detected and is representative of the detection of lincosamides.

The specificity of the STAR protocol for the detection of antimicrobial residues in porcine muscle was very satisfactory. A similar result was obtained by Pikkemaat et al. (2009) when implementing the STAR protocol on routine monitoring muscle samples in a comparative study. Only 1% of false-positive results were observed (6/591), on plate Bst, after the analyses of 591 routine monitoring samples, when the cut-off was set at 4 mm, which is the recommended cut-off in the STAR protocol for the plate Bst.

The results were obviously similar to the global orientation given in the STAR protocol: beta-lactams and sulphonamides were detected preferentially on plate Bst, tetracyclines on plate Bc6, quinolones on plate Ec8, and macrolides on plate Kv8. However, there were two exceptions. The aminoglycosides were detected on plate Bst with the concentrations tested for the determination of CC β , whereas for higher concentrations than CC β , they were detected on plate Bs8 (=Bs7.2). However, when the validation of the STAR protocol was performed in milk, Bs8 was the specific plate for the detection of aminoglycosides. Secondly, tylosin was detected preferentially on Bst instead of Kv8 at this concentration, which had already been observed during the validation of the STAR protocol in milk. Therefore, if a positive result is reported on plate Bst, the confirmation should be directed onto beta-lactams, sulphonamides, but also tylosin and aminoglycosides. A comparative study of three microbial screening tests including the STAR protocol applied to routine monitoring samples (Pikkemaat, Rapallini et al. 2009) has similarly shown that a macrolide (tulathromycin) was preferentially detected on plates Bc6 and Bst instead of plate Kv8. Therefore, if no tetracyclines could be confirmed in a positive sample on plate Bc6, the confirmation could be directed towards tulathromycin. During this comparative study, the STAR protocol was able to detect the four MRL samples that contained antibiotic concentrations higher than their respective MRLs. Three of them were tetracyclines, detected preferentially on plate Bc6, and the remaining residue was sulfadiazine at 172 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No information was available for beta-lactams, macrolides and quinolones because none of these families was found in the routine monitoring samples. The NAT-screening test was able to detect four samples containing aminoglycosides, but not the STAR protocol because this method is not enough sensitive towards the aminoglycoside family. Furthermore, the NAT-screening test is applied to kidney, while the STAR protocol is recommended for muscle. Moreover, it is well known that aminoglycosides concentrated in kidney, while very low concentrations could be found in muscle. The muscle

matrix is not a satisfactory matrix for the screening of aminoglycosides. The results of this comparative study are in accordance with our validation data.

The detection capabilities were determined for 16 antibiotics from different families in relation to their respective MRLs. The levels of detection of beta-lactams (penicillins and cephalosporins \leq MRL) were very satisfactory because even the least detected compound was detected at or below the MRL. Concerning tetracyclines, OTC (the least detected) could be detected at levels below 2.5 times the MRL and doxycycline (the best detected) at the MRL. The levels of detection of macrolides (2 MRL), quinolones (\leq 2 MRL) and trimethoprim (2 MRL) were also satisfactory even for the least detected compound. The levels of detection of one representative sulphonamide SDMX (\leq 3 MRL) were slightly higher than in milk. Finally, the sensitivity of the STAR protocol towards aminoglycosides and florfenicol was not satisfactory ($>$ MRL). Therefore, interest in plate Bs8 in the STAR protocol can be discussed. This plate should be improved for its sensitivity or should be replaced by another plate. Other possibility is to use a complementary method focused on aminoglycosides which could replace the use of this fifth plate.

The validation of the microbiological plate test is also a complex issue because of the solid matrices such as muscle and kidney. In fact, the ideal solution would be to produce incurred samples from animal treatment for all antibiotics having an MRL in the corresponding matrix and to validate all these antibiotics. However, this is extremely time consuming and expensive. Furthermore, it is really difficult to obtain exactly a target concentration after the treatment of animals. Therefore, there are different possibilities to implement the validation of a microbiological plate test.

The first option is to use spiked paper discs to determine the sensitivity of the method from antibiotic standard solutions (Koenen-Dierick et al. 1995; Calderon et al. 1996; Currie et al. 1998; Ferrini et al. 2006). The main advantages are that this solution is less expensive and quicker. The validation could be implemented for a wide list of antibiotic residues. However, matrix components could affect the detection capabilities of a method. Okerman, De Wasch et al. (1998) showed that only tetracyclines and quinolones were similarly detected with or without tissue. However, the detection of beta-lactams was better with antibiotic spiked discs without tissue than with tissues. For some antibiotics, the difference was only observed at low concentrations. Therefore, the use of antibiotic spiked discs is not totally satisfactory.

The second possibility is to use monitoring routine samples (Okerman, Van Hoof et al. 1998; Pikkemaat, Rapallini et al. 2009; Schneider et al. 2009). Routine samples from monitoring plans were analysed with different methods including the method to be validated

(including one or several physico-chemical confirmatory methods). The first disadvantage is that the number of samples containing residues is unknown. Moreover, very powerful confirmatory methods are needed to confirm all the samples, preferably even negative results at the screening step to check the false-negative rate of the screening test. Therefore, it is also costly and time consuming. Finally, only a narrow range of antibiotics (those which are most frequently used in the country) is encountered. Schneider et al. (2009) confirmed the presence of antibiotics in 29 samples, from which 23 belonged to the tetracycline family. This kind of validation led very to interesting information about the method, its practicability in routine conditions and some information on its performance, but the results are limited by the range of antibiotics and their concentrations.

Sometimes the validation study combined spiked discs and analyses of incurred materials, resulting from animal treatment (Myllyniemi et al. 1999, 2001). In this case, the authors used the activity patterns of antibiotic standard solutions to identify antibiotic residues in incurred materials. Furthermore, the STAR protocol was validated in our laboratory using spiked paper discs, plus analysing field routine samples. The interest of spiked discs is that many antibiotics at many concentrations could be tested, but the limitation is that no matrix effect could be observed. It is interesting to obtain preliminary data on the evaluation of a new method and activity profiles of many antibiotics. But we know that the matrix will affect the detection capabilities of the method. Therefore, field samples are very interesting because they are incurred materials and the matrix effect could be demonstrated. However, the limitation is that it is not known in advance how many positive samples are in the panel of field samples, which antibiotics would be detected and at which concentrations. Moreover, another limitation is that a little variety of antibiotic residues or families are usually found, depending on the matrix. Okerman et al. (2004) used artificially contaminated (spiked tissue fluid) as well as incurred samples for the comparative study of four screening methods for the detection of tetracyclines in muscle matrix. This approach is also interesting because the matrix effect could be observed both with spiked tissue fluid and incurred tissue.

The third possibility is the use of 'simulated tissues' as it is proposed in this paper. It seemed to be a good compromise between spiked discs and incurred tissues and the nearest preparation from intact muscles because the matrix effect can be evaluated. For the validation of a microbial screening assay, Pikkemaat et al. (2007) used two different approaches to produce fortified tissues. Firstly, spiked minced was heated and centrifuged to extract meat juice (supernatant) which was applied directly onto the plate. Secondly, incurred

tissues were transformed into powder (using liquid nitrogen and blending the meat) and meat juice was extracted. Therefore, it was possible to obtain accurate concentrations in the samples by mixing incurred and blank materials. One conclusion was that 'the sensitivity of the assay for quinolones decreased two fold when matrix samples are analysed' by comparison with antibiotic standard solutions. In these conditions, the matrix effect was taken into account. Moreover, these two approaches are fit for this screening test because in a routine meat juice samples would also be analysed. However, that sample preparation differed a lot from the routine application of the STAR protocol which is based on pieces of raw muscle laid directly on the plates. Therefore, in our case, the 'simulated tissues' appeared to be as near as possible from real muscle samples. The binding of antibiotics to the minced tissue is possible during spiking. Pikkemaat et al. (2009) validated the NAT-post-screening test for the detection of antibiotic residues in kidney by determining the detection capabilities of 36 antibiotics in porcine as well as in homogenized fortified kidney samples (Pikkemaat, Oostra-van Dijk et al. 2009). After centrifugation, the supernatant was analysed. The same final treatment was applied to routine monitoring samples. This is another way of preparing simulated tissues.

Decision EC/2002/657 (European Commission 2002) has no recommendation concerning the kind of materials to be analysed (spiked or incurred matrix) during the validation. Therefore, all the previous validation studies could be in accordance with the European Decision if the way of determining performance characteristics was respected. The most important thing is to keep as close as possible to the materials analysed in routine use by the concerned method. Now the guideline for the validation of screening methods (Anon 2010) recommends the use of 'simulated tissues' (spiked tissues) when it concerns solid matrices and when it is impossible to obtain incurred tissues. Moreover, the validation could be restricted to a list of representative antibiotics. The validation, which was performed in the past on field samples, led to very interesting information concerning the method. However, this kind of validation does not fit in with Decision EC/2002/657 and with the recommendations of the validation guideline (Anon 2010). In fact, the number of antibiotics tested is always very restricted. Moreover, the number of samples to be analysed to determine the detection capabilities of antibiotics is never respected.

As a conclusion, there is no ideal way of validating microbiological plate tests that would not be time and money consuming. Obviously, validation of these kinds of methods needs a lot of effort from the laboratory that would validate the protocol for the first time (initial validation). In the guideline for the validation of screening methods (Anon 2010), one of

the recommendations is to reduce the work of validation when the method is transferred to another laboratory which would want to implement it in routine conditions. In fact, the number of samples to be analysed is reduced. The performance characteristics (e.g., detection capabilities) determined in the transfer laboratory have to be compared with those determined during the initial validation for a selected range of antibiotics. Then the participation to proficiency testing studies could complete the validation dossier.

Conclusions

The two objectives of this validation study were fulfilled. Firstly, the STAR protocol was validated for muscle by determining performance characteristics (specificity, detection capabilities $CC\beta$ for 16 representative antimicrobials, applicability, ruggedness), according to European Decision 2002/657/EC (European Commission 2002). The STAR protocol is applicable to the broad-spectrum detection of antibiotic residues in muscles of different animal species (pig, cattle, sheep, poultry). The method has good specificity (false-positive rate=4%). The detection capabilities were determined for 16 antibiotics from different families in relation to their respective MRLs: beta-lactams (penicillins and cephalosporins \leq MRL), tetracyclines (\leq MRL and ≤ 2.5 MRL), macrolides (2 MRL), quinolones (≤ 2 MRL), some sulphonamides (≤ 3 MRL), and trimethoprim (2 MRL). However, the sensitivity of the STAR protocol towards aminoglycosides and florfenicol was not satisfactory ($>>$ MRL). Finally, this study has shown that the STAR method is a robust screening method, insensitive to reasonable variations analytical parameters such as the concentration of bacteria, the amount of medium, the incubation period, and pre-incubation or not.

Secondly, the applicability of the European guideline (Anon 2010) to the validation of a microbiological screening method and for muscle was demonstrated. The use of 'simulated tissue' appeared to be a very good compromise between antibiotic spiked discs and incurred samples. Moreover, the choice of a list of representative antimicrobials was also very interesting to reduce the scope of validation.

References

- Anon. 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer of method). Document of 21 January 2010.
- Calderon V, Gonzalez J, Diez P, Berenguer JA. 1996. Evaluation of a multiple bioassay technique for determination of antibiotic residues in meat with standard solutions of antimicrobials. *Food Addit Contam.* 13:13-19.
- Currie D, Lynas L, Kennedy DG, McCaughey WJ. 1998. Evaluation of a modified EC Four Plate Method to detect antimicrobial drugs. *Food Addit Contam.* 15:651-660.
- European Commission. 1990. Council Regulation (EEC) No. 2377/90. 26 June 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Comm. L.* 224:1-8.
- European Commission. 1996. Council Directive (EEC) No. 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products. *Off J Eur Comm. L.* 125:10-32.
- European Commission. 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off J Eur Comm. L.* 221:8-36.
- European Commission. 2009. Council Regulation (EEC) No. 470/2009 of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No. 2377/90. *Off J Eur Comm. L.* 152:11-22.
- Ferrini AM, Mannoni V, Aureli P. 2006. Combined plate microbial assay (CPMA): a 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Food Addit Contam.* 23:16-24.
- Fuselier R, Cadieu N, Maris P. 2000. S.T.A.R.: Screening test for antibiotic residue in muscle. Results of a European collaborative study. In: van Ginkel LA, Ruiter A, editors. *Proceedings of the Euroresidue IV Conference*. Bilthoven (the Netherlands): National Institute of Public Health (RVM). p. 444.
- Gaudin V, Hedou C, Rault A, Sanders P, Verdon E. 2009. Comparative study of 3 screening tests, Explorer[®] test, Premi[®]Test 2 microbiological tube tests and a multi-sulphonamides ELISA kit, for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs. *Food Addit Contam.* 26(4):427-440.
- Gaudin V, Hedou C, Sanders P. 2007. Validation of a Biacore method for screening eight sulfonamides in milk and porcine muscle tissues according to European Decision 2002/657/EC. *J AOAC Int.* 90(6):1706-1715.
- Gaudin V, Hedou C, Verdon E. 2009. Validation of a wide-spectrum microbiological tube test, the EXPLORER[®] test, for the detection of antimicrobials in muscle from different animal species. *Food Addit Contam.* 26(8):1162-1171.
- Gaudin V, Maris P, Fuselier R, Ribouchon JL, Cadieu N, Rault A. 2004. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a Five-Plate Test, for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Addit Contam.* 21:422-433.
- Koenen-Dierick K, Okerman L, De Zutter L, Degroodt JM, Van Hoof J, Srebniak S. 1995. A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method? *Food Addit Contam.* 12:77-82.

- Myllyniemi AL, Nuotio L, Lindfors E, Rannikko R, Niemi A, Backmann C. 2001. A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples. *Analyst*. 126:641–646.
- Myllyniemi AL, Rintala R, Backman C, Niemi A. 1999. Microbiological and chemical identification of antimicrobial drugs in kidney and muscle samples of bovine cattle and pigs. *Food Addit Contam.* 16:339–351.
- Okerman L, Croubels S, Cherlet M, De Wasch K, De Backer P, Van Hoof J. 2004. Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. *Food Addit Contam.* 21:145–153.
- Okerman L, De Wasch K, Van Hoof J. 1998. Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix. *Analyst*. 123:2361–2365.
- Okerman L, Van Hoof J, Debeuckelaere W. 1998. Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *J AOAC Int.* 81:51–56.
- Pikkemaat MG, Mulder PPJ, Elferink JWA, De Cocq A, Nielen MWF, Van Egmond HJ. 2007. Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. *Food Addit Contam.* 24(8):842–850.
- Pikkemaat MG, Oostra-van Dijk S, Schouten J, Rapallini M, Kortenhoeven L, van Egmond HJ. 2009. Nouws antibiotic test: validation of a post-screening method for antibiotic residues in kidney. *Food Control.* 20:771–777.
- Pikkemaat MG, Oostra-van Dijk S, Schouten J, Rapallini M, van Egmond HJ. 2008. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: the Nouws antibiotic test (NAT-screening). *Food Contr.* 19:781–789.
- Pikkemaat MG, Rapallini MLBA, Oostra-van Dijk S, Elferink JWA. 2009. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Analytica Chimica Acta.* 637:298–304.
- Renard L, Moulin G, Sanders P. 1992. Using experimental design to optimize a diffusion assay. *J AOAC Int.* 75(6):1045–1048.
- Schneider MJ, Mastovska K, Lehotay Lightfield A, Kinsella Shultz C. 2009. Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. *Analyt Chim Acta.* 637:290–297.

V. ARTICLE 5

EVALUATION AND VALIDATION OF A MULTI-RESIDUE METHOD BASED ON BIOCHIP TECHNOLOGY FOR THE SIMULTANEOUS SCREENING OF SIX FAMILIES OF ANTIBIOTICS IN MUSCLE AND AQUACULTURE PRODUCTS

Valérie Gaudin, Céline Hédou, Christophe Soumet, Eric Verdon

Food Additives and Contaminants: Part A

Contexte

Dans l'Union Européenne, aucun médicament vétérinaire contenant des antibiotiques n'est autorisé en apiculture. Aucun antibiotique ne possède de Limite Maximale de Résidu (LMR) dans le miel. Un document Européen rédigé par les laboratoires de Référence de l'Union Européenne a fixé des concentrations réglementaires à atteindre au minimum pour quelques antibiotiques (CRL Guidance paper of 7th December 2007) [320]. Les méthodes de dépistage doivent permettre de détecter les résidus d'antibiotiques au niveau ou en dessous des concentrations réglementaires quand elles existent ou au niveau le plus bas possible quand il n'y a pas de concentration réglementaire. Le dépistage des résidus d'antibiotiques dans le miel est le plus souvent réalisé au moyen de plusieurs kits en parallèle (ELISA, tests récepteurs) ou par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM/SM). Ces méthodes sont souvent spécifiques d'un antibiotique ou d'une famille (ELISA) et peuvent être coûteuses (CL-SM/SM). Un système innovant de biocapteur multiplex appelé Evidence Investigator® (Randox, Royaume-Uni) permet le dépistage simultané de plusieurs antibiotiques ou familles d'antibiotiques. Ce système basé sur des biopuces greffées avec des anticorps utilise la chimiluminescence comme outil de détection, grâce à un immunoessai compétitif. Le kit Multi-array AM II est capable de détecter 6 familles d'antibiotiques (quinolones, tétracyclines, tylosine/tilmicosine, streptomycine/dihydrostreptomycine, thiamphénicol/florfénicol et ceftiofur) dans différentes matrices. Dans cette étude, nous avons utilisé l'approche critères du guide Européen de validation des méthodes de dépistage (2010) pour valider le kit AM II dans le miel.

Méthodologie/Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons réalisé une évaluation des performances du kit. Puis nous avons réalisé une validation du kit selon la décision Européenne 2002/657/CE et selon le guide Européen de validation des méthodes de dépistage (2010).

L'évaluation du plus bas niveau détecté a été réalisée sur 6 antibiotiques, les moins sensibles pour chacune des 6 familles et sur 6 antibiotiques présentant un taux de réactions croisées de 100% (les mieux détectées). De plus, lors de l'évaluation, plusieurs antibiotiques ont été testés individuellement et les mêmes antibiotiques en mélange, pour voir si des interférences entre les différentes familles étaient mises en évidence (spots). Ensuite la validation a consisté à déterminer les caractéristiques de performance (spécificité, capacités de détection CC β , applicabilité, réactions croisées) et de comparer ces caractéristiques à des critères de performance attendus.

Figure 50. Protocole expérimental réalisé pour la validation du kit AM II dans le miel.

60 échantillons blancs différents



Analysés 1 fois avec kit AM II



Spécificité/taux de faux positifs/applicabilité



Seuil de positivité T

60 échantillons blancs différents
supplémentés avec 6 antibiotiques à la
concentration cible



Analysés 1 fois avec kit AM II



CCβ/applicabilité



Valeur de cut-off Fm

3 échantillons blancs
différents supplémentés
à 3 concentrations



Analysés 3 fois avec kit
AM II



Réactions croisées



% de réactions croisées

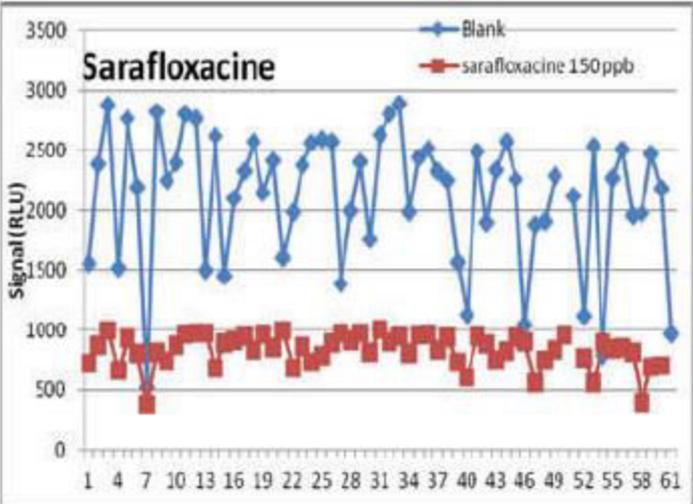
L'étude de la praticabilité a permis de vérifier la facilité d'utilisation associée avec le matériel nécessaire, les réactifs, les instruments et les conditions environnementales. La spécificité / taux de faux-positifs ont été déterminés à partir de 60 lots différents de miel blancs (exempt d'antibiotiques) issus de l'agriculture biologique (commerce) ou des plans de contrôle (2010, 2011) (différentes origines florales, différentes couleurs, différentes textures, différents niveaux de cristallisation) (**Figure 50**). Le seuil de positivité T a été calculé à partir des résultats (signal en RLU) des 60 échantillons blancs ($T = \text{moyenne blancs} - 1.64 * \text{écart-type blancs}$). Les capacités de détection ont été déterminées pour les 6 antibiotiques les moins sensibles, en analysant 60 échantillons de miel différents supplémentés à la concentration cible pour chaque antibiotique (sarafloxacin, desfurouyl ceftiofur cysteine disulfide (DCCD), thiamphénicol, streptomycine, tilmicosine et doxycycline) (**Figure 51**). La valeur de cut-off Fm a été calculée à partir des résultats (signal en RLU) des 60 échantillons supplémentés pour chaque antibiotique ($T = \text{moyenne supplémentés} - 1.64 * \text{écart-type supplémentés}$). Pour qu'un essai soit valide, le facteur Fm doit toujours être inférieur au facteur T. Les réactions croisées pour les molécules de la même famille ont été déterminées à partir de 3 échantillons. Chaque mélange a été préparé à 3 concentrations et chaque concentration a été analysée 3 fois. L'applicabilité du kit à différents types de miel (monofloral ou multifloral, fleurs différentes, liquide ou solide, etc), a été étudiée, en déterminant les $CC\beta$ des antibiotiques à partir de 60 échantillons différents.

L'évaluation nous a permis de conclure qu'il n'y a pas d'interactions entre les différents spots et qu'on pouvait donc mélanger 6 antibiotiques de familles différentes. De plus, on a pu choisir la concentration cible pour déterminer les $CC\beta$.

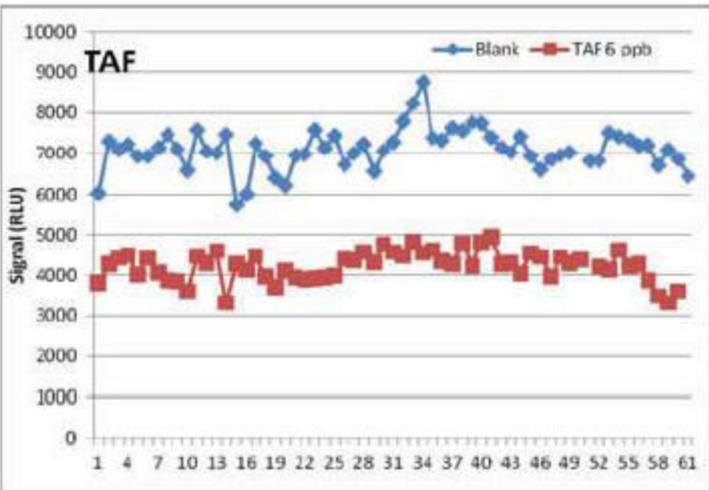
Concernant la praticabilité du test, la préparation de l'échantillon est simple et rapide (simple dilution du miel dans du tampon). L'applicabilité du kit AM II à différents types de miel (monofloral ou multifloral, origines florales différentes, liquide ou solide, ...) a été prouvée par l'analyse de 60 échantillons négatifs (blancs) et en déterminant les $CC\beta$ des antibiotiques à partir de 60 échantillons différents. Toutefois, une restriction doit être apportée concernant le dépistage des quinolones. En effet, 4 résultats faux-positifs ont été obtenus pour les quinolones (6.7%), uniquement pour des miels de châtaignier et multifloraux. Ce type de miel pourrait contenir une substance naturelle qui interfère avec le dépistage des quinolones. Cette substance a probablement une structure proche des quinolones. Cette hypothèse devra être confirmée lors d'un projet ultérieur. Les capacités de détection obtenues pour les 6 antibiotiques les moins bien détectés sont les suivantes : la sarafloxacin 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, le DCCD 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, le thiamphénicol 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la streptomycine 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (concentration recommandée pour la streptomycine 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$), la tilmicosine 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (concentration recommandée 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la tylosine et l'érythromycine) et la doxycycline (concentration recommandée pour les tétracyclines 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Globalement on a retrouvé des capacités de détection un peu plus élevées que celles annoncées par le fabricant, sauf pour la doxycycline.

Figure 51. Distribution des résultats (signaux en RLU) pour les 60 échantillons de miel blancs et les 60 échantillons supplémentés avec la sarafloxacine et le thiamphénicol (TAF).

(1a) Distribution of the results in RLU for the 60 negative samples and the 60 samples spiked with sarafloxacin at 150 ppb



(1c) Distribution of the results in RLU for the 60 negative samples and the 60 samples spiked with thiamphenicol at 6 ppb.



Relative resonance unit : RLU

Les réactions croisées calculées (%) sont proches de celles annoncées par le fabricant, mais elles n'ont pas été déterminées dans la même matrice. A partir des réactions croisées, les CC β estimés des antibiotiques testés ont été calculés à partir des CC β des 6 antibiotiques qui ont été validés à partir des 60 échantillons supplémentés. De plus, les antibiotiques suivants ne sont pas détectés : céphapirine, céphalonium, florfenicolamine, chloramphénicol, néomycine, bacitracine, paromomycine, spectinomycine, érythromycine, spiramycine, néospiramycine, gamythromycine. Aucun des sulfamides n'est détecté par le kit AM II.

La validation a montré que le test permet le dépistage de 7 quinolones au minimum, avec une capacité de détection de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la sarafloxacinine (la moins bien détectée des quinolones). Les CC β estimés des tétracyclines et de leurs épimères sont bien inférieures aux concentrations recommandées, sauf pour la doxycycline (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), qui présente moins d'intérêt dans le miel. De plus, les CC β estimés ou calculés pour les 4 autres familles d'antibiotiques sont compris entre 6 et 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les antibiotiques d'intérêt et inférieurs aux concentrations recommandées quand elles existent.

D'autres méthodes ont été validées auparavant au laboratoire et utilisées pour certaines dans la mise en place du plan de contrôle français de 2010 à 2013. Le kit AM II est plus performant que le test en bandelettes Tetrasensor® (Unisensor, Belgique) [48] puisqu'il permet de détecter les trois tétracyclines principales et leurs 4-épimères, en dessous des concentrations recommandées. Concernant les macrolides et les aminosides, les performances du kit AM II étaient similaires à celles des deux kits ELISA validés et utilisés précédemment, sauf que l'AM II peut détecter la tilmicosine [61]. De plus, une d'extraction liquide-liquide était nécessaire pour l'application des deux kits ELISA, alors qu'une simple dilution du miel est nécessaire avec le kit AM II.

Deux tests de dépistage microbiologique basés sur l'inhibition de la croissance de *Bacillus stearothermophilus*, auraient pu être compétitifs avec le kit AM II, en raison de leur large spectre de détection. Ces méthodes ont aussi été validées au laboratoire [321]. Cependant, le kit Eclipse® 50 (Zeu Immunotech, Espagne), malgré un taux de faux-positifs de 5 %, présentait des capacités de détection supérieures aux concentrations recommandées quand elles existent, pour 16 antibiotiques de 5 familles (tétracyclines, macrolides, sulfamides, pénicillines et lincosamides). L'autre kit, le Premi®Test (r-Biopharm, Allemagne) a présenté un taux élevé de résultats faux positifs (14%). De plus, les capacités de détection, inférieures aux concentrations recommandées pour un grand nombre des antibiotiques d'intérêt (tétracyclines, sulfamides et macrolides), étaient cependant supérieures pour la streptomycine et la dihydrostreptomycine.

Conclusions/Importance

Ce système innovant de biocapteur multiplex a pu être validé suivant l'approche critère par critère préconisée par la décision européenne 2002/657/CE [13] et selon le guide Européen de validation des méthodes de dépistage [256]. L'utilisation des valeurs seuils T et Fm pendant la validation, puis en routine (avec des Contrôles Qualité), est tout à fait pertinente pour ce type de méthode immunologique (comme en ELISA).

Les résidus d'antibiotiques les plus fréquemment retrouvés dans le miel sont les tétracyclines, les sulfamides, les macrolides, les quinolones et les aminosides. La validation a permis de démontrer que ce nouveau système et plus particulièrement le kit AM II permet de dépister dans des échantillons de miel d'origines différentes au moins 22 résidus d'antibiotiques provenant de 6 familles différentes (dont 4 familles d'intérêt) en dessous des concentrations réglementaires quand elles existent. Cette validation a prouvé clairement que cette méthode est tout à fait adaptée pour le contrôle du miel en routine. C'est pourquoi le kit AM II est à présent utilisé pour réaliser le plan de contrôle miel français en remplacement de 2 tests ELISA et un test récepteur. Les avantages majeurs du kit AM II sont le dépistage simultané des six familles d'antibiotiques et l'identification de la famille. La mise en place du kit AM II, en remplacement de deux kits ELISA et d'un test bandelette, représente en outre une économie de temps et d'argent, malgré l'investissement nécessaire dans le système et le coût des kits. De plus, un autre kit appelé AM I pour le dépistage de 14 sulfamides et du triméthoprime dans le miel est appliqué en parallèle de ce test pour compléter le spectre de détection.

Evaluation and validation of biochip multi-array technology for the screening of six families of antibiotics in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines

Valérie Gaudin*, Celine Hedou, Christophe Soumet and Eric Verdon

ANSES, Laboratoire de Fougères, Fougères Cedex, France

(Received 24 February 2014; accepted 4 August 2014)

The main chemicals used against varroa are acaricides, and the antibiotics used for the control of bee bacterial diseases are mainly tetracyclines, streptomycins, sulfonamides and chloramphenicol. No maximum residue limits (MRLs) have been set for any antibiotics in honey. Therefore, in the European Union, minimum recommended concentrations (RC) for the analytical performance of methods to control a certain set of these non-authorized chemicals in honey were published by the European Union Reference Laboratory (EU-RL) in 2007. Concerning the strategy for the control for antibiotic residues in honey, there is still a great need for a cheap and single multi-residue method. Biochip array technology is an innovative assay technology for the multi-analyte screening of biological samples in a rapid and easy-to-use format. A multi-array system, called Evidence Investigator™ (Randox, Crumlin, Co., Antrim, UK), was evaluated in our laboratory. It is a semi-automated biochip system designed for research, clinical applications and veterinary use. A competitive chemiluminescent immunoassay is employed for the detection of antimicrobials. The MicroArray II kit (AM II) dedicated to the screening of six different families of antibiotic residues was validated according to the European guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. The specificity was proven to be very satisfactory, and applicability to different kinds of honey was demonstrated. The detection capabilities (CC_β) of six antibiotic residues were determined and were below the RCs when exist. The AM II kit could detect at least six quinolones, four tetracyclines and three epimers, three aminoglycosides, three macrolides, thiamphenicol, florfenicol and ceftiofur along with one of its stabilised metabolites, the desfuroylceftiofurcysteine disulfide (DCCD).

Keywords: validation; Decision No. 2002/657/EC; multi-array; biochip; screening; antibiotic; honey

Introduction

Antimicrobial compounds are used in food production to treat or prevent animal diseases. Antibiotics potentially present in honey, or any other food, are inappropriate, even presenting risks to human health. There is a risk of allergies, even at very low doses in some subjects; there is also a risk of causing the selection of resistant strains among human pathogens. Because of these concerns, many countries have banned or restricted the use of antimicrobial compounds in food-producing animals and have established MRLs for antimicrobial residues in food.

The major bee diseases for which antibiotics are indicated are American and European foulbrood infection, both due to bacteria, and Nosema disease, the latter caused by a protozoan. The antibiotics are mixed with the food of bees to fight against diseases such as foulbrood infection. Bee products can be contaminated from different sources (Bogdanov 2006). The main contaminants originating from beekeeping are acaricides and antibiotics used for the control of bee brood diseases, mainly tetracyclines, streptomycin, sulfonamides and chloramphenicol. On the Italian market, for example, among the most analysed substances used, sulfonamides are the first, followed by

tetracycline, streptomycin, tylosin and chloramphenicol (Baggio et al. 2009). No market authorisation can be issued unless an MRL has been established previously. But given the high cost of necessary scientific studies to establish the MRL files, only the most important species called “major” were studied. Thus, for bees, minor species by excellence, no antibiotic could be subjected to an authorisation. European Union rules on setting MRLs for pharmacologically active substances have been updated by Regulation (EC) No. 470/2009 (European Commission 2009). For the first time, the regulation introduced a mechanism for the extrapolation of MRLs from one species/food matrix to another.

In the European Union, no veterinary medicinal product containing antibiotics is permitted in beekeeping. In fact, no antibiotic ever has an MRL in honey. For now, each member states adopts a different position on this issue. In the European Union, a technical guide was published by the European Union Reference Laboratories (EURLs) (CRL Guidance Paper of 7th December 2007). The purpose of this technical guide is to improve and harmonise the performance of analytical methods for substances for which MRLs have not been set. These

*Corresponding author. Email: valerie.gaudin@anses.fr

substances without MRLs include those partially or totally banned from use in food-producing animals. It should be noted that this document should serve as a technical guideline (recommended levels) for methods of residue analysis. The levels recommended in this document, however, have no real legal basis. The recommended concentrations (RCs) are 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for streptomycin, 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for macrolides (tylosin and erythromycin), 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sulphonamides, and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for tetracyclines. Therefore, a screening method for antibiotic residues in honey should detect antibiotic residues at least at these levels and even lower. The evaluation and validation hereafter will determine if the AM II kit can detect the concerned substances that are in the scope of the kit at or lower than the RCs.

There are very few methods to detect antibiotic residues in honey. In general, there are specific tests of an antibiotic or a family of antibiotics (generic test). These are ELISA kits (tylosin, streptomycin/DHS, sulfonamides) or receptor tests (strips Tetrasensor[®] or Sulfasensor[®] (Unisensor, Liège, Belgium)). The Charm II kit for honey, a test based on microbial receptor and radiolabelling developed by Charm Sciences Co. (Lawrence, MA, USA), allows a relatively quick analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin (DHS) (Salter 2003). There are also microbiological tests (ampoule or microplate) based on the inhibition of bacterial growth of *Bacillus stearothermophilus* (i.e. Premi[®]Test (r-Biopham, Darmstadt, Germany), Eclipse[®] 50 (Zeu Immunotech, Zaragoza, Spain)) that have a wide spectrum as compared with immunological methods. However, microbiological tests generally have a good sensitivity to beta-lactams, but poorer sensitivity to tetracyclines, macrolides, sulfonamides and especially poor detection of aminoglycosides and quinolones. Therefore, there is a great need for broad spectrum analytical methods and good sensitivity dedicated to the screening of antibiotic residues in honey samples. A biosensor method based on surface plasmon resonance (SPR) named "Biacore[™]" (GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, France) was developed and validated for the detection of streptomycin and DHS in honey (Ferguson et al. 2002). Simple dilution was applied to honey samples. The LOD in honey was estimated at 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Similarly, a biosensor method was developed and validated for the screening of tylosin in honey (Caldow et al. 2005). The detection capability was estimated at 2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Moreover, HPLC methods have been developed and validated for the screening of antibiotics in honey (Kochansky 2006). Confirmatory MS-based methods have also been developed and validated (Kaufmann et al. 2003; Granja et al. 2009), even multi-residue methods (Vidal et al. 2009).

A multiplex approach should be suitable to detect simultaneously several families of antibiotics. The Evidence Investigator[™] Biochip Array Technology

(Randox, Crumlin, Co., Antrim, UK) is used to perform simultaneous quantitative detection of multiple analytes from a single sample (Fitzgerald et al. 2005; Molloy et al. 2005; McAleer et al. 2006). The core technology is a biochip, a solid substrate containing an array of discrete test regions of immobilised antibodies specific to different antimicrobials. A competitive chemiluminescent immunoassay is employed. The Evidence[™] Investigator system is a biochip, semi-automated, designed for research, clinical, forensic and veterinary applications. Until now, to our knowledge, only one article has been published in the field of antibiotic residues concerning the detection of four nitrofurans metabolites in honey with an Evidence[™] system (O'Mahony et al. 2011).

The MicroArray II (AM II) kit can detect six families of antibiotics: tetracyclines, quinolones, some macrolides, some aminoglycosides, thiamphenicol and florfenicol, and ceftiofur and its metabolite.

The objective was to evaluate the performance of an innovative system called Evidence[™] Investigator for the detection of antibiotic residues in honey. At first an evaluation of the performance of the microarray kit II (AM II) in honey was realised to check the detection limits provided by the supplier. This kit was then validated according to European Decision No. CE/2002/657 (European Commission 2002) and according to the European guideline for the validation of screening methods for the residues of veterinary medicines (CRL 2010). This guideline was written by the EURLs involved in the screening and confirmation of veterinary medicines in food of animal origin and by DGSANCO (European Union Directorate General for Health and Consumers). The objective was to help national reference laboratories to perform the validation of screening methods for veterinary medicines according to Decision No. EC/2002/657, which was lacking detailed information concerning the screening methods. It was published in January 2010 on the DGSANCO website (http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm).

Materials and methods

Chemicals and standard solutions

Chlortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC), tetracycline (TTC), tylosin, tilmicosine, spiramycin, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfanilamide, sulfathiazole, streptomycin, DHS, gentamicin, paromomycin, spectinomycin, sarafloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, oxolinic acid, danofloxacin, ceftiofur, cefalonium, cephalirin, cefacetyl, cefazolin, florfenicol and thiamphenicol were all from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Marbofloxacin, doxycycline, erythromycin, ceftiofur and bacitracin were from Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy la Grande, France).

Norfloraxacin was supplied by Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Neospiramycin was supplied by Wako (Neuss, Germany). Gamychromycin was supplied by Merial (Toulouse, France). Epimers of CTC, TTC and OTC were supplied by ACROS Organics (Geel, Belgium). Desmycosin was prepared according to a published protocol (Adams et al. 2007). Tylosin A in acidic solution is hydrolysed overnight at 50°C to produce desmycosin.

Matrices

Samples of honey were selected to obtain a representative group of varying degrees of colour and general physical appearance (liquid, creamed and crystalline). Sixty different honeypots were used which were from 14 different floral origins: rosemary, heather, forest, acacia, chestnut, rhododendron, rape, orange tree, sunflower, scrubland, lime tree, garrigue, mountain and multifloral. These honeys have different geographical origins from France, Italy and Sicily, and Spain.

Preparation of standard solutions

Stock standard solutions of each antibiotic were prepared at a concentration of 1 mg ml⁻¹ in methanol. An intermediate standard solution containing 10 µg ml⁻¹ in water was prepared from the individual stock standards. This intermediate standard solution was further diluted to prepare working solutions of each compound. Spiked samples were prepared at different concentrations by fortifying 1.0 ± 0.1 g of blank honey with 100 µl of the working solution.

Evidence Investigator™ system

Multi-array biochip technology

The core technology of the Evidence™ Investigator system is a biochip, a solid substrate containing an array of discrete test regions of immobilised antibodies specific to different antimicrobials. A competitive chemiluminescent immunoassay is employed. Increased levels of antimicrobial in a sample will lead to decreased binding of antimicrobial labelled with horseradish peroxidase (HRP) and thus a decrease in the chemiluminescence signal emitted (in RLU – relative light unit). This term is used because luminometers typically do not yield a measurement directly in units of photons. This is because some luminometers measure the current output by the photomultiplier tube, which cannot be translated into photons. Additionally, a calibration factor is typically used to normalise the response of the instrument to a calibrated light standard. The light signal generated from each of the test regions on the biochip is detected using state-of-the-art digital imaging technology and compared with that from a stored calibration

curve. The concentration of analyte present in the sample is then calculated from the calibration curve.

MicroArray II kit (AM II)

The Evidence Investigator™ Anti Microbial Array II is a commercially available kit that will quantitatively test for quinolones, cefiofur, thiamphenicol, streptomycin, tylosin and tetracyclines, simultaneously. Each kit includes six carriers, nine points of calibration, buffers required to reconstitute and other reagents (conjugate, chemiluminescent solution). Each carrier is composed of nine microarrays (1 × 1 cm). So with a kit, one calibration carrier and five carriers of samples (45 samples) could be analysed. A carrier can be divided into three × three biochips, so a number of samples multiplied by three will be analysed.

Honey procedure for sample preparation

A total of 1 g of honey sample is weighted out. Then 19 ml of diluted wash buffer warmed to 37°C are added. The tubes are placed on a roller for 10 min or until dissolved. The sample is now ready for application to the biochip.

Evaluation of the kit

The objectives of the evaluation are, firstly, to check the detection limits announced by the manufacturer and, secondly, to select the target concentrations that will be tested later on during the validation to determine the detection capabilities (CC_β) of the antibiotics of interest (see the validation protocol). During our evaluation it was not required to analyse a calibration curve for each test day. A calibration curve was analysed at the beginning of the validation. This calibration was used to analyse the quantitative results of the tested samples. In fact the data analyses were focused on the signal in RLU not in the calculated concentration in ppb.

Different batches of blank honey without antibiotic residues were analysed. Most honey samples were previously analysed by immunoassay (ELISA test and receptor test) and were detected to be negative. However, when the presence of antibiotics was suspected following the analyses with Evidence™ system, a confirmatory analysis was implemented by LC-MS/MS.

Because of the specificity of each spot for a family of antibiotics (Multiplex system), it is possible to spike samples with antibiotic mixtures, providing a mix of up to six antibiotics (six different families).

The evaluation of sensitivities was focused on six antibiotics that showed 100% cross-reaction with the antibody and on six antibiotics that showed a minimum percentage of cross-reaction and six antibiotics with the lowest cross-reactions. The tested antibiotics and their

Table 1. Antibiotics and related concentrations to be tested at the evaluation step.

First series	Norfloxacin	Ceftiofur	Florfenicol	DHS	Tylosin	OTC
Claimed LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	5	3	1	4.5	2	18
Concentration 1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	5	3	1	5	2	15
Concentration 2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	10	6	2	10	4	20
Second series	Sarafloxacin	DCCD	Thiam	Strepto	Tilmico	Doxy
Claimed LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	83	–	2	8	5.5	39
Concentration 1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	100	100	2	10	5	n.d.
Concentration 2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	150	1000	4	20	10	

Note: DHS, dihydrostreptomycin; OTC, oxytetracycline; DCCD, desfuroylceftiofur cysteine disulfide; Thiam, thiamphenicol; Strepto, streptomycin; Tilmico, tilmicosin; Doxy, doxycycline; LOD, limit of detection.

related concentrations are presented in Table 1. Ideally, the chosen concentrations should be lower than the RC (CRL Guidance Paper of 7th December 2007) when it exist. The choice of concentrations was performed according to the supplier data in the kit booklet (announced detection limits) and according to the RCs when they exist.

During 2 days, four blank samples (four batches of honey), the same four samples spiked at concentration 1 with the first series of antibiotics and the same four samples spiked at concentration 2 with the same antibiotics were analysed. The same protocol was then repeated with the second series of antibiotics. In parallel, each antibiotic was tested individually to assess whether or not there is interference between spots.

Regarding cephalosporins, the kit is deemed to detect only ceftiofur. No tests have been done to date on the major metabolite of interest: desfuroyl ceftiofur. Desfuroyl ceftiofur is very unstable; it is impossible to obtain it. By consequence, DCCD (desfuroyl ceftiofur cysteine disulfide), which is a cysteine conjugated metabolite of ceftiofur, will be tested. Two concentrations will be tested initially and additional testing may be required depending on the initial results.

The average value of the signal (in RLU) of the four blank samples is then calculated, as well as the SD of the signal of the four blank samples. Similarly, the average signal and SD of the four spiked samples at concentrations 1 and 2 is calculated for each tested antibiotic. Finally, the positivity threshold T is calculated as follows from the blank samples:

$$T = \text{average RLU signal of blank} - 1.64 \\ * \text{SD RLU signal of blank}$$

Moreover, the cut-off value F_m is calculated as follows from the spiked samples:

$$F_m = \text{average RLU signal of spiked} + 1.64 \\ * \text{SD RLU signal spiked}$$

At the end of the evaluation step, the target concentration is selected for the determination of detection

capabilities ($CC\beta$) during the validation (see the validation protocol). The chosen concentration (concentration 1 or 2) is valid if and only if the cut-off value F_m is below the positivity threshold T . Otherwise, it is necessary to increase the concentration of antibiotics in the validation step.

In addition, if blank honey is detected to be positive during the two series, this sample will be confirmed by LC-MS/MS.

Validation protocol

After the evaluation step, one kit for each family was selected and validated according to the European guideline for the validation of screening methods for the residues of veterinary medicines (CRL 2010), which is based on the criteria of European Decision No. 2002/657/EC (European Commission 2002). The performance characteristics to be determined were the same: practicability, applicability (honeys from different sources), specificity, detection capabilities ($CC\beta$), ruggedness and stability. The analyses were blindly performed by a technician (random numbers were given to the samples).

Practicability

The aim of the practicability study was to check whether or not the methodology is appropriate for routine analysis. It is not a separate study, which would need complementary analysis. During the evaluation and validation, practicability was considered by the analysts as the ease of use of the method in routine conditions. So necessary equipment (specific or usual equipments in a laboratory), reagents (ready-to-use or not), instruments (specific or usual instruments in a laboratory) and environmental conditions large or narrow temperature intervals to implement the kit are noticed.

Specificity, false-positive rate

Sixty different lots of blank honey (antibiotic free) from organic apiculture (trade) or control plans should be

analysed (different floral origins, different colours, different textures, different levels of crystallisation) (cf. Applicability). As in the evaluation step, if the presence of antibiotic residues following the analyses with the Evidence™ system was suspected, a confirmatory analysis by LC-MS/MS was asked for.

Detection capability (CC β)

Detection capabilities were determined for six antibiotics (the least sensitive antibiotics in each detected family) (cf. Table 3).

In the European guideline for the validation of screening method for the residues of veterinary medicines (CRL 2010), it is recommended that the number of samples needed for each substance for the validation (samples spiked at a target concentration or naturally incurred) depends on the degree of statistical confidence required in the result, and the relationship between target concentration and detection limit prescribed. If the target concentration is set at half the RC ($\frac{1}{2}$ MRL), the occurrence of one or no false-compliant result after the analysis of 20 control samples is sufficient to demonstrate that the detection capability is less or equal to the RC (MRL) and less than or equal to $\frac{1}{2}$ MRL. If the target concentration is between 50% and 90% of the prescribed limit, at least 40 positive control samples (with two or less than two false-compliant results) will be sufficient to demonstrate that the CC β is below the RC. If the screening test sensitivity is such that the target concentration is close to the RC (10% below the RC), a higher number of samples have to be analysed. A maximum of 60 repetitions (with three or less than three false-compliant results) is required to demonstrate that the detection capability is less than or equal to the MRL. These studies can be undertaken by sequential steps, namely that the first 20 fortified samples are tested, and if more than one sample is declared negative, validation may be abandoned at this point or the target concentration should be increased and the validation exercise repeated.

The target concentration was determined during the preliminary tests of evaluation. The sensitivities of each antibiotic with different ranges of concentration were assessed. The chosen concentration for validation is then the concentration that gave 95–100% of positive results during the evaluation step. In the case of honey, there are no MRLs for antibiotic residues, but the recommendations of the EURL AFSSA-Fougères LERMVD (CRL Guidance Paper of 7th December 2007). Therefore, the number of samples to be analysed will be determined according to the recommended limits instead of the MRL. A maximum of 60 samples (blank and spiked) will be analysed to determine CC β and specificity.

A statistical approach that takes into account the β error of 5% was then chosen as it is recommended in European

Decision No. EC/2002/657 (European Commission 2002). The positivity threshold T and the cut-off value F_m were calculated as recommended in the guideline. Positivity threshold T and cut-off factor F_m are matrix-specific:

$$T = B - 1.64 \times SD_B$$

$$F_m = M + 1.64 \times SD$$

where B is the mean and SD_B is the standard deviation of the signal (RLU) of the blank samples; and M is the mean and SD is the standard deviation of the signal (RLU) of the spiked samples.

The first basic principle is that the assay is considered valid only if $T > F_m$. If $F_m > T$, it means that the spiked concentration is too low because the kit was not able to discriminate between blank and spiked samples, regarding the dispersion (SD) of the results of blank and spiked samples. On the contrary, when $T > F_m$, the kit can discriminate between blank and spiked samples.

As a second basic principle, T or F_m will be chosen as the cut-off level to conclude on unknown samples if the result is negative or positive. When the response in RLU of an unknown sample is higher than the cut-off level, the sample is declared a negative sample. On the contrary, when the response in RLU of an unknown sample is lower than the cut-off level, the sample is declared a positive sample. The number of spiked samples with a mean signal (RLU) below the cut-off level will be identified (a positive result). If more than 5% of the spiked samples at the screening target concentration gave a signal (RLU) higher than the cut-off level (a false-negative result), this concentration chosen for the spiking study should be too low for validation (the true CC β is higher than this concentration).

The detection capability CC β of the method will be equal to the spiking level (screening target concentration) if fewer than 5% of false-negative results (i.e. three or fewer false-negative results out of 60 spiked samples) are obtained at this concentration after the analysis of 60 spiked samples. The CC β should be lower than or equal to the regulatory/action limit.

Applicability

Samples of honey were selected to obtain a representative group of varying degrees of colour and general physical appearance (liquid, creamed and crystalline). Sixty different honeypots were used: rosemary, heather, forest, acacia, chestnut, rhododendron, forest, rape, orange tree, sunflower, scrubland, lime tree, garrigue, mountain and multi-floral. These honeys have different geographical origins from France, Italy and Sicily, and Spain. The CC β of 12 antibiotics were determined from at least 60 different samples.

Cross-reactions

Cross-reactivity (CR) for molecules of the same family are determined from a reduced number of samples. Six mixtures of six antibiotics from the six detected families were prepared (cf. Table 5). Each mixture is prepared at three concentrations and each concentration is analysed three times. Regarding cephalosporins, the kit is deemed to detect only ceftiofur. During the evaluation phase, tests are performed on the conjugate metabolite DCCD. Depending on the results, the CC β of ceftiofur or its metabolite is determined. That for which the CC β has not been determined is tested for cross-reactions. Among the antibiotics tested, some families such as sulfonamides should not be detected by this kit, which will be checked. Six sulfonamides were chosen to be tested at concentrations of 100, 1000 and 10 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$: sulfamethazine, sulfadimethoxine, sulfadiazine, sulfathiazol, sulfanilamide and sulfamethizole.

Stability

The stability of analytes in solution and in the matrix are determined through a literature review.

Results and discussion

Evaluation

The evaluation of sensitivities focused on six antibiotics that are 100% cross-reaction and six antibiotics that have a minimum percentage of cross-reaction. Before several antibiotics were individually tested, the same antibiotic mixture was tested to see if there was interference between channels.

Variability of quantitative results was observed (in terms of concentration) in samples spiked with several antibiotics (SD = 5–35%). The spiked samples with a single antibiotic were not repeated. When comparing the quantitative results (concentration) of samples spiked with a single antibiotic (individual) and the results for the same antibiotic mixed with other antibiotics (that are "known" detected in other spots than the spot of this antibiotic), there is no significant difference in the calculated

concentrations. So it seems that mixing several antibiotics had no impact on the quantitative results. The molecule for which the greatest variability was observed was norfloxacin (35%). This is the molecule for which the greatest difference between the concentration of the mixture and the concentration of the antibiotic alone was observed.

As a conclusion from this evaluation there was no interference between the different antibiotics detected (different spots). Therefore, several antibiotics could be mixed in the same sample to determine CC β and thus the number of samples to be analysed and the number of kits is reduced.

The chosen concentration is valid if and only if $F_m < T$. Otherwise, it is necessary to increase the concentration of antibiotics in the validation step. The choice of concentrations for validation is presented in Table 2.

Oxytetracycline was detected at 10 (at this concentration, T was already higher than F_m , but quantitative values were very close) and 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DHS was not detected at either 5 or 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ceftiofur was not detected at either 3 or 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$; tylosin was detected at 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$; florfenicol was not detected at either 1 or 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; and norfloxacin was detected at 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Therefore, the chosen target concentrations for ceftiofur, florfenicol and dihydrostreptomycin were too low. The detection capability CC β is higher than 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for ceftiofur (the highest tested concentration for ceftiofur in the evaluation part), higher than 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for florfenicol, and higher than 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for dihydrostreptomycin because, at these concentrations, $T < F_m$. These three antibiotics were not included in the determination of detection capabilities. Therefore it is only an estimation of the performance of the kit at this level of the evaluation study. The concentrations of sarafloxacin have to be increased compared with the announced LOD (83 $\mu\text{g kg}^{-1}$) because it was not detected at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. On the contrary for DCCD, concentrations were decreased. Sarafloxacin was detected at 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DCCD was detected at 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; thiamphenicol was detected at 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$; streptomycin was detected at 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$; tilmicosin was detected at 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (close); erythromycin was not detected at 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; and doxycyclin was detected at 40 and 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Table 2. Concentrations chosen for the validation.

	Norfloxacin	Ceftiofur	Florfenicol	DHS	Tylosin	OTC
Claimed LOD (ppb)	5	3	1	4.5	2	18
Concentration for validation (ppb)	10	> 6	> 2	> 10	4	15
	Sarafloxacin	DCCD	Thiam	Strepto	Tilmico	Doxy
Claimed LOD (ppb)	83	–	2	8	5.5	39
Concentration for validation (ppb)	150	10	6	30	10	30

Note: DHS, dihydrostreptomycin; OTC, oxytetracycline; Thiam, thiamphenicol; Strepto, streptomycin; Tilmico, tilmicosin; Doxy, doxycyclin; LOD, limit of detection.

During the evaluation step, one honey sample was detected positive for tylosin and/or streptomycin (for streptomycin there were inconsistent results). It was confirmed by implementing ELISA for streptomycin and for tylosin. It was found negative by ELISA for streptomycin ($< 20 \mu\text{g kg}^{-1}$ equivalent streptomycin). However, it was detected positive by ELISA for tylosin (i.e. $> 20 \mu\text{g kg}^{-1}$ equivalent tylosin). This sample could not be confirmed by LC/MS-MS.

Validation part

Practicability

The amount of reagents provided is comfortable. The implementation is easy with a single dilution of the sample of honey by 1/20th in a buffer. The software is simple in its functionality. The data from the disk provided in the box have to be inserted and loaded when a new batch number is used.

During validation, it was decided always to work with fresh conjugate, not with frozen conjugate because the background noise was very high with frozen conjugate.

Specificity and false-positive rate

The specificity of the ELISA kit was determined after the analysis of 60 blank samples of honey from different origins. After 3 days of validation, day 3 was a problem because a lot of background noise was observed with the blank samples for the screening of streptomycin. Three of these samples were analysed by ELISA for streptomycin to detect any presence of streptomycin or DHS. The result was negative for streptomycin/DHS, while the CC β of streptomycin in ELISA is $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the DHS). In addition, the background noise increased significantly for all antibiotics. Therefore the results were not consistent. All the results were not valid when cumulating the results of the 3 days of validation ($F_m > T$). It was suspected that the frozen conjugate could cause this problem. Therefore, on day 4 fresh and frozen conjugates were compared. After some further testing, the conclusion was that the reconstituted frozen conjugate was the cause

of a lot of background noise (although the preparation was made only 11 days before analysis) and not the freshly reconstituted conjugate. So from day 4 a newly and fresh reconstituted conjugate was always used. A warning was added to the practicability evaluation. Following the analysis of these 60 blank samples on six different days, the value of T (positivity threshold) was determined for each family of antibiotics (cf. Table 3).

Taking T as the cut-off value, the test will be more sensitive (because of fewer false-negative results), but the increase of the false rate will lead to expensive confirmatory analyses for which the final result would be a compliant sample. The choice of F_m as the cut-off level is a compromise between detection capabilities, low enough to reach the respective RC and a reasonable false-positive rate. Therefore, F_m was chosen as the cut-off value to conclude on the positivity of a sample.

Four false-positive results were obtained for quinolones (6.7%), one false-positive (1.7%) for tetracyclines, one false-positive (1.7%) for aminoglycosides and no false-negative positive for the three other families antibiotics. Three of the four positive samples for quinolones (two chestnut honeys and one multifloral honey) (concentrations were estimated by the Evidence™ system at about $30 \mu\text{g kg}^{-1}$, while background noise was about $1 \mu\text{g kg}^{-1}$) were confirmed by a multi-residue method (LC-MS/MS) for quinolones. The honeys were confirmed to be compliant for quinolones. However, there is the presence of a peak ($T_r = 4.20 \text{ min}$) on the major transition of flumequine and/or oxolinic acid with a molar mass of the parent ion at 262.2 g mol^{-1} and a molar mass of son ion at 244 g mol^{-1} . The retention times of flumequine and oxolinic acid are 9.42 and 7.59 min respectively. It would be interesting to ask for a non-targeted analysis on the Orbitrap to identify the interfering molecule. It is suspected that some honeys (chestnut and multifloral) contain a natural substance that interferes with the detection of quinolones. This is probably a substance that has a structure close to quinolones. This hypothesis should be confirmed in a subsequent project.

The presence of tetracycline was suspected in one sample (multifloral honey) ($32 \mu\text{g kg}^{-1}$ of equivalent tetracycline). It was detected negative with the Tetrasensor® (Unisensor) (Gaudin, Rault et al. 2013). Then it was

Table 3. Number of false-positive and false-negative results depending on the choice of the threshold value T or cut-off factor F_m as cut-off level.

	Sara	DCCD	Thiam	Streptomycin	Tilmicosin	Doxycycline
T ($n = 60$)	1210	3284	6283	5438	18 753	6822
Cut-off = T ($n = 60$)	6 false-positive 0 false-negative	1 false-positive 0 false-negative	3 false-positive 0 false-negative	2 false-positive 0 false-negative	3 false-positive 0 false-negative	3 false-positive 1 false-negative
F_m ($n = 60$)	1060	1817	4829	4445	11 315	5427
Cut-off = F_m ($n = 60$)	4 false-positive 0 false-negative	0 false-positive 2 false-negative	0 false-positive 1 false-negative	1 false-positive 1 false-negative	0 false-positive 3 false-negative	1 false-positive 2 false-negative

Note: Sara, sarafloxacin; DCCD, desfurylethiofur cysteine disulfide; Thiam, thiamphenicol.

confirmed by LC-MS/MS and the sample was found to be compliant for tetracyclines. The presence of tetracycline was also suspected in sample 11F003024 (sunflower honey) ($> 70 \mu\text{g kg}^{-1}$ of equivalent tetracycline). It was analysed with Tetrasensor[®] and was also found to be positive with this receptor test. It was then confirmed by LC-MS/MS and it was declared non-compliant for tetracyclines (quantification $488 \mu\text{g kg}^{-1}$ tetracycline and $390.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ epitetracycline).

Detection capabilities (CC β)

Twelve antibiotics were evaluated (two series) (Table 2). However, the detection capabilities CC β were determined for six antibiotics only – the least sensitive antibiotics (but still detected) in each family – with 60 different batches of honey (cf. Table 4). The distribution of the results in RLU for the 60 negative samples and the 60 samples spiked with the six validated antibiotics are presented in Figure 1.

The detection capabilities CC β were determined for six antibiotics – the least sensitive antibiotics (but still detected) in each family – with 60 different batches of honey. This figure represents the distribution of the signal in RLU after the analyses of 60 blank samples of honey from different origins and the analyses of the same 60 samples fortified at different concentrations of antibiotics. Figure 1a presents the results of sarafloxacin at $150 \mu\text{g kg}^{-1}$; Figure 1b DCCD at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; Figure 1c thiamphenicol at $6 \mu\text{g kg}^{-1}$; Figure 1d streptomycin at $30 \mu\text{g kg}^{-1}$; Figure 1e tilmicosin at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; and Figure 1f doxycycline at $30 \mu\text{g kg}^{-1}$.

The following Table 4 shows the detection capabilities CC β for the six validated antibiotics. The letter C means that the result is compliant, i.e. Fm is much lower than T and thus the validated concentration is equal to CC β . In fact, no more than 5% of false-negative results (three out of 60 spiked samples) were obtained for the six tested antibiotics, which are among the least detected antibiotics in each family.

Globally the detection capabilities were a little higher than those announced by Randox, except for doxycycline. For substances having a RC (streptomycin, tilmicosin and doxycycline), the detection capabilities were lower than the RC. The results were very satisfactory because the validated antibiotics were the least detected antibiotics in the family. It means that the other detected antibiotics in the family (dihydrostreptomycin, tylosin, tetracycline, OTC, CTC and the three epimers) are much better detected and by consequence lower than the RC.

Cross-reactions

Cross reactions were analysed in terms of calculated concentration and not in the RLU signal because we wanted to determine the quantitative relationship between the antibiotic at 100% of CR and the antibiotic that potentially cross-reacts. The results of CRs in each family are summarised in Table 5.

The calculated cross-reactivities (CR%) were very close to those reported by Randox. The following antibiotics were not detected: cephalirin, cephalonium, florfenicol-amine, CAP, neomycin, bacitracin, paromomycin, spectinomycin, erythromycin, spiramycin, neospiramycin and gamythromycin. On the contrary, cefquinome (12% CR), gentamicin (14.6% CR) and desmycosin (24.4% CR) were detected. The determination of CR with this kit with desmycosin was of great interest because it was demonstrated that honey destined for human consumption should be analysed for both tylosin A and desmycosin (tylosin B) rather than the parent antibiotic alone (Thompson et al. 2007). None of the sulfonamides was detected by the AM II kit. There is no interference with the detection of six other families of antibiotics.

Applicability

An influence of honey origins was hypothesised because honey is a very complex matrix and with antioxidant

Table 4. Summary of the results.

	Sara	DCCD	Thiam	Strepto	Tilmico	Doxy
Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	150	10	6	30	10	30
T	1210	3284	6283	5438	18 753	6822
Fm	1060	1817	4829	4445	11 315	5427
Fm < T	C	C	C	C	C	C
When cut-off = Fm	0 false-negative	2 false-negative	2 false-negative	1 false-negative	3 false-negative	2 false-negative
Recommended concentration (ppb)	–	–	–	40	20	20
Claimed LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	83	–	2	8	5.5	39
CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	150	10	6	30	10	30

Note: Sara, sarafloxacin; DCCD, desfuryletofur cysteine disulfide; Thiam, thiamphenicol; Strepto, streptomycin; Tilmico, tilmicosin; Doxy, doxycycline; LOD, limit of detection; C, conform.

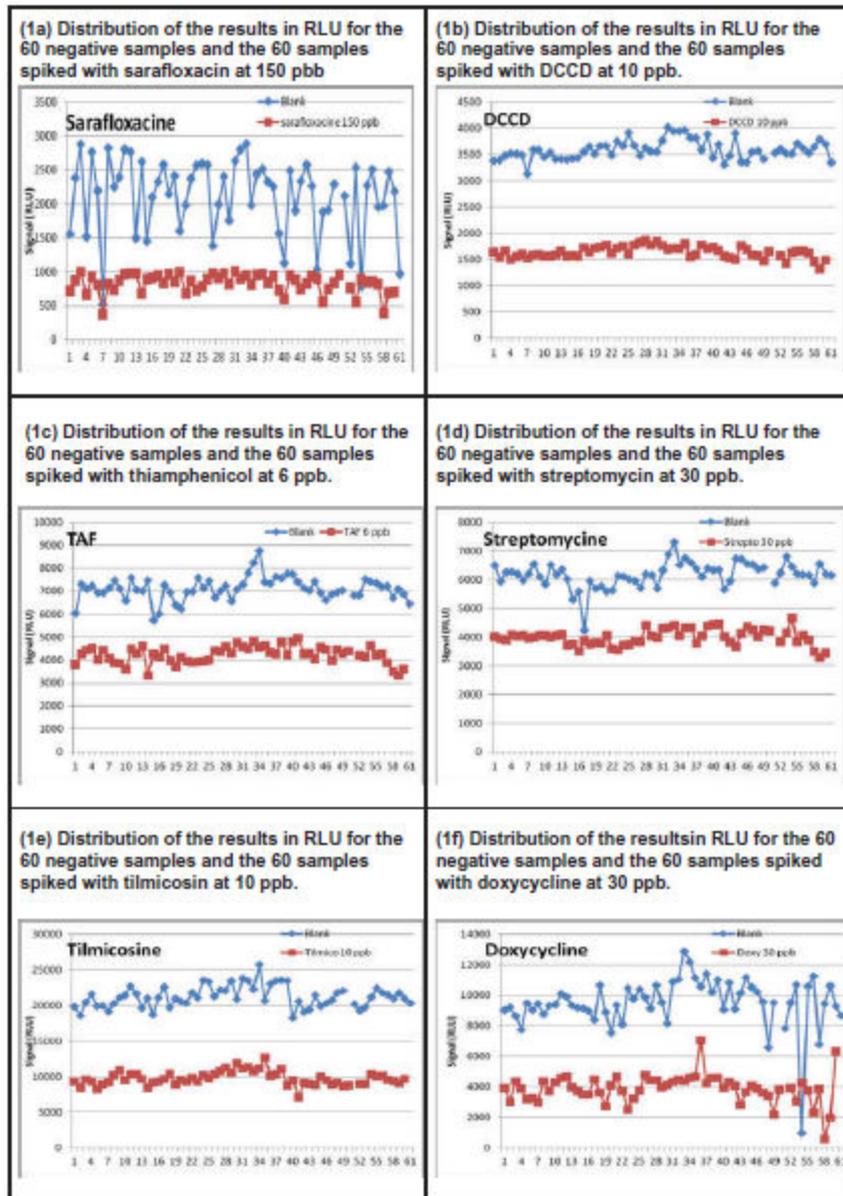


Figure 1. (colour online) Distribution of the results in RLU for the 60 negative samples and the 60 spiked samples.

properties. The method has proved to be applicable to different floral honeys with different geographical origins. One false-positive (1.7%) was obtained for tetracyclines, one false-positive (1.7%) for aminoglycosides and no false-positive for the three other families of antibiotics, which is very satisfying. However, a restriction must be

made for the detection of quinolones. In fact, four false-positive results were obtained for quinolones (6.7%). It is suspected that some honeys (chestnut and multifloral) contain a natural substance that interferes with the detection of quinolones. This is probably a substance that has a structure close to quinolones. This hypothesis should be

Table 5. Results of cross-reactions in the six different mixtures of six antibiotics each.

Mixture 1	Norfloxacin	Ceftiofur	Florfenicol	DHS	Erythromycin	OTC
Mean calculation CR%	139.3	129	98.8	115.1	0	73.5
Claimed CR (%)	100	100	100	182	n.d.	52
Mixture 2	Ciprofloxacin	Cephapirine	Florfenicolamine	Neomycin	Tylosin	TTC
Mean calculation CR%	36.4	0.1	0	0	56.3	97.9
Claimed CR (%)	59	n.d.	n.d.	n.d.	< 1	100
Mixture 3	Danofloxacin	Cephalonium	CAP	Gentamycin	Desmicosin	CTC
Mean calculation CR%	29.6	0.3	0	14.6	24.4	59.3
Claimed CR (%)	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51
Mixture 4	Enrofloxacin	Cefquinome		Spectinomycin	Spiramycin	Epimer TTC
Mean calculation CR%	67.6	12.0		0	0	112.7
Claimed CR (%)	76	n.d.		n.d.	n.d.	87
Mixture 5	Marbofloxacin	Cefacetril		Bacitracin	Neospiramycin	Epimer OTC
Mean calculation CR%	17.8	0.1		0	0	69.6
Claimed CR (%)	16	n.d.		n.d.	n.d.	52
Mixture 6	Oxolinic acid	Cefazolin		Paromomycin	Gamithromycin	Epimer CTC
Mean calculation CR%	9.7	0.1		0	0	30.6
Claimed CR (%)	12	n.d.		n.d.	n.d.	20

Note: Mean calculation CR (%) = mean calculated cross-reaction (%); announced CR (%) = announced cross-reaction by the manufacturer of the kit; n.d., not detected.

confirmed in a subsequent project using non-targeted LC-MS/MS methods. In addition, CC β was determined from 60 different samples and so this value takes into account the variability of honey.

Quality controls in routine analyses

During validation there was considerable variability in the signals and background noise so there is a need to analyse two to three negative quality controls (QC-) and two to three positive quality controls (QC+) in parallel with unknown samples to conclude on their compliance, or not. The antibiotic concentrations to produce QC+ will be the detection capabilities of the six validated antibiotics (the least sensitive in their family). The T value is determined from the mean signal in RLU and SD of QC- and F_m value from the mean signal in RLU and SD of QC+. On each day of routine analyses, the F_m value should be lower than T to declare that the assay is valid. Furthermore, every unknown sample with a signal lower than F_m will be declared as positive, and conversely.

Stability of antibiotic residues

The stability data of tylosin, streptomycin and DHS in solution and in honey were already presented in a validation study of two ELISA kits for the screening of tylosin, streptomycin and DHS in honey (Gaudin, Hedou et al. 2013). Moreover, data about the stability of tetracyclines in solution and in honey were collected during the validation study of a receptor test for tetracyclines in honey (Gaudin, Rault et al. 2013).

The stability of frozen stock solutions of beta-lactams and quinolones was studied with a diffusion test based on *Bacillus subtilis* and data were presented in a validation study of two microbiological tests in honey for the screening of antibiotic residues (Gaudin, De Courville et al. 2013). No data are available on the stability of quinolones and beta-lactams in honey. The stability of quinolones in muscle was presented, even if it cannot be extrapolated completely with honey (Bailac et al. 2006). The quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, flumequine and acid oxolinic) are stable for at least 3 months in chicken muscle at -20°C.

No data are available on the stability of thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FFC) in honey. The stabilities of TAP and FFC in solution were assessed after 1, 2, 4 and 8 weeks of storage in a freezer at -18°C (Evaggelopoulou & Samanidou 2013). Spiked fish samples at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for TAP and at 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FFC stored at -18°C in the absence of light were analysed and stability was demonstrated for 2 weeks for all analytes. The stability of the two amphenicols in fish samples was investigated after four freeze-thaw cycles (-18°C to RT). Degradation was decided using the -10% criterion. TAP and FFC were stable for three cycles.

Discussion

A review was published recently on the prevalence of antibiotic residues in honey worldwide (Australia, Canada, China, the European Union, South America, India, New Zealand, South Asia and the United States) from 2008 to 2013 (Venable et al. 2014). The most usual

Table 6. Detection capabilities ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of different commercial kits for the screening of antibiotic residues in honey.

Antibiotic family	Commercial kit (manufacturer, country)	Principle of the test	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \leq RC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$) $>$ RC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Reference
Tetracyclines	Tetrasensor® (Unisenso)	Dipstick	TTC, OTC, CTC and doxycycline respectively at 15, 15, 10 and 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Epi-TTC and epi-CTC 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, epi-OTC not detected even at 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	20	Gaudin, Rault et al. (2013)
	Eclipse® 50 kit (Zeu Immunotech)	Microbiological	-	TTC, OTC and CTC $>$ 100, \leq 200 and $>$ 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Epimers not validated	-	Gaudin, De Courville et al. (2013)
	Premi®Test kit (r-Biopharm)	Microbiological	TTC, OTC, CTC respectively at \leq 10, 10 and $>$ 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Epimers not validated	-	Gaudin, De Courville et al. (2013)
Macrolides	AM II (Randox)	Chemiluminescent biosensor	TTC, OTC and CTC $<$ 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$, doxycycline (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and three epimers $<$ 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	-	-
	Kit tylosin (TECNA, Trieste, Italy)	ELISA	Tylosin A 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Tylosin B (desmycosin) only at 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	20	Gaudin, Hedou et al. (2013)
	Eclipse® 50 kit (Zeu Immunotech)	Microbiological	-	Tylosin A \leq 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tylosin B $>$ 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	Gaudin, De Courville et al. (2013)
Aminoglycosides	Premi®Test kit (r-Biopharm)	Microbiological	Tylosin A \leq 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tylosin B \leq 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	-	Gaudin, De Courville et al. (2013)
	AM II (Randox)	Chemiluminescent biosensor	Tylosin A 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tylosin B 8–10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tilimicosin 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	-	-
	Kit streptomycin/DHS (Europroxima, Amihem, the Netherlands)	ELISA	Streptomycin 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and DHS \leq 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	40	Gaudin, Hedou et al. (2013)
	Eclipse® 50 kit (Zeu Immunotech)	Microbiological	-	Streptomycin and DHS $>$ 10 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	Gaudin, Hedou et al. (2013)
	Premi®Test kit (r-Biopharm)	Microbiological	-	Streptomycin $>$ 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, DHS around 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	Gaudin, De Courville et al. (2013)
	AM II (Randox)	Chemiluminescent biosensor	Streptomycin 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, DHS around 20–30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	-	-

Note: RC, recommended concentration; DHS, dihydrostreptomycin; tylosin B, desmycosin; TTC, tetracycline; OTC, oxytetracycline; CTC, chlortetracycline; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

antibiotic families detected and quantified in honey all over the world are in order of importance: tetracyclines (mostly oxytetracycline from 0.21 to 250.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and tetracycline from 0.28 to 61 $\mu\text{g kg}^{-1}$), sulfonamides, macrolides (tylosin, 124 positive samples from 0.34 to 139.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$; erythromycin, nine positive samples from 2.9 to 280.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$), quinolones from 0.5 to 144.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin) and aminoglycosides (streptomycin only from 23 to 127 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Therefore, the scope of the AM II kit is really interesting because four of the five antibiotic families of interest could be detected by this method. Moreover, regarding the quantified concentrations, the very low concentrations could not have been detected when they were lower than the estimated detection capabilities of the AM II kit (i.e. lower than 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for tylosin). Many of the samples were lower than the respective RC of tetracyclines, macrolides and aminoglycosides. Giving the estimated detection capabilities of the AM II, most of the positive samples of interest should have been detected by this method. Finally, another kit from Randox (Crumlin, Co.), the MicroArray I (AM I), for the screening of 14 sulfonamides and trimethoprim in honey could be implemented in parallel with the AM II kit to complete the scope of antibiotics. In this way, the five main antibiotic families would be covered.

Even if few methods exist for the screening of antibiotic residues in honey, different approaches have been evaluated in our laboratory during the past few years. The detection capabilities CC β of different commercial kits for the screening of tetracyclines, some macrolides and some aminoglycosides are summarised in Table 6. These results were extracted from our in-house validations of commercial kits in honey and these data have been published (Gaudin, De Courville et al. 2013; Gaudin, Hedou et al. 2013; Gaudin, Rault et al. 2013).

The AM II kit is more performing than Tetrasensor[®] because it is sensitive enough not only for the four tetracyclines but also for the three epimers. Concerning macrolides and aminoglycosides, both validated ELISA kits have had detection capabilities lower than the RC for tylosin A and for streptomycin (Gaudin, Hedou et al. 2013). The performances of the AM II kit were similar, except that tilmicosin was also detected with the AM II kit. Therefore, the AM II kit could be able to replace ELISA kits for the screening of macrolides and aminoglycosides in honey. An additional advantage of the AM II kit is that each spot is specific for a family of antibiotics so six families of antibiotics are detected simultaneously (a wider spectrum of detection) and could be discriminated. Microbiological screening tests based on the inhibition of growth of *Bacillus stearothermophilus* have a wide spectrum of detection and could have been competitive with multi-array biosensors. However, the detection capabilities CC β determined for 16 antibiotics of the following

families (tetracyclines, macrolides, sulphonamides, penicillins and lincosamides) for the Eclipse[®] 50 kit (Zeu Immunotech) were all higher than the RCs when they exist, even though they had a low false-positive rate of 5%. On the contrary, the Premi[®]Test kit (r-Biopharm) gave satisfactory sensitivity with respect to a great number of antibiotics of interest (tetracyclines, sulfonamides and macrolides), but the estimated detection capabilities were higher than the RC for streptomycin and dihydrostreptomycin. Moreover, a high false-positive rate (14%) led to a great number of physicochemical confirmations. Therefore, this wide-spectrum approach was not kept as an alternative to the classical tests (ELISA tests and receptor tests).

Finally, the AM II kit seems to be a good compromise between the sensitive approach of specific methods like ELISA or receptor tests and wide-spectrum methods like microbiological tests. In fact, low detection capabilities were reported for the AM II kit in honey and the multi-array system allowed the simultaneous detection of six families of antibiotics. Moreover, technically speaking, implementing two ELISA kits and one receptor test for the screening of three families of antibiotics is time-consuming and costly in relation to the cumulative time for analyses. The extraction protocol is also much easier than those of ELISA kits. Finally, the AM II kit could be satisfactorily replacing the use of the three different kits for screening antibiotics in honey.

Conclusions

The Antimicrobial Array II kit applied on the Evidence Investigator[™] system for the determination of six families of antibiotics in honey was validated in terms of its detection capability, specificity, cross-reactions and applicability, according to Commission Decision No. 2002/657/EC (European Commission 2002). The method was found to be rapid and able to screen six families of antibiotics simultaneously in different kinds of honey with a very easy sample preparation procedure. The detection capabilities for tetracyclines, some macrolides and some aminoglycosides were lower than the respective RCs. The results clearly prove that the proposed method is adequate for the purpose of screening analyses of six families of antibiotics in honey.

To our knowledge, this study represents the first validation of the MicroArray II kit in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for the residues of veterinary medicines (CRL 2010). The AM II kit will continue to be evaluated in our laboratory. Indeed, the 200 samples of the French honey control plan will be analysed with the Evidence Investigator[™] system in parallel with the official tests (ELISA, receptor tests and LC-MS/MS).

References

- Adams SJ, Heinrich K, Hetmanski M, Fussell RJ, Wilkins S, Thompson HM, Sharmar M. 2007. Study of the depletion of tylosin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and the effect of the shook swarm procedure. *Apidologie*. 38:315–322.
- Baggio A, Gallina A, Benetti C, Mutinelli F. 2009. Residues of antibacterial drugs in honey from the Italian market. *Food Addit Contam: Part B*. 2:52–58.
- Bailac S, Barrón D, Barbosa J. 2006. New extraction procedure to improve the determination of quinolones in poultry muscle by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta*. 580:163–169.
- Bogdanov S. 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie*. 37:1–18.
- Caldow M, Stead SL, Day J, Sharmar M, Situ C, Elliott C. 2005. Development and validation of an optical SPR biosensor assay for tylosin residues in honey. *J Agric Food Chem*. 53:7367–7370.
- Commission E. 2002. Commission Decision (EC) N° 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off J Eur Comm*. L221:8–36.
- Commission E. 2009. Commission Regulation (EC) N° 470/2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union*. L152:11–22.
- CRL. Guidance Paper of 7th December 2007. CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. Community Reference Laboratories (CRLs) for residues according to Council Directive 96/23/EC. 1–8.
- CRL. 2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Available from: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm:Guideline_Validation_Screening_en.pdf
- Evangelopoulou EN, Samanidou VF. 2013. Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chem*. 136:1322–1329.
- Ferguson JP, Baxter GA, McEvoy JDG, Stead S, Rawlings E, Sharmar M. 2002. Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor. *Analyst*. 127:951–956.
- FitzGerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh EO. 2005. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clin Chem*. 51:1165–1176.
- Gaudin V, De Courville A, Hedou C, Rault A, Diomandé SE, Creff-Froger C, Verdon E. 2013. Evaluation and validation of two microbiological tests for screening antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. *Food Addit Contam: Part A*. 30:234–243.
- Gaudin V, Hedou C, Verdon E. 2013. Validation of two ELISA kits for the screening of tylosin and streptomycin in honey according to the European decision 2002/657/EC. *Food Addit Contam: Part A*. 30:93–109.
- Gaudin V, Rault A, Verdon E. 2013. Validation of a commercial receptor kit for tetracycline residues in honey according to the European guideline for screening methods. *Food Agric Immunol*. 24:111–128.
- Granja RHMM, Niño AMM, Zucchetti RAM, Niño REM, Patel R, Salerno AG. 2009. Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 637:64–67.
- Kaufmann A, Butcher P, Kolbener P. 2003. Trace level quantification of streptomycin in honey with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*. 17:2575–2577.
- Kochansky J. 2006. Stability of tylosin in honey at elevated temperatures. *J Apicultural Res*. 45:32–36.
- McAleer D, McPhillips FM, FitzGerald SP, McConnell RI, Rodriguez M-L. 2006. Application of evidence Investigator™ for the simultaneous measurement of soluble adhesion molecules: L-, P-, E- Selectins, VCAM-1, ICAM-1 in a biochip platform. *J Immunoassay Immunochemistry*. 27:363–378.
- Molloy RM, McConnell RI, Lamont JV, FitzGerald SP. 2005. Automation of Biochip Array Technology for Quality Results. *Clin Chem Lab Medecine*. 43:1303–1313.
- O'Mahony J, Moloney M, McConnell RI, Benchikh EO, Lowry P, Furey A, Danaher M. 2011. Simultaneous detection of four nitrofurans metabolites in honey using a multiplexing biochip screening assay. *Biosens Bioelectron*. 26:4076–4081.
- Salter RS. 2003. Charm II system - Comprehensive residue analysis system for honey. *Apiacta*. 38:198–206.
- Thompson TS, Pernal SF, Noot DK, Melathopoulos AP, van den Heever JP. 2007. Degradation of incurred tylosin to desmycosin-Implications for residue analysis of honey. *Anal Chim Acta*. 586:304–311.
- Venable R, Haynes C, Cook J-M. 2014. Reported prevalence and quantitative LC-MS methods for the analysis of veterinary drug residues in honey: a review. *Food Addit Contam: Part A*. 31:621–640.
- Vidal JLM, Aguilera-Luiz MDM, Romero-González R, Frenich AG. 2009. Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agr Food Chem*. 57:1760–1767.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les méthodes de dépistage biologiques ont connu une très grande évolution ces 40 dernières années. Les principes et les performances de ces méthodes depuis les méthodes microbiologiques et immunologiques conventionnelles jusqu'aux biocapteurs qui sont en constant développement, sont très différents. En outre, plusieurs approches sont proposées pour caractériser la performance des méthodes et les valider. Enfin, beaucoup de travaux et de publications se sont intéressés aux méthodes physico-chimiques de confirmation, qui elles-aussi ont connu une très forte évolution dans le même temps. A ce jour, une étude comparative des différentes approches d'évaluation de la performance ciblée sur les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques n'avait pas été réalisée. L'objectif de cette thèse était donc de comparer les différentes approches d'évaluation de la performance des méthodes de dépistage. Pour cela, nous avons pu comparer les résultats obtenus à partir des méthodes de dépistage validées selon ces différentes approches.

I. PERSPECTIVES ET NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS POUR LES METHODES

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude bibliographique sur les méthodes biologiques de dépistage. Nous avons ainsi montré la diversité des méthodes utilisables en routine pour le contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. L'évolution de la technologie dans ce domaine a été démontrée, depuis les méthodes microbiologiques et immunologiques conventionnelles apparues dans les années 1970 à 1980 et qui sont toujours utilisées en raison principalement de leur intérêt économique, jusqu'aux méthodes innovantes et plus instrumentales de type biocapteur. Les avantages et les inconvénients de chacun des types de méthodes ont été présentés.

En 1986, les perspectives concernant les méthodes de dépistage des résidus de médicaments vétérinaires était l'ELISA rapide, sensible, spécifique et automatisable et la CL-SM/SM pour un dépistage rapide et quantitatif [322]. De nombreuses avancées technologiques ont eu lieu depuis, dans les domaines de la biologie, de la chimie, de la physique et de l'électronique principalement. Toutefois, nous avons aussi pu conclure que la méthode « idéale » n'a pas encore été développée. C'est pourquoi la recherche pour le développement de biocapteurs plus performants (sensibilité, spécificité, rapidité, portabilité (miniaturisation)) et plus économiques doit continuer. De nouvelles avancées dans la technologie liée aux biocapteurs devraient permettre de renforcer le rôle des biocapteurs dans la sécurité alimentaire, pour la détection de divers contaminants (*eg.* polluants environnementaux, bactéries pathogènes) et plus particulièrement pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments.

Trois facteurs principaux ont été identifiés sur lesquels il faut travailler, pour développer des biocapteurs plus performants : l'élément de biorecognition, le transducteur et les nanotechnologies. Les progrès faits pour chacun de ces facteurs indépendamment l'un de l'autre sont primordiaux pour développer de nouveaux biocapteurs. En outre, c'est la combinaison des avancées simultanées dans ces 3 domaines qui aboutira dans le futur au développement de biocapteurs moins coûteux et plus performants.

Figure 52. L'évolution des technologies pour le développement de biocapteurs moins couteux et plus performants.

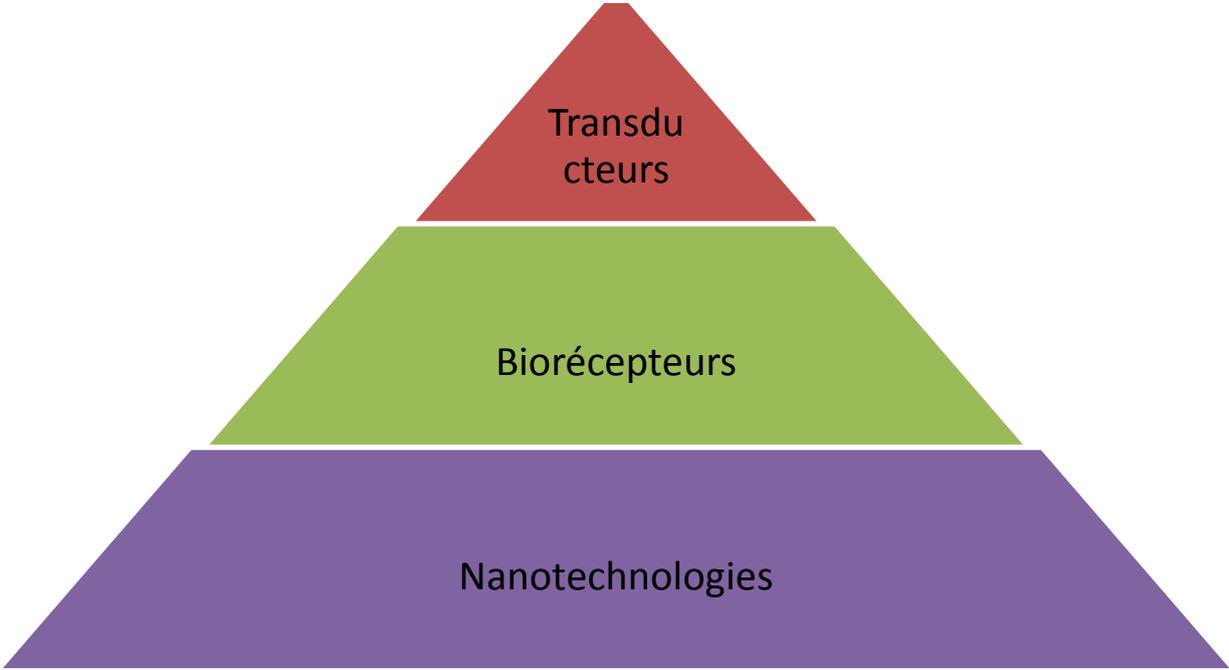
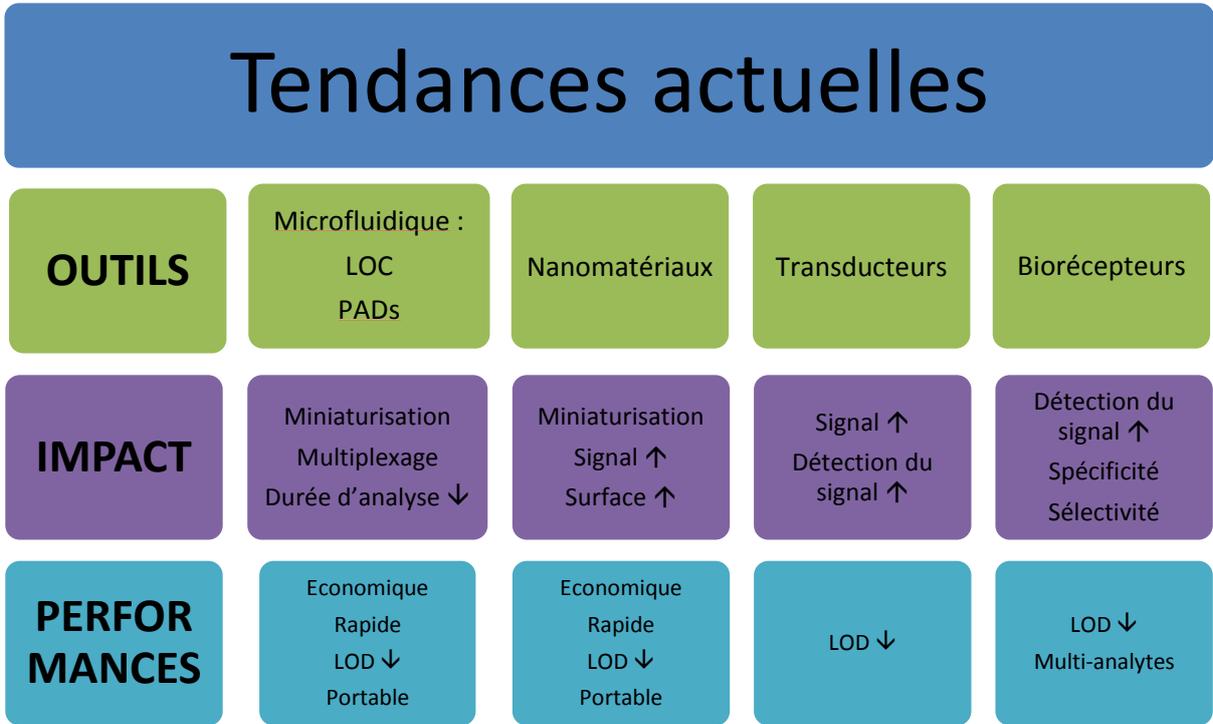


Figure 53. Combinaison de 3 facteurs pour l'amélioration des performances des biocapteurs : les tendances actuelles.



Nombre de ces avancées ont démarré au début des années 2000 et sont en constante progression. Il est notable dans la bibliographie que les travaux pour l'amélioration de ces 3 facteurs représentent des volumes différents (**Figure 52**).

Le développement de nouveaux outils tels que les transducteurs et les biorécepteurs permet d'améliorer la puissance du signal à détecter et/ou d'améliorer la détection du signal (**Figure 53**). Par conséquent, les limites de détection des biocapteurs sont abaissées et peuvent mieux répondre aux attentes des utilisateurs de ces méthodes. Des efforts doivent aussi être portés vers le développement de biocapteurs avec plus d'automatisation, ce qui pourrait réduire le temps d'analyse, améliorer le débit d'échantillons, et diminuer le coût par analyse.

Quelques travaux sont réalisés sur le développement de nouveaux transducteurs. Par exemple, les progrès dans les biocapteurs à luminescence chimique consistent à augmenter la capacité à collecter la lumière, afin d'améliorer la sensibilité, en travaillant sur les systèmes de détection de la lumière (eg. tubes photomultiplicateurs, caméras CCD) ou sur les marqueurs luminescents et l'amplification du signal [323].

Toutefois, il semble que les modes de transduction déjà existants ont déjà fait le tour des connaissances et des possibilités actuelles. De plus, les transducteurs actuels ont des potentiels déjà très développés, mais qui peuvent être améliorés grâce à des outils parallèles, tels que les biorécepteurs et les nanotechnologies. En ce qui concerne les biorécepteurs, l'amélioration porte sur le développement de nouveaux types de biorécepteurs ou sur l'amélioration de biorécepteurs pour lesquels la technologie existe déjà. Le développement des biocapteurs enzymatiques ampérométriques de 3^e génération est aussi prometteur. Le principe est le suivant : le transfert électronique se fait directement entre l'enzyme et l'électrode. Contrairement aux générations précédentes, il n'y a plus besoin d'un médiateur pour assurer le transfert [324]. Cette 3^e génération de biocapteurs permet de développer des méthodes plus sélectives et sensibles. Parmi les enzymes qui peuvent être utilisées dans ces biocapteurs de 3^e génération se trouve la peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase HRP) utilisée le plus souvent dans les biocapteurs enzymatiques pour le dépistage des résidus d'antibiotiques. Ce type de biocapteur peut donc potentiellement être développé pour les résidus d'antibiotiques. Cependant, pour le moment, ces biocapteurs présentent un problème de stabilité de l'enzyme, de reproductibilité et un coût élevé de fabrication.

Les progrès les plus importants en volume de publications, mais aussi en termes d'amélioration de la performance sont les nanotechnologies. Les nanotechnologies permettent d'aller vers la miniaturisation des systèmes et donc vers la portabilité et la diminution des coûts. Mais elles permettent aussi, en diminuant les circuits microfluidiques par exemple, de diminuer la durée des analyses. De plus, en augmentant les surfaces d'interaction, les nanomatériaux peuvent contribuer à la diminution des limites de détection.

Cela permettrait aussi une utilisation de ces méthodes en autocontrôle, type autocontrôle laitier, pour lequel le débit d'échantillons doit être très élevé (eg. plusieurs milliers d'échantillons par jour). Dans le secteur de l'analyse biomédical, de nouveaux biocapteurs sont développés pour une application chez le patient. Le test est simple à réaliser, la lecture et l'analyse des résultats se font sur le smartphone du patient [325-328]. Ce type de test permet d'envisager une application à la détection des résidus

d'antibiotiques sur le terrain, type au pied du camion dans le cadre de la collecte du lait, au niveau de l'abattoir ou à la ferme. Les besoins identifiés sont les mêmes : des méthodes peu coûteuses, très rapides (quelques minutes, type bandelettes), préparation de l'échantillon nulle, manipulation la plus simple possible (que ce soit pour un patient, un chauffeur de camion-citerne ou un éleveur) et avec le moins d'étapes possible. Ce type de biocapteur permettrait d'améliorer essentiellement le spectre de détection et les limites de détection des tests au camion ou à la ferme. Actuellement, les tests utilisés au camion sont des bandelettes qui donnent un résultat en quelques minutes et sont spécifiques d'une à deux familles d'antibiotiques uniquement (les bêta-lactamines en général, voire les tétracyclines en supplément). De plus, l'utilisation du smartphone, comme outil de lecture des tests, évite le développement et la production d'un lecteur spécifique dédié.

NOS PERSPECTIVES

Au laboratoire, les perspectives de développement et/ou d'évaluation des méthodes de dépistage à court, moyen et long terme sont les suivantes (**Figure 54**).

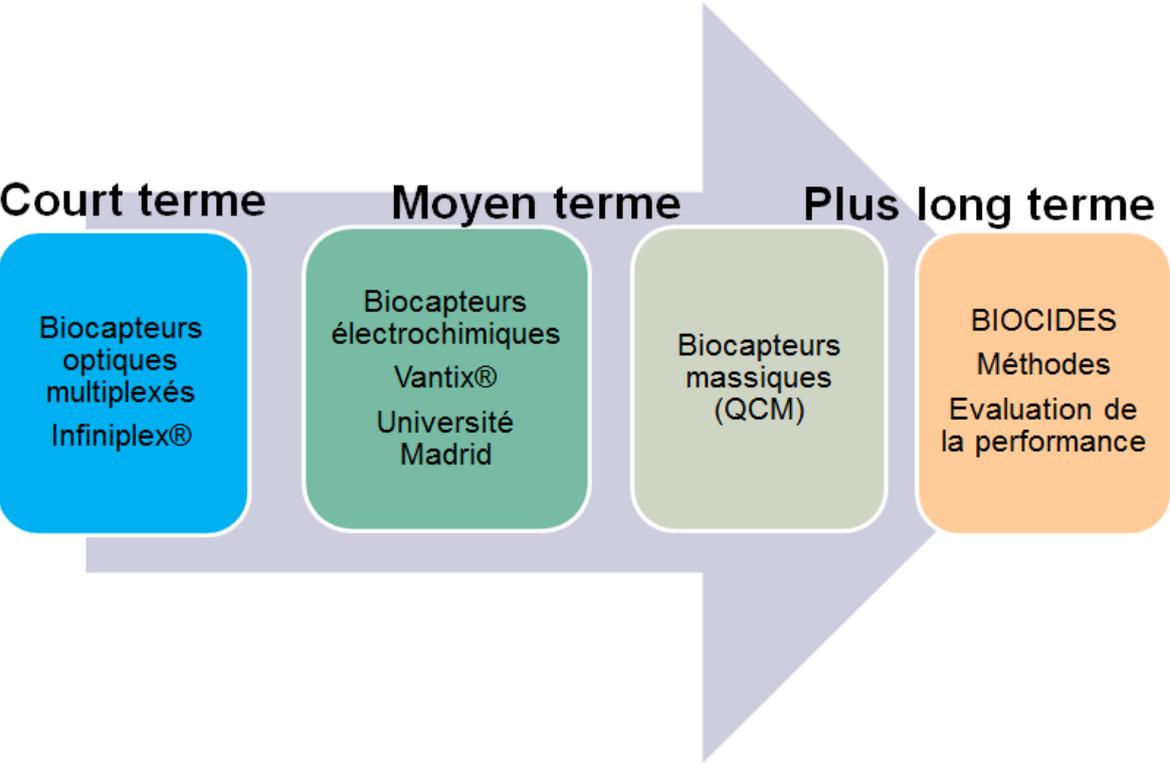
Dans l'avenir et à court terme, nous allons continuer à travailler au laboratoire sur des biocapteurs optiques multiplexés tels que le système Evidence Investigator® (Randox, Royaume-Uni), en évaluant de nouveaux kits, par exemple le kit Infiniplex® pour la détection d'environ 60 antibiotiques dans le lait de vache.

A moyen terme, nous allons évaluer des biocapteurs électrochimiques au laboratoire pour la première fois. Le premier est un système commercial Vantix® (Vantix, Etats-Unis et Royaume Uni) sur lequel nous pourrions réaliser nos propres développements de méthodes. Il sera appliqué dans un premier temps au chloramphénicol comme modèle. De plus, nous allons établir une collaboration avec un laboratoire universitaire espagnol qui a développé des biocapteurs électrochimiques pour la détection de plusieurs familles d'antibiotiques dans le lait. Cette collaboration devrait permettre d'évaluer les performances de ces systèmes dans notre laboratoire.

De plus, nous devons envisager d'évaluer des biocapteurs massiques (type QCM), soit en testant des systèmes commerciaux (*eg.* Q-Sense®, Biolin Scientific, Suède), soit en établissant des collaborations avec des laboratoires ayant développé ce type de méthodes. Le potentiel des biocapteurs calorimétriques pourrait aussi être évalué puisqu'il existe un biocapteur commercial (Heatsens®, Nanoimmunotech, Espagne).

A plus long terme, nous pourrions ouvrir notre champ d'investigation vers la détection d'autres types de résidus que les antibiotiques, les biocides. En effet, il existe très peu de méthodes, même conventionnelles (test microbiologiques commerciaux, ELISA), disponibles dans ce domaine, et encore moins des développements de biocapteurs. Les biocides utilisés pour le nettoyage et la désinfection des surfaces en agro-alimentaire peuvent en effet persister dans les eaux de rinçage, sur les surfaces et/ou dans les matrices alimentaires (*eg.* lait) et doivent donc être surveillés dans les industries agro(-alimentaires).

Figure 54. Perspectives de développement et d'évaluation de biocapteurs au laboratoire de l'Anses Fougères.



II. PERSPECTIVES ET NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS POUR L'EVALUATION DES PERFORMANCES

Ensuite, une étude bibliographique sur les différentes approches d'évaluation de la performance des méthodes de dépistage a été réalisée. Trois approches différentes ont été présentées dans ce manuscrit pour valider les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale (critères de performance, comparaison de méthodes, profil d'exactitude). Ces approches ont été retenues pour leur application à plusieurs types de méthodes de dépistage (conventionnelles et biocapteurs).

Pourquoi avait-on plusieurs approches d'évaluation de la performance coexistantes ?

Parce que des approches réglementaires cohabitent avec des approches normatives pour la certification, ainsi qu'avec des approches plus récemment développées et qui en sont au début de leur intégration dans des normes ou dans la réglementation.

Est-ce que la validation des méthodes de dépistage a évolué ces dernières années?

Dans le domaine des résidus d'antibiotiques, l'approche critère par critère a évolué de la décision 93/256/CE à la décision 20002/657/CE), mais les principes de base ont toujours été la détermination de caractéristiques de performance et la validation de la méthode, en fonction de critères de performance attendus (réglementaires ou non). Nous avons appliqué l'approche critère par critère décrite dans la décision 93/256/CE à une méthode de type biocapteur, basé sur la détection optique SPR (**Article 1**). Cette application a montré que l'approche préconisée dans cette décision n'était pas satisfaisante. La détermination de la LOD à partir des blancs n'était pas un bon estimateur de la capacité d'une méthode de dépistage à détecter ou non un antibiotique à une concentration cible. De plus, aucun critère n'était fixé dans cette décision quant à un taux maximum de faux résultats-négatifs, alors que c'est là que se situe le risque pour le consommateur.

L'approche de la certification AFNOR s'est inspirée de la validation des méthodes microbiologiques pour la détection des bactéries (microbiologie alimentaire). Lors de la rédaction du premier référentiel AFNOR pour les méthodes dédiées à la détection des résidus d'antibiotiques, en 2005, nous avons proposée au groupe de travail chargé de la rédaction de mettre en place sur une approche critères. En effet, en tant que laboratoire expert pour l'AFNOR, nous avons participé à la rédaction de ce premier référentiel et j'avais participé à ce groupe de travail. Toutefois, le principe constitutif de l'AFNOR pour une certification était la comparaison de méthodes. En effet, dans le domaine de la microbiologie alimentaire, les méthodes de référence sont des méthodes normalisées, ce qui n'est pas le cas dans le domaine du dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments.

Grâce à la mise en application de ce référentiel sur une méthode microbiologique de dépistage (**Article 2**), nous avons vu que l'approche par comparaison de méthodes est difficile à mettre en place dans le domaine des résidus. Le principal problème réside dans le fait que des méthodes de référence normatives n'existent dans notre domaine. Ceci s'explique du fait que notre approche de validation des méthodes a toujours été l'approche critères. Le choix d'une méthode assimilée à une méthode de référence est complexe car parfois ces méthodes ont des principes différents de la

méthode alternative et sont basés sur une préparation de matrices différente, ce qui complique l'étude d'évaluation. De plus, il n'est pas envisageable de comparer un kit produit par un fabricant avec un autre kit commercial. Enfin, certaines des méthodes employées comme MR sont devenues obsolètes et totalement inutilisées, y compris au laboratoire expert.

Du fait de la coexistence de différentes approches d'évaluation et du fait que l'approche par comparaison n'est pas celle retenue par la réglementation européenne, le nombre de méthodes évalués et validées suivant le principe de comparaison est resté très faible. Pour preuve, en Décembre 2015, 121 kits ont obtenus la marque NF Validation dans le domaine de la microbiologie alimentaire et trois kits seulement dans le domaine du dépistage des résidus d'antibiotiques (deux pour le lait un pour le muscle).

Quant à l'approche globale, elle a d'abord été développée pour les méthodes quantitatives (profil d'exactitude), puis aux méthodes qualitatives (POD). L'utilisation de cette approche à une méthode ELISA conventionnelle pour la détection de la nicarbazine dans les œufs a permis de conclure que le profil d'exactitude est tout à fait applicable aux méthodes de dépistage quantitatives, type immunologique, pour les résidus d'antibiotiques (**Article 3**). Nous avons abouti à deux conclusions : soit la méthode doit être utilisée comme une méthode qualitative, soit elle peut être utilisée comme une méthode quantitative, mais sur un intervalle de dosage réduit. De plus, cette approche a aussi été appliquée avec succès pour valider une méthode de type biocapteur optique sur le système Biacore X pour le dépistage de la sufaméthazine dans le lait [278]. L'approche globale est à présent recommandée dans le domaine de la microbiologie alimentaire, dans la nouvelle norme NF EN FDIS 16140-2 [266], mais aussi dans le nouveau protocole AOAC [279], sous la forme de la POD pour les méthodes qualitatives pour les deux référentiels, et du profil d'exactitude pour les méthodes quantitatives dans la norme uniquement.

L'abrogation de la décision 93/256/CE [290] par la décision 2002/657/CE [13] a été une grande avancée pour la validation des méthodes pour les résidus d'antibiotiques. La capacité de détection ou CC β était la caractéristique innovante de cette décision pour les méthodes de dépistage. Toutefois, la mise en application de cette décision a été complexe et tardive puisqu'elle comportait très peu d'informations pratiques pour déterminer les caractéristiques de performance des méthodes de dépistage. Nous avons appliqué les exigences de la décision 2002/657/CE [13] à une méthode microbiologique conventionnelle basée sur 5 boîtes (**Article 4**). Nous avons pu ainsi poser les bases d'un protocole de validation, suivant le guide européen de 2010 [256], pour une matrice solide, le muscle. Ce type de validation est très lourd et complexe à organiser et mettre en place, du fait du grand nombre d'analytes détectés et de la matrice. Les recommandations du guide concernant la détermination des CC β pour des antibiotiques représentatifs et l'utilisation de tissus simulés pour caractériser une méthode microbiologique ont montré leur intérêt dans cette étude.

Enfin, nous avons expérimenté l'approche critère par critère du guide européen [256] à une méthode de type biocapteur appelé Evidence Investigator® pour la détection de 6 familles d'antibiotiques dans le miel (**Article 5**). La mise en pratique des valeurs seuils T et Fm pour la caractérisation des performances de cette méthode a montré l'applicabilité de cette approche, mais aussi l'intérêt de la

détermination de ces seuils pour statuer sur la validité de la méthode, pour suivre les performances de la méthode en routine, avec les contrôles qualité.

Nous pouvons conclure que quelle que soit l'approche de validation choisie (critère par critère ou globale suivant la POD), la charge des expérimentations nécessaires pour valider une méthode microbiologique à large spectre (intra-laboratoire ou kit commercial) est très lourde. Aucune des approches de validation testées dans cette thèse n'apporte de réelle solution pour réduire cette charge de travail, par rapport à l'approche du guide de validation Européen (2010).

En fonction du type de méthodes, la charge de travail représentée par l'étude d'évaluation est complètement différente pour plusieurs raisons :

- En fonction de la matrice : la préparation d'échantillons de lait supplémentés est beaucoup plus simple et rapide que la préparation de muscles supplémentés, surtout quand la méthode (*eg.* méthode STAR) est basée sur l'analyse de morceaux de muscle intacts et non d'extraits de muscle. C'est dans cette perspective que le guide Européen préconise l'utilisation de tissus simulés pour ce type de méthode microbiologique.
- En fonction de la méthode : si la méthode est incapable de discriminer les résidus d'antibiotiques détectés, sans parler de les identifier, il est impossible de mélanger plusieurs antibiotiques dans un même échantillon pour l'évaluation. Par contre, si la méthode est multiplex (*eg.* Evidence Investigator®, Randox), il est possible de mélanger plusieurs antibiotiques dans un même échantillon. Une seule analyse donnera le résultat de l'évaluation pour plusieurs familles simultanément. De plus, si la méthode nécessite une étape d'extraction de la matrice (*eg.* muscle), la préparation d'échantillons supplémentés est simplifiée, par rapport à l'analyse de la matrice brute.

Nous pouvons conclure que la décision 2002/657/CE [13] grâce au CC β principalement a permis de grandement améliorer l'évaluation des performances des méthodes de dépistage. En outre, c'est surtout le guide de validation Européen [256] qui a constitué un net progrès en proposant des lignes directrices et des protocoles pour les méthodes de dépistage, pour appliquer cette décision aux méthodes de dépistage qualitatives et quantitatives. Nous avons appliqué les exigences de cette décision basée sur l'approche critère par critère à deux types de méthodes très différentes (une méthode conventionnelle microbiologique et une méthode innovante de type biocapteur basé sur la chimiluminescence). Nous pouvons ainsi conclure que cette approche est applicable, quel que soit le type de méthodes de dépistage. Nous avons même dans la littérature des exemples d'application de cette approche recommandée dans le guide de validation (2010), à des méthodes de dépistage physico-chimiques, de type CL-SM/SM [40, 329]. Dans ces publications, la méthode CL-SM/SM, même si elle peut donner des résultats quantitatifs est traitée comme une méthode qualitative, puisqu'à l'étape du dépistage, il n'est pas nécessaire de quantifier les résidus. Le CC β est donc déterminé comme pour les méthodes biologiques de dépistage. Il doit bien être inférieur à la LMR, par exemple, alors que pour une méthode de confirmation, le CC β est forcément supérieur à la LMR. Un autre guide européen propose des lignes directrices équivalentes à celle du guide européen pour la validation des méthodes de dépistage, concernant les méthodes de dépistage qualitatives. Il s'agit du

guide SANCO 12495/2011 [330] qui concerne la validation des méthodes pour les pesticides dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Le protocole recommande d'analyser au moins 20 échantillons supplémentés. Une limite de détection du dépistage (Screening detection limit SDL) est ensuite déterminée comme la plus petite concentration pour laquelle moins de 5% des échantillons donnent un résultat négatif. La définition est identique à celle du CC β . Ce guide concerne essentiellement les méthodes de dépistage CL-SM/SM multi-résidus, les plus utilisées dans le domaine des pesticides. D'une part, cela confirme l'applicabilité de l'approche qualitative du CC β aux méthodes de dépistage CL-SM/SM multi-résidus, mais aussi cela permet de faire un rapprochement entre deux secteurs d'analyse, qui pour le moment ont des règles différentes, celui des résidus de médicaments vétérinaires et celui des pesticides, dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Pourquoi ne pas harmoniser les approches et avoir un même référentiel pour ces deux types de résidus, pourquoi ils objectifs sont identiques et le type de méthodes utilisées aussi.

Comme cela a été réalisé dans le cadre de ce travail de thèse, une comparaison de différentes approches de validation a été réalisée dans le domaine pharmaceutique par Bouabidi *et al.* [331]. Les auteurs ont proposé une revue de trois différentes approches (descriptive, par différence et par équivalence). L'approche descriptive consiste à estimer des paramètres statistiques de performance. L'approche par différence utilise des tests statistiques bilatéraux à hypothèse. Les deux premières approches sont des approches classiques. L'approche par équivalence consiste à comparer des intervalles de confiance sur des paramètres par rapport à des limites d'acceptation (profil d'exactitude, POD). Bouabidi *et al.* ont appliqué ces trois approches à la validation de deux méthodes physico-chimiques, basées sur la CLHP. Leur conclusion est que les approches classiques peuvent donner des résultats contradictoires, qui ne permettent pas de conclure sur la validité de la méthode pour atteindre les objectifs attendus. Selon leurs expériences, seule l'approche basée sur le profil d'exactitude permet de garantir la validité de la méthode, particulièrement concernant la justesse de la méthode. Les conclusions sont identiques à celles de Feinberg *et al.* [271]. Cet article concerne uniquement les méthodes quantitatives d'analyse dans l'industrie pharmaceutique. De ce fait, l'approche de la Décision européenne 2002/657/CE n'est pas du tout abordée dans cet article.

Perspectives

Suite à ces travaux de thèse, nous nous sommes posé une question : **peut-on et doit-on encore améliorer la validation des méthodes de dépistage ?** Définitivement oui.

Plusieurs perspectives d'évolution de la validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires sont envisagées, voire démarrées (**Figure 55**).

- Au niveau national et international, deux nouveaux référentiels sont en cours de rédaction dans des groupes de travail.

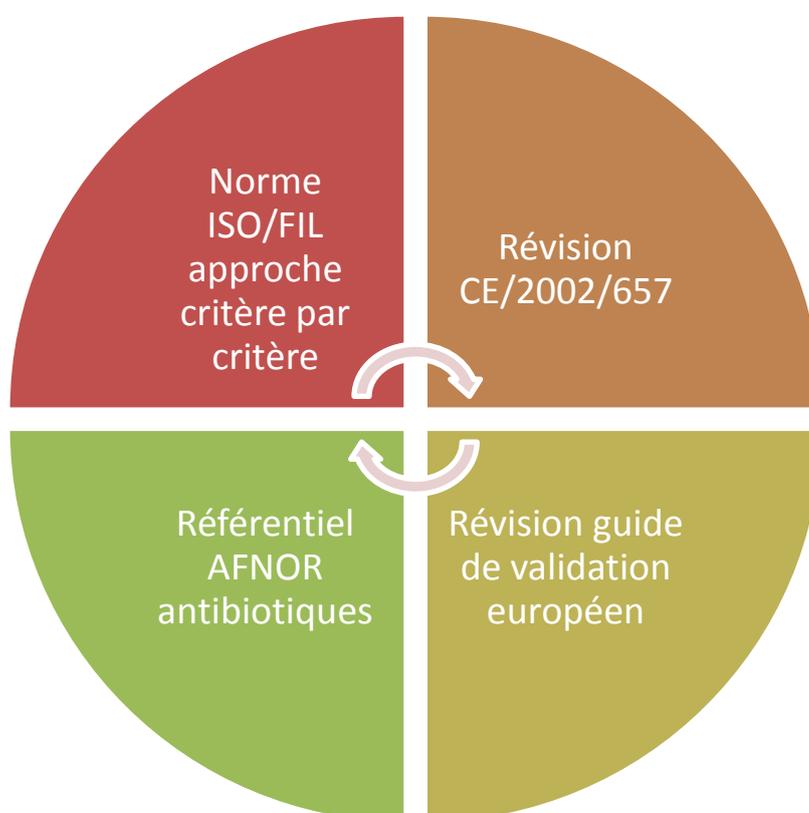
- un nouveau référentiel de validation AFNOR, que j’anime, est basé sur l’approche critère par critère, telle que recommandée dans le guide de validation des méthodes de dépistage (2010). Ce référentiel sera applicable à toutes les denrées alimentaires d’origine animale.
- Au niveau international, la rédaction d’une norme ISO/FIL pour la validation des méthodes de dépistage biologiques et qualitatives pour les résidus de médicaments vétérinaires dans le lait. La Fédération Internationale du Lait (FIL) s’intéresse uniquement à la matrice lait et à ses produits dérivés (*eg.* fromage, crème). Dans ce cadre, je suis co-chef de projet pour rédiger le projet de norme et animer le groupe de travail qui se réunit annuellement à la semaine analytique de la FIL. Ce projet de norme s’inspire fortement aussi du guide de validation européen (2010) et reprend donc l’approche critère par critère.

Ces deux projets vont répondre à une demande forte des fabricants de kits qui jusqu’ici :

- d’une part, les fabricants devaient le plus souvent réaliser ou faire réaliser deux validations en parallèle, voire trois pour un même kit. En effet, certains clients français ou étrangers demandaient au fabricant de présenter un certificat AFNOR pour leur kit, quand les clients outre-Atlantique demandaient plutôt une certification AOAC. De plus, les clients réglementaires, responsables du contrôle officiel dans leur pays, clients européens ou dont les pays échangent avec la communauté européenne demandaient une validation selon la réglementation européenne, c.-à-d. la décision européenne 2002/657/CE [13] et le guide de validation européen (2010) [256]. Dès la mise en application du nouveau référentiel AFNOR, il ne sera plus nécessaire de réaliser deux études de validation en parallèle pour un même kit, puisque le référentiel AFNOR permettra de répondre aux exigences réglementaires de la décision 2002/657/CE [13]. Il en sera de même pour les kits de dépistage dans le lait, quand la future norme ISO/FIL sera utilisée pour réaliser des validations de kits.
- d’autre part, les fabricants réclamaient une sorte de « tampon » ou certificat qui atteste de la performance de leur kit, grâce à une validation réalisée par un laboratoire extérieur et reconnue dans toutes les parties du monde. De ce point de vue, la certification selon la marque NF Validation devrait répondre à cette demande. En effet, du fait du changement d’approche (comparaison => critère par critère), la certification selon la marque NF Validation va acquérir une meilleure reconnaissance au niveau européen et international. De plus, elle possède l’avantage de conserver l’étape de l’étude collaborative, qui renseigne sur la fidélité de la méthode. Un autre plus de la certification AFNOR est qu’en plus de l’évaluation technique, les sites de production des kits sont audités périodiquement. De même, une validation réalisée selon la future norme ISO/FIL devrait aussi répondre à cette demande de reconnaissance, puisqu’il s’agira d’une norme internationale. Cette norme spécifique du lait et des produits laitiers ne possède pas de volet étude collaborative, ni d’audit de la production. Toutefois, une évaluation complémentaire est demandée par rapport à la certification AFNOR qui implique l’analyse d’un grand nombre d’échantillons terrain.

L’harmonisation des protocoles et le choix d’une seule approche d’évaluation de la performance permettra la comparabilité des résultats des évaluations et apportera des bases fiables pour le choix d’un kit en fonction de ses performances annoncées. La présentation des résultats de validation dans les notices des kits pourra aussi être harmonisée. Tout cela facilitera la comparaison entre kits et le choix d’un kit par un client.

Figure 55. Perspectives d'évolution de la validation des méthodes de dépistage pour les résidus d'antibiotiques.



Quand la future norme ISO/FIL entrera en vigueur, il est probable aussi que le référentiel AFNOR, au moins pour la partie matrice lait, puisse être revu pour répondre à toutes les exigences de la norme et ainsi pourvoir accorder la marque NF Validation selon cette norme ISO/FIL.

- Au niveau européen, la décision européenne 2002/657/CE [13] va faire l'objet d'une révision. En effet, les principaux facteurs qui justifient sa révision sont :

- Le manque de données sur les méthodes de dépistage,
- L'évolution importante des techniques analytiques pour les méthodes physico-chimiques de confirmation en particulier, depuis sa parution et la nécessité de prendre en compte ces évolutions technologiques dans les approches de validation (*eg.* développement croissant de méthodes multi-résidus, méthodes non ciblées),
- L'évolution de la réglementation sur le contrôle des résidus (substances anabolisantes et interdites, médicaments vétérinaires et contaminants) à travers la révision de la directive 96/23/CE [2] et du règlement 882/2004/CE [332].

Etant donné le peu d'informations concernant les méthodes de dépistage dans cette décision [13], il est primordial que cette révision inclue, soit les lignes directrices du guide de validation européen des méthodes de dépistage de 2010 [256], soit la référence à ce guide, afin d'aider de nouveaux laboratoires pour la mise en place de la décision. L'intégration complète du guide de validation dans la décision alourdirait considérablement la nouvelle décision, qui devra déjà intégrer les nouvelles technologies de spectrométrie de masse multi-résidus par exemple. De plus, la révision de ce type de décisions est beaucoup plus complexe et longue que la révision d'un guide.

De 2002 à 2010, nous avons acquis une grande expérience de la validation de méthodes biologiques de dépistage. De plus, la mise en pratique des lignes directrices contenues dans ce guide européen par les LNR et d'autres laboratoires européens ou non, a montré différents inconvénients ou que certaines approches ne sont jamais utilisées.

La capacité de détection est la caractéristique majeure pour la validation d'une méthode de dépistage, avec la spécificité. Le $CC\beta$ à lui seul permet de conclure à la validité de la méthode, en fonction du rapport entre le $CC\beta$ et la limite réglementaire correspondante, puisqu'il n'existe pas de critère fixe sur le taux de faux-positifs (spécificité).

Les points suivants pourraient être modifiés dans une nouvelle version du guide de validation des méthodes de dépistage :

- **Pourrait-on envisager de fixer l'erreur β à une autre valeur que 5% ?** L'erreur beta a été fixée à 5 % dans la décision 2002/657/CE [13] aussi bien pour les substances interdites que pour les substances autorisées. Au contraire, le $CC\alpha$ de la méthode de confirmation est fixé à 1 % pour les substances interdites et 5% pour les substances autorisées. En effet, la réglementation a établi que le risque à prendre pour identifier une substance interdite devait être plus petit que celui pris pour identifier une substance autorisée. Dans cette optique, pourquoi ne pas décider de déterminer un $CC\beta$ avec un risque β de 1 % pour les méthodes de dépistage, afin de diminuer le risque d'obtenir des résultats faux-négatifs. Toutefois, pour mettre en évidence un risque de 1%, soit 1 résultat faux négatif sur 100 échantillons, la

charge de travail serait beaucoup plus importante puisque cette détermination nécessiterait un minimum de 100 échantillons supplémentés à la CCD. Les méthodes de dépistage biologiques, pour les substances interdites, étant dans la majorité des cas ciblées sur un seul analyte, cette détermination ne concernerait que cet analyte et non plusieurs comme les méthodes pour les substances à LMR. A l'inverse, il pourrait être considéré que, dans certains cas, le risque β de 5% est trop exigeant et envisager de recommander pour des cas particuliers de fixer le risque β à 10% par exemple. En effet, quand la CCD est très inférieure à la LMR pour une substance autorisée, même si le risque est fixé à 10% à la CCD (*i.e.* concentration qui sera égale au $CC\beta$ si le taux de faux négatifs est inférieur à β à cette concentration), le risque d'observer plus de 5% de résultats faux-négatifs au niveau de la LMR, sera très faible.

- Pour les substances autorisées qui n'ont pas de LMR dans certaines combinaisons matrice/espèce (*eg.* espèces mineures), il faudrait indiquer dans le futur guide à quel niveau la méthode de dépistage doit être validée.
- Il faudrait préciser pour les kits commerciaux, d'utiliser plusieurs lots de production pour la détermination du $CC\beta$ et de la spécificité. De même, pour des méthodes développées intra-laboratoire, il sera recommandé, par exemple, d'utiliser plusieurs productions de souches bactériennes ou de milieux de culture, pour une méthode microbiologique. Dans le guide actuel, seule une approche alternative proposée par le LRUE de Berlin prend en compte l'influence des lots de kits sur les caractéristiques de performance de la méthode. Cette approche alternative est basée sur l'utilisation d'un plan d'expériences qui permet de faire varier plusieurs facteurs simultanément [333]. Nous n'avons trouvé aucune publication présentant l'utilisation de cette approche pour valider une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques ou autres médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires.
- Il faudrait ajouter que, pour une extension d'analyte, seul le $CC\beta$ de cet analyte doit être déterminé, sauf si la méthode a été modifiée pour intégrer cet analyte dans la méthode.
- **Pourquoi ne pas envisage de fixer un critère maximum pour le taux de faux-positifs pour les méthodes de dépistage?** Un taux de faux positifs élevé n'a pas d'impact sur la sécurité des aliments, puisque tous les échantillons positifs sont confirmés par une méthode physico-chimique. Toutefois, l'impact sur le cout des analyses et le cout du contrôle, officiel ou non, est très impacté par un taux de faux-positifs élevé.
- **Pourrait-on envisager d'intégrer l'approche globale de la POD pour les méthodes qualitatives ou celle du profil d'exactitude pour les méthodes quantitatives au nouveau guide ou à la décision 2002/657/CE** pour la détermination des $CC\beta$. Waldron et al., lors d'une validation AOAC, ont utilisé la courbe dose-réponse pour estimer la capacité de détection $CC\beta$ [296]. Puis ils ont vérifié ce $CC\beta$ estimé, au moyen de 60 échantillons supplémentés à cette concentration. Le profil d'exactitude a fait ses preuves pour évaluer les performances quantitatives de méthodes de dépistage immunologique (*eg.* ELISA, biocapteur optique). La question qui se pose est : Sera-t-il possible de dériver le $CC\beta$ de la POD et/ou du

profil d'exactitude ? Ce sont des pistes que nous allons continuer à suivre afin d'améliorer les protocoles de validation des méthodes de dépistage et la caractérisation de ces méthodes.

Pour les immunologiques, de type biocapteur, comme le système Evidence Investigator®, l'approche de validation critère par critère est tout à fait adaptée. Le choix a été fait de valider ce type de méthodes uniquement en qualitatif. Pourtant, le système Evidence Investigator® par exemple, offre la possibilité de réaliser des analyses quantitatives. Une gamme d'étalonnage en tampon comprenant 9 points est fournie avec le kit. Le fabricant recommande d'analyser une gamme à chaque jour d'essai pour garantir les performances quantitatives de la méthode. Le choix de valider ce type de méthode comme une méthode qualitative permet de réduire le coût de la validation (la fidélité serait à déterminer en plus) et le coût des analyses en routine (4 Contrôles Qualité (2 QC positifs et 2 QC négatifs) pour chaque série d'échantillons, au lieu de 9 puces pour une gamme d'étalonnage). Etant donné que l'utilisation des QC, le calcul du Fm et du T permettent de conclure sur la positivité des échantillons positifs par rapport au seuil du CC β .

L'approche par comparaison de méthodes n'est pas du tout adaptée à ce type de méthodes. En effet, aucune méthode de référence ne pourrait convenir pour lui être comparée et la charge de travail serait augmentée. Quant à l'approche globale selon la POD et/ou le profil d'exactitude, elle pourrait être appliquée à ce type de méthodes. L'approche du profil d'exactitude qui est une approche quantitative demanderait l'analyse de 60 échantillons en tout pendant la validation pour déterminer le profil d'exactitude (30 essais pour le plan d'étalonnage et 30 essais pour le plan de validation (5 niveaux de concentration, 3 jours, 2 répétitions)). Toutefois, il resterait à déterminer le CC β par l'analyse de 20 à 60 échantillons supplémentés à la concentration cible et la spécificité par l'analyse de 20 à 60 échantillons blancs.

L'approche POD nécessite l'analyse de trois niveaux de concentration au minimum, avec un nombre de répétitions, qui peut être différent en fonction de la concentration. Le protocole de validation pourrait consister à analyser 20 répétitions pour le niveau zéro (blanc), 20 répétitions pour la concentration cible, qui correspond à la limite de détection attendue et 5 répétitions pour une concentration plus élevée. Le poids serait mis sur la LOD attendue puisque c'est le paramètre qui nous intéresse. Donc, avec 45 essais, la limite de détection à 50 % et à surtout la LOD 95 % pourrait être calculée. Cela répondrait aux exigences du guide de validation concernant la spécificité avec l'analyse des 20 blancs. La LOD 95 %, qui est définie comme le niveau de contamination donnant une probabilité de 95 % d'obtenir un résultat d'analyse positif, ce qui correspond au CC β .

Conclusion générale

En conclusion, la validation des méthodes est un outil pour garantir un contrôle harmonisé et efficace, pour garantir la santé des consommateurs.

A ce jour, l'évolution des approches de validation des méthodes de dépistage biologiques n'est pas en lien avec les innovations technologiques en termes de biocapteurs. En effet, nous avons montré que

le guide de validation européen s'applique très bien aux systèmes biocapteurs immunologiques, ainsi que l'approche globale. Ce n'est donc pas ce facteur qui pousse vers la révision des référentiels actuels pour le dépistage. Toutefois, étant donné les avancées technologiques en terme de méthodes physico-chimiques multi-résidus, potentiellement applicables au dépistage des résidus d'antibiotiques, peut-être faudra-t-il tenir compte à l'avenir de ces nouvelles technologies pour réviser le guide européen ? Les méthodes CL-SM/SM classiques pouvant être validées suivant le guide européen.

L'utilisation de nouvelles approches dans d'autres domaines, comme l'approche globale pourraient faire évoluer l'approche classiquement utilisée pour les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques.

Le contrôle réglementaire actuel est basé sur les limites réglementaires. Les méthodes de dépistage doivent pouvoir détecter la présence d'un antibiotique sous la LMR ou la LPMR, mais sans forcément descendre très bas. La tendance actuelle est d'orienter le contrôle vers une estimation du risque. Pour cela, les méthodes devraient pouvoir détecter les antibiotiques le plus bas possible afin de contrôler l'exposition du consommateur à ce risque. Cette évolution du contrôle pourra amener à développer de nouvelles méthodes de dépistage, avec des seuils de détection plus bas et de valider ces nouvelles méthodes ou de revalider à des seuils inférieurs des méthodes déjà existantes.

RÉFÉRENCES

1. *Commission Regulation (EC) N° 470/2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin* 2009, The European parliament and the Council: Official Journal of the European Union p. 11-22.
2. *Directive 96/23/CE DU CONSEIL du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en oeuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/ 187/CEE et 91/664/CEE.* 1996: Journal officiel des Communautés européennes. p. 10-32.
3. *Plans de surveillance – Plans de contrôle - BILAN 2013.* 2014, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt - Direction Générale de l'Alimentation. .
4. Dorne, J.L.C.M. and J. Fink-Gremmels, *Human and animal health risk assessments of chemicals in the food chain: Comparative aspects and future perspectives.* Toxicology and Applied Pharmacology, 2013. **270**(3): p. 187-195.
5. Junza, A., et al., *High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from β -lactam antibiotics in thermally treated milk.* Journal of Chromatography A, 2014. **1368**(0): p. 89-99.
6. Wal, J.M. and G. Bories, *Elimination de la pénicilline libre et fixée sous forme de conjugués pénicilloylprotéines dans le lait de vache après traitement par voie intramammaire.* Annales de biologie animale, biochimie, biophysique, 1975. **15**(3): p. 615-617.
7. *Regulation (EC) No 1831/2003/EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, replacing Directive 70/524/EEC on additives in feeding-stuffs.* 2003: Official Journal of the European Union. p. 29-43.
8. Castanon, J.I.R., *History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds.* Poultry Science, 2007. **86**(11): p. 2466-2471.
9. Pletinckx, L.J., et al., *Evidence of possible methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 spread between pigs and other animals and people residing on the same farm.* Preventive Veterinary Medicine, 2013. **109**(3-4): p. 293-303.
10. Sapkota, A., et al., *Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities.* Environment International, 2008. **34**(8): p. 1215-1226.
11. *Council regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.* 1990: Official Journal of the European Communities. p. 1-8.
12. *Council Regulation (EU) (2010) N 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.* 2009: Official Journal of European Union. p. 1-72.
13. *Commission Decision (EC) N° 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results.* 2002: Off J Eur Comm. p. 8-36.
14. EFSA, *Guidance on methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPAs) for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin.* 2013: EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain - EFSA Journal. p. 24.
15. EFSA, *Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed.* 2014: EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain - EFSA Journal. p. 145.
16. EFSA, *Scientific Opinion on nitrofurans and their metabolites in food.* 2015: EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain - EFSA Journal. p. 217.
17. *Commission decision of 11 January 2005 laying down harmonised standards for the testing for certain residues in products of animal origin imported from third countries.* 2005: Official Journal of the European Union. p. 61-63.
18. Gillet, A., et al., *Chemical and microbiological analysis of neomycin.* Journal de pharmacie de Belgique, 1972. **27**(4): p. 381-401.

19. Bogaerts, R. and F. Wolf, *A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat*. Die Fleischwirtschaft, 1980. **60**: p. 672-674.
20. Bogaerts, R., J.M. Degroodt, and D. de Vos, *The microbiological assay of chloramphenicol hemisuccinate and application of the method with pyrrolidinomethyltetracycline (rolitetracycline) (author's transl. Annales Pharmaceutiques Françaises, 1982. 40(1): p. 37-41.*
21. JO, *Méthodes officielles d'analyse relatives à la détection des antibiotiques et des sulfamides dans les laits destinés à l'alimentation humaine et animale*. 1983: Journal Officiel de la République Française. p. 9089-9093.
22. Montero, A., et al., *Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100(R)) for ewe milk*. Small Ruminant Research, 2005. **57**(2-3): p. 229-237.
23. Hennart, S.L.A. and J. Faragher, *Validation of the Delvotest SP NT DA*. Journal of AOAC International, 2012. **95**(1): p. 252-260.
24. Gaudin, V., C. Hedou, and E. Verdon, *Validation of a wide-spectrum microbiological tube test, the EXPLORER test, for the detection of antimicrobials in muscle from different animal species*. Food Additives and Contaminants: Part A, 2009. **26**(8): p. 1162-1171.
25. Gaudin, V., et al., *AFNOR validation of Premi®Test, a microbiological-based screening tube-test for the detection of antimicrobial residues in animal muscle tissue*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2008. **25**(12): p. 1451 - 1464.
26. Gaudin, V., et al., *Comparative study of three screening tests, two microbiological tube tests, and a multi-sulphonamide ELISA kit for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2009. **26**(4): p. 427-440.
27. Schneider, M. and S. Lehotay, *A comparison of the FAST, Premi® and KIS tests for screening antibiotic residues in beef kidney juice and serum*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **390**: p. 1775-1779.
28. Cantwell, H. and M. O'Keeffe, *Evaluation of the Premi Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney*. Food Additives and Contaminants, 2006. **23**(2): p. 120-125.
29. Gaudin, V., et al., *Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk*. Food Additives and Contaminants, 2004. **21**(5): p. 422-433.
30. Gaudin, V., et al., *Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2010. **27**(7): p. 935-952.
31. Calderon, V., et al., *Evaluation of a multiple bioassay technique for determination of antibiotic residues in meat with standard solutions of antimicrobials*. Food Additives & Contaminants: Part A, 1996. **13**(1): p. 13-19.
32. Díez, P., et al., *Validation of the five-plate screening test for the detection of antibiotic residues in food. Estimation of the limit of detection*. Revista del Comité Científico de la AESAN, 2012. **16**: p. 109-130.
33. Myllyniemi, A.-L., et al., *A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples*. Anal, 2001. **126**(5): p. 641-646.
34. Pikkemaat, M.G., et al., *Nouws antibiotic test: Validation of a post-screening method for antibiotic residues in kidney*. Food Control, 2009. **20**(9): p. 771-777.
35. Moscoso, S., et al., *Detection of Quinolones in Commercial Eggs Obtained from Farms in the Espaíllat Province in the Dominican Republic*. Journal of Food Protection, 2015. **78**(1): p. 214-217.
36. Schneider, M.J., et al., *Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum*. Analytica chimica acta, 2009. **637**: p. 290-297.
37. Kilinc, B. and S. Cakli, *Screening for antibiotic residues in the trout by the Four Plate test, Premi test and ELISA test*. European Food Research and Technology, 2008. **226**(4): p. 795-799.

38. Pikkemaat, M.G., M.L.B.A. Rapallini, and J.G. Van Der A, *Evaluation of tetracycline positive slaughter animals with the Nouws antibiotic test: Rejection of slaughter animals without confirmatory analysis*. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 2009. **32**(1): p. 94.
39. Pikkemaat, M.G., *Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**: p. 893–905.
40. Gaugain-Juhel, M., et al., *Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2009. **26**(11): p. 1459-1471.
41. Bohm, D.A., C.S. Stachel, and P. Gowik, *Validation of a multi-residue method for the determination of several antibiotic groups in honey by LC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **403**(10): p. 2943-2953.
42. Heller, D.N., et al., *Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and beta-lactam residues*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(15): p. 5267-78.
43. Franek, M. and K. Hruska, *Antibody based methods for environmental and food analysis: a review*. Veterinarni Medicina, 2005. **50**(1): p. 1-10.
44. Link, N., et al., *A novel generic dipstick-based technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples*. Journal of Biotechnology, 2007. **128**(3): p. 668-680.
45. Schneider, E., et al. *Rapid detection of chloramphenicol in raw milk by enzyme linked immunofiltration and dipstick assay*. in Euroresidue II. 1993.
46. Byzova, N.A., et al., *Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products*. Analytica Chimica Acta, 2011. **701**(2): p. 209-217.
47. Gaudin, V., A. Rault, and E. Verdon, *Validation of a commercial receptor kit Sulfasensor® Honey for the screening of sulfonamides in honey according to the Commission Decision 2002/657/EC*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2012. **29**(6): p. 942-950.
48. Gaudin, V., A. Rault, and E. Verdon, *Validation of a commercial receptor kit for tetracycline residues in honey according to the European guideline for screening methods*. Food and Agricultural Immunology, 2013. **24**(1): p. 111-128.
49. Reybroeck, W., et al., *Validation of the beta-s.t.a.r. 1+1 for rapid screening of residues of b-lactam antibiotics in milk*. Food Additives and Contaminants, 2010. **27**(8): p. 1084–1095.
50. Zvirdauskiene, R. and J. Salomskiene, *An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk*. Food Control, 2007. **18**(5): p. 541-547.
51. Reybroeck, W., et al., *Validation of the Charm MRL-3 for Fast Screening of β -Lactam Antibiotics in Raw Milk*. Journal of AOAC International, 2011. **94**(2): p. 373-382.
52. Brady, M.S. and S.E. Katz, *A microbial assay system for the confirmation of results of receptor assays for antibiotic residues in milk*. Journal of Food Protection, 1989. **52**(3): p. 198-201.
53. Carlsson, A., L. Bjorck, and G. Johnsson, *The use of different microbial assays in combination with the Charm II test in the detection of antibiotic residues in herd milk*. International Dairy Journal, 1992. **2**(2): p. 109-119.
54. Munstedt, T.R., E.; Petz, M., *HPLC, Charm II and ELISA: Advantages and disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey*. ApiActa, 2005. **40**: p. 5-9.
55. Korsrud, G.O., et al., *Evaluation and testing of Charm test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in meat*, in *Analysis of antibiotic/drug residues in food products of animal origin*, V.K. Agarwal, Editor. 1992: Plenum Press, New York. p. 75-79.
56. Quintana-Rizzo, J., R. Salter, and S. Saul, *Solid Phase Extraction procedures for validation of Charm II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection in honey*. ApiActa, 2005. **40**: p. 55-62.

57. McMullen, S.E., J.A. Lansden, and F.J. Schenck, *Modifications and adaptations of the Charm II rapid antibody assay for chloramphenicol in honey*. Journal of Food Protection, 2004. **67**(7): p. 1533-1536.
58. Adesiyun, A., et al., *Prevalence of antimicrobial residues in table eggs in Trinidad*. Journal of Food Protection, 2005. **68**(7): p. 1501-5.
59. Swapna, K.M., R. Rajesh, and P.T. Lakshmanan, *Incidence of antibiotic residues in farmed shrimps from the southern states of India*. Indian Journal of Marine Sciences, 2012. **41**(4): p. 344-347.
60. Schortini, G., et al., *ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria*. Analytica Chimica Acta, 2005. **535**: p. 43-48.
61. Gaudin, V., C. Hedou, and E. Verdon, *Validation of 2 ELISA kits for the screening of tylosin and streptomycin in honey according to the European decision EC/2002/657*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013. **30**(1): p. 93-109.
62. de Oliveira, R.C., J.A.R. Paschoal, and F.G.R. Reyes, *Streptomycin and dihydrostreptomycin residues in bovine milk from the Brazilian retail market*. Food Additives & Contaminants: Part B, 2010. **3**(3): p. 156-162.
63. Franek, M., et al., *Validation of a monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of the furazolidone metabolite (AOZ) in eggs using various sample preparation*. Veterinarni Medicina, 2006. **51**(5): p. 248-257.
64. Luo, P.J., et al., *Development of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of the Furaltadone metabolite, 3-Amino-5-Morpholinomethyl-2-Oxazolidinone (AMOZ) in Animal Tissues*. Biomedical and Environmental Sciences, 2012. **25**(4): p. 449-457.
65. Muldoon, M.T., et al., *Development of a monoclonal antibody-based cELISA for the analysis of sulfadimethoxine. 1. Development and characterization of monoclonal antibodies and molecular modeling studies of antibody recognition*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(2): p. 537-544.
66. Adrian, J., et al., *Generation of Broad Specificity Antibodies for Sulfonamide Antibiotics and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Analysis of Milk Samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**: p. 385-394.
67. Huet, A.C., et al., *Simultaneous determination of (fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(8): p. 2822-7.
68. Thal, J., et al., *Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow's milk after therapeutical mastitis treatment*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **399**(3): p. 1051-1059.
69. Chafer-Pericas, C., et al., *Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays*. Analytica Chimica Acta, 2010. **662**: p. 177-185.
70. Eremin, S.A., et al., *Production of polyclonal antibodies and development of fluorescence polarization immunoassay for sulfanilamide*. Analytical Letters, 2005. **38**(6): p. 951-969.
71. Wang, Z.-H., et al., *Analysis of Sulfamethazine by Fluorescence Polarization Immunoassay*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007. **35**(6): p. 819-824.
72. Gasilova, N.V. and S.A. Eremin, *Determination of chloramphenicol in milk by a fluorescence polarization immunoassay*. Journal of Analytical Chemistry, 2010. **65**(3): p. 255-259.
73. Ton, X.A., et al., *Direct fluorimetric sensing of UV-excited analytes in biological and environmental samples using molecularly imprinted polymer nanoparticles and fluorescence polarization*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **36**(1): p. 22-28.
74. Adrian, J., et al., *A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and beta-lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(5): p. 1703-1712.

75. Zhu, K., et al., *Simultaneous detection of multiple chemical residues in milk using broad-specificity antibodies in a hybrid immunosorbent assay*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(5): p. 2716-2719.
76. Chen, J., et al., *A novel quantum dot-based fluoroimmunoassay method for detection of enrofloxacin residue in chicken muscle tissue*. *Food Chemistry*, 2009. **113**(4): p. 1197-1201.
77. Schwenzer, K.S. and J.P. Anhalt, *Automated fluorescence polarization immunoassay for monitoring streptomycin*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1983. **23**(5): p. 683-687.
78. Radovnikovic, A., et al., *Detection of banned nitrofurans metabolites in animal plasma samples using UHPLC-MS/MS*. *Journal of Chromatography B*, 2011. **879**(2): p. 159-166.
79. Evans, G.P. and M.G. Briers, *Can biosensors help to protect drinking water?* *Biosensors*, 1986. **2**: p. 287-300.
80. Best, D., *Biosensors revolutionize quality control*. *Prepared Foods*, 1987. **56**(11): p. 182-186.
81. Rawson, D.M., A.J. Willmer, and A.P.P. Turner, *Whole-cell biosensors for environmental monitoring*. *Biosensors*, 1989. **4**(5): p. 299-311.
82. Guilbault, G.G. and R.D. Schmid, *Biosensor for the determination of drug substances*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1991. **14**: p. 133-145.
83. Sternesjo, A., C. Mellgren, and L. Bjorck, *Determination of sulfamethazine residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay*. *Analytical Biochemistry*, 1995. **226**: p. 175-181.
84. Thompson, M., et al., *Electrochemical biosensors in the assay of antibiotics*. *Analytica Chimica Acta*, 1979. **104**(2): p. 195-203.
85. Kingdon, C.F.M., *An aminoglycoside biosensor incorporating free or immobilized bacterial cells*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985. **22**(3): p. 165-168.
86. Velusamy, V., et al., *An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors*. *Biotechnology Advances*, 2010. **28**(2): p. 232-254.
87. Vo-Dinh, T. and B. Cullum, *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000. **366**(6-7): p. 540-551.
88. Kiran, B.R. and K.U. Kale, *Transformed E. coli JM109 as a biosensor for penicillin*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002. **64**(3): p. 205-208.
89. Perumal, V. and U. Hashim, *Advances in biosensors: Principle, architecture and applications*. *Journal of Applied Biomedicine*, 2014. **12**(1): p. 1-15.
90. Bruggemann, O., et al., *New configurations and applications of molecularly imprinted polymers*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **889**(1-2): p. 15-24.
91. Quesada-Molina, C., et al., *Convenient solid phase extraction of cephalosporins in milk using a molecularly imprinted polymer*. *Food Chemistry*, 2012. **135**(2): p. 775-779.
92. He, Y., et al., *Molecular imprinting-chemiluminescence determination of trimethoprim using trimethoprim-imprinted polymer as recognition material*. *Analyst*, 2005. **130**(7): p. 1032-7.
93. Turiel, E., et al., *Molecular imprinting-based separation methods for selective analysis of fluoroquinolones in soils*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1172**(2): p. 97-104.
94. Xu, D.-M., et al., *Application of Aptamers in Food Safety*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011. **39**(6): p. 925-933.
95. de-los-Santos-Álvarez, N., et al., *SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers: Detection of neomycin B*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**(8): p. 2547-2553.
96. Mehta, J., et al., *In vitro selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol*. *Journal of Biotechnology*, 2011. **155**(4): p. 361-369.
97. Kim, Y.S., J.H. Niazi, and M.B. Gu, *Specific detection of oxytetracycline using DNA aptamer-immobilized interdigitated array electrode chip*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **634**(2): p. 250-254.
98. Song, K.-M., et al., *Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence-colorimetric methods*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **402**(6): p. 2153-2161.
99. Song, K.-M., et al., *A coordination polymer nanobelt (CPNB)-based aptasensor for sulfadimethoxine*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012. **33**(1): p. 113-119.

100. Stead, S.L., et al., *An RNA-Aptamer-Based Assay for the Detection and Analysis of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish Tissue*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(7): p. 2652-2660.
101. Vasapollo, G., et al., *Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011. **12**(9): p. 5908-5945.
102. Van Dorst, B., et al., *Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(4): p. 1178-1194.
103. Baggiani, C., L. Anfossi, and C. Giovannoli, *MIP-based immunoassays: State of the Art, limitations and Perspectives*. *Molecular Imprinting*, 2013. **1**: p. 41-54.
104. D'Souza, S.F., *Microbial biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001. **16**(6): p. 337-353.
105. Su, L., et al., *Microbial biosensors: A review*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(5): p. 1788-1799.
106. Bahl, M.I., L.H. Hansen, and S.J. Sørensen, *Construction of an extended range whole-cell tetracycline biosensor by use of the tet(M) resistance gene*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005. **253**(2): p. 201-205.
107. Virolainen, N.E., et al., *Rapid Detection of Tetracyclines and Their 4-Epimer Derivatives from Poultry Meat with Bioluminescent Biosensor Bacteria*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(23): p. 11065-11070.
108. Ferrini, A.M., et al., *Detection and Identification of β -Lactam Residues in Milk Using a Hybrid Biosensor*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**: p. 784-788.
109. Kumar, S., et al., *Cephalosporins Determination with a Novel Microbial Biosensor Based on Permeabilized *Pseudomonas aeruginosa* Whole Cells*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008. **151**(2-3): p. 653-664.
110. Ben-Yoav, H., et al., *Optical modeling of bioluminescence in whole cell biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**: p. 1969–1973.
111. Shapiro, E. and F. Baneyx, *Stress-activated bioluminescent *Escherichia coli* sensors for antimicrobial agents detection*. *Journal of Biotechnology - In Memoriam W.-D. Deckwer: Merging Process Engineering and Systems Biology*, 2007. **132**(4): p. 487-493.
112. Justino, C.I.L., A.C. Duarte, and T.A.P. Rocha-Santos, *Analytical applications of affibodies*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015. **65**: p. 73-82.
113. Baydemir, G., et al., *Strategies for the development of an electrochemical bioassay for TNF- α detection by using a non-immunoglobulin bioreceptor*. *Talanta*, 2016. **151**: p. 141-147.
114. Kang, D.H., et al., *Biomimetic detection of aminoglycosidic antibiotics using polydiacetylene-phospholipids supramolecules*. *Chemical Communications*, 2012. **48**(43): p. 5313-5315.
115. Schoukroun-Barnes, L.R., S. Wagan, and R.J. White, *Enhancing the Analytical Performance of Electrochemical RNA Aptamer-Based Sensors for Sensitive Detection of Aminoglycoside Antibiotics*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(2): p. 1131-1137.
116. Gu, Y., et al., *Biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymer with nitroreductase-like activity for metronidazole detection*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. **77**: p. 393-399.
117. Shin, H.Y., T.J. Park, and M.I. Kim, *Recent Research Trends and Future Prospects in Nanozymes*. *Journal of Nanomaterials*, 2015. **2015**: p. 11.
118. Wang, X., Y. Hu, and H. Wei, *Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond*. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2016. **3**(1): p. 41-60.
119. Sharma, T.K., et al., *Aptamer-mediated 'turn-off/turn-on' nanozyme activity of gold nanoparticles for kanamycin detection*. *Chemical Communications*, 2014. **50**(100): p. 15856-15859.
120. Weerathunge, P., et al., *Aptamer-Controlled Reversible Inhibition of Gold Nanozyme Activity for Pesticide Sensing*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(24): p. 11937-11941.
121. Pohanka, M. and P. Skládal, *Electrochemical biosensors - Principles and applications*. *Journal of Applied Biomedicine*, 2008. **6**(2): p. 57-64.
122. Thévenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001. **16**(1–2): p. 121-131.

123. Huet, A.-C., et al., *Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(11): p. 1281-1294.
124. Prodromidis, M.I., *Impedimetric immunosensors—A review*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(14): p. 4227-4233.
125. Conzuelo, F., et al., *Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using disposable amperometric magnetosensors*. Analytica Chimica Acta, 2014. **820**(0): p. 32-38.
126. Conzuelo, F., et al., *Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **36**(1): p. 81-88.
127. Song, W., et al., *Comparison of three genetically modified Escherichia coli biosensor strains for amperometric tetracycline measurement*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 69-74.
128. Conzuelo, F., et al., *Integrated Amperometric Affinity Biosensors Using Co²⁺-Tetradentate Nitrilotriacetic Acid Modified Disposable Carbon Electrodes: Application to the Determination of β -Lactam Antibiotics*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(6): p. 3246-3254.
129. Pellegrini, G., G. Carpico, and M. Petz, *Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk*. Analytica Chimica Acta, 2004. **520**(1-2): p. 13-18.
130. Lian, W., et al., *Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **38**: p. 163-169.
131. Ismail, F. and S.B. Adeloju, *Galvanostatic Entrapment of Penicillinase into Polytyramine Films and its Utilization for the Potentiometric Determination of Penicillin*. Sensors, 2010. **10**(4): p. 2851.
132. Thavarungkul, P., et al., *Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **23**(5): p. 688-694.
133. Chullasat, K., et al., *Ultra trace analysis of small molecule by label-free impedimetric immunosensor using multilayer modified electrode*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(11): p. 4571-4578.
134. Wu, X., et al., *Paper supported immunosensor for detection of antibiotics*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **33**(1): p. 309-312.
135. Daprà, J., et al., *Comparative study on aptamers as recognition elements for antibiotics in a label-free all-polymer biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **43**: p. 315-320.
136. Lin, H. and R.H. Datar, *Medical applications of nanotechnology*
- Review Series: Bench to Bedside 27 2006. **19**(1).
137. Janshoff, A., H.J. Galla, and C. Seinem, *Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - an alternative to optical biosensors?* Angewandte Chemie - International Edition, 2000. **39**(22): p. 4004-4032.
138. Skládal, P., *Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2003. **14**: p. 491-502.
139. Adanyi, N., et al., *Development of new immunosensors for determination of contaminants in food*. Current Applied Physics Engineering Aspects of Nanomaterials and Technologies, 2006. **6**(2): p. 279-286.
140. Karaseva, N.A. and T.N. Ermolaeva, *A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food*. Talanta, 2012. **93**(0): p. 44-48.
141. Ebarvia, B.S., I.E. Ubando, and F.B. Sevilla Iii, *Biomimetic piezoelectric quartz crystal sensor with chloramphenicol-imprinted polymer sensing layer*. Talanta, 2015. **144**: p. 1260-1265.
142. Gruhl, F.J. and K. Länge, *Surface Acoustic Wave (SAW) Biosensor for Rapid and Label-Free Detection of Penicillin G in Milk*. Food Analytical Methods, 2014. **7**(2): p. 430-437.

143. Ktari, N., et al., *Surface Acoustic Wave Sensor for Selective Detection of Flumequine*. Procedia Engineering, 2015. **120**: p. 998-1002.
144. Hou, H., et al., *Aptamer-Based Cantilever Array Sensors for Oxytetracycline Detection*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(4): p. 2010-2014.
145. Bai, X., et al., *Label-free detection of kanamycin using aptamer-based cantilever array sensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **56**(0): p. 112-116.
146. Xu, S. and R. Mutharasan, *Cantilever biosensors in drug discovery*. Expert Opinion on Drug Discovery, 2009. **4**(12): p. 1237-1251.
147. Bai, X., et al., *Reversible detection of vancomycin using peptide-functionalized cantilever array sensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **62**(0): p. 145-150.
148. Sang, S., W. Zhang, and Y. Zhao, *Review on the Design Art of Biosensors*, in *State of the Art in Biosensors - General Aspects*, T. Rincken, Editor. 2013, InTech. p. 89-110.
149. Chu, X., et al., *Detection of broad-spectrum aminoglycoside antibiotics through fluorescence-labeling aminoglycoside acetyltransferase(6')-li*. Analytical Biochemistry, 2008. **376**: p. 144-150.
150. Shen, J., et al., *A monoclonal antibody-based time-resolved fluoroimmunoassay for chloramphenicol in shrimp and chicken muscle*. Analytica Chimica Acta, 2006. **575**: p. 262-266.
151. Hagren, V., et al., *Rapid time-resolved fluoroimmunoassay for the screening of monensin residues in eggs*. Analytica Chimica Acta - Papers presented at the 2nd International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules, 2006. **557**(1-2): p. 164-168.
152. Bacigalupo, M.A., et al., *Time-resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of ampicillin in cow milk samples with different fat contents*. Talanta, 2008. **77**(1): p. 126-130.
153. Cháfer-Pericás, C., et al., *Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS*. Food Control, 2011. **22**: p. 993-999.
154. Zhang, Z., et al., *Time-Resolved Fluoroimmunoassay as an Advantageous Analytical Method for Assessing the Total Concentration and Environmental Risk of Fluoroquinolones in Surface Waters*. Environmental Science & Technology, 2013. **47**(1): p. 454-462.
155. Zhou, B., et al., *A new sensitive method for the detection of chloramphenicol in food using time-resolved fluoroimmunoassay*. European Food Research and Technology, 2014. **240**(3): p. 619-625.
156. Le, T., H. Yu, and X. Niu, *Detecting quinoxaline-2-carboxylic acid in animal tissues by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and time-resolved fluoroimmunoassay*. Food Chemistry, 2015. **175**: p. 85-91.
157. Chen, A., et al., *Development of an Antibody Hapten-Chip System for Detecting the Residues of Multiple Antibiotic Drugs*. Journal of Forensic Sciences, 2009. **54**(4): p. 953-960.
158. Suárez-Pantaleón, C., et al., *Multi-residue flow cytometry based-immunoassay for the simultaneous scerening of antibiotics, aflatoxin M1 and melamine in food commodities*, in *Seventh International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis*. 2-5 June, 2014: De Bijloke Ghent, Belgium.
159. de Keizer, W., et al., *Flow cytometric immunoassay for sulfonamides in raw milk*. Analytica Chimica Acta, 2008. **620**(1-2): p. 142-149.
160. Liu, N., et al., *Simultaneous and rapid detection of multiple pesticide and veterinary drug residues by suspension array technology*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **41**(0): p. 710-716.
161. Fernández, F., et al., *Portable Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in Milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(9): p. 5036-5043.
162. Gaudin, V., J. Fontaine, and P. Maris, *Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance*. Analytica Chimica Acta, 2001. **436**: p. 191-198.

163. Gaudin, V., C. Hédou, and P. Sanders, *Validation of a Biacore Method for Screening Eight Sulfonamides in Milk and Porcine Muscle Tissues According to European Decision 2002/657/EC*. Journal of AOAC International, 2007. **90**(6): p. 1706-1715.
164. McCarney, B., et al., *Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues*. Analytica Chimica Acta - 4th International Symposium on Hormone and Veterinary Residue Analysis., 2003. **483**(1-2): p. 165-169.
165. Crooks, S.R.H., et al., *Detection of levamisole residues in bovine liver and milk by immunobiosensor*. Analytica Chimica Acta - 4th International Symposium on Hormone and Veterinary Residue Analysis., 2003. **483**(1-2): p. 181-186.
166. Huet, A.-C., et al., *Validation of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for screening (fluoro)quinolones in egg, fish and poultry*. Food Additives and Contaminants, 2009. **26**(10): p. 1341-1347.
167. Dumont, V., et al., *A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps*. Analytica Chimica Acta, 2006. **567**(2): p. 179-183.
168. Baxter, G.A., et al., *Detection of Streptomycin Residues in Whole Milk Using an Optical Immunobiosensor*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(7): p. 3204-3207.
169. Caldwell, M., et al., *Development and Validation of an Optical SPR Biosensor Assay for Tylosin Residues in Honey*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(19): p. 7367-7370.
170. Fernández, F., et al., *A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **26**(4): p. 1231-1238.
171. Cooper, M.A., *Optical biosensors in drug discovery*. Nature Reviews Drug Discovery, 2002. **1**(7): p. 515-528.
172. Rebe Raz, S., et al., *Development of a biosensor microarray towards food screening, using imaging surface plasmon resonance*. Biosensors and Bioelectronics, 2008. **24**(4): p. 552-557.
173. Rebe Raz, S., et al., *Label-Free and Multiplex Detection of Antibiotic Residues in Milk Using Imaging Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(18): p. 7743-7749.
174. Krishnamoorthy, G., A. van den Berg, and R.B.M. Schasfoort, *Surface plasmon resonance imaging based multiplex biosensor: Integration of biomolecular screening, detection and kinetics estimation*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010. **148**(2): p. 511-521.
175. Borisenko, V., et al., *Diffraction Optics Technology: A Novel Detection Technology for Immunoassays*. Clinical Chemistry, 2006. **52**(11): p. 2168-2170.
176. Jean-Francois, H., *A Novel Approach to Label-Free Sensing: Diffraction Optics Technology* (*dot#174;*). Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2009. **12**(8): p. 801-811.
177. Roda, A. and M. Guardigli, *Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(1): p. 69-76.
178. Zhao, L., L. Sun, and X. Chu, *Chemiluminescence immunoassay*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009. **28**(4): p. 404-415.
179. Guo, Z. and P. Gai, *Development of an ultrasensitive electrochemiluminescence inhibition method for the determination of tetracyclines*. Analytica Chimica Acta, 2011. **688**(2): p. 197-202.
180. Thongchai, W., et al., *A microflow chemiluminescence system for determination of chloramphenicol in honey with preconcentration using a molecularly imprinted polymer*. Talanta, 2010. **82**(2): p. 560-566.
181. Knecht, B.G., et al., *Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(3): p. 646-654.
182. Yu, X., et al., *A competitive immunoassay for sensitive detection of small molecules chloramphenicol based on luminol functionalized silver nanoprobe*. Analytica Chimica Acta, 2014. **812**(0): p. 236-242.

183. Kloth, K., et al., *A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk* Analyst, 2009. **134**(7): p. 1433-1439.
184. Wutz, K., R. Niessner, and M. Seidel, *Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays*. Microchimica Acta, 2011. **173**(1-2): p. 1-9.
185. O'Mahony, J., et al., *Design and implementation of an imprinted material for the extraction of the endocrine disruptor bisphenol A from milk*. Journal of Chromatography B, 2013. **931**(0): p. 164-169.
186. Gaudin, V., et al., *Evaluation and validation of a biochip multi-array technology for the screening of 14 sulphonamide and trimethoprim residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for veterinary medicines*. Food and Agricultural Immunology, 2014. **26**(4): p. 477-495.
187. Gaudin, V., et al., *Evaluation and validation of biochip multi-array technology for the screening of six families of antibiotics in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2014. **31**(10): p. 1699-1711.
188. O'Mahony, J., et al., *Simultaneous detection of four nitrofurantol metabolites in honey using a multiplexing biochip screening assay*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(10): p. 4076-4081.
189. Valtonen, S.J., J.S. Kurittu, and M.T. Karp, *A luminescent Escherichia coli biosensor for the high throughput detection of beta-lactams*. Journal of Biomolecular Screening, 2002. **7**(2): p. 127-134.
190. Rebe Raz, S. and W. Haasnoot, *Multiplex bioanalytical methods for food and environmental monitoring*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(9): p. 1526-1537.
191. Marquette, C.A., B.P. Corgier, and L.J. Blum, *Recent advances in multiplex immunoassays*. Bioanalysis, 2012. **4**(8): p. 927-36.
192. Rank, M., B. Danielsson, and J. Gram, *Implementation of a thermal biosensor in a process environment: on-line monitoring of penicillin V in production-scale fermentations*. Biosensors and Bioelectronics, 1992. **7**(9): p. 631-635.
193. Ramanathan, K. and B. Danielsson, *Principles and applications of thermal biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2001. **16**(6): p. 417-423.
194. Reverté, L., B. Prieto-Simón, and M. Campàs, *New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review*. Analytica Chimica Acta, 2016. **908**: p. 8-21.
195. McGrath, T.F., C.T. Elliott, and T.L. Fodey, *Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **403**(1): p. 75-92.
196. Derkus, B., *Applying the miniaturization technologies for biosensor design*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **79**: p. 901-913.
197. Kehl, F., et al., *Introduction of an angle interrogated, MEMS-based, optical waveguide grating system for label-free biosensing*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016. **226**: p. 135-143.
198. Lulec, S.Z., et al., *MEMS cantilever sensor array oscillators: Theory and experiments*. Sensors and Actuators A: Physical, 2016. **237**: p. 147-154.
199. Smith, E.J., et al., *Lab-in-a-tube: ultracompact components for on-chip capture and detection of individual micro-/nanoorganisms*. Lab on a Chip, 2012. **12**(11): p. 1917-1931.
200. Kovarik, M.L., et al., *Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications in the Laboratory, Clinic, and Field*. Analytical chemistry, 2013. **85**(2): p. 451-472.
201. Yuan, J., et al., *Surface Plasmon Resonance Assay for Chloramphenicol*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(21): p. 8329-8333.
202. Fernández, F., F. Sánchez-Baeza, and M.P. Marco, *Nanogold probe enhanced Surface Plasmon Resonance immunosensor for improved detection of antibiotic residues*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **34**(1): p. 151-158.

203. Kim, S., J. Ko, and H.B. Lim, *Application of magnetic and core-shell nanoparticles to determine enrofloxacin and its metabolite using laser induced fluorescence microscope*. *Analytica Chimica Acta*, 2013. **771**(0): p. 37-41.
204. Emrani, A.S., et al., *Colorimetric and fluorescence quenching aptasensors for detection of streptomycin in blood serum and milk based on double-stranded DNA and gold nanoparticles*. *Food Chemistry*, 2016. **190**: p. 115-121.
205. Cháfer-Pericás, C., et al., *Dispersive solid-phase extraction and immunoassay with internal reference calibration using fatty acid-coated inorganic fluorescent nanoparticles*. *Analytical Biochemistry*, 2013. **432**(1): p. 31-37.
206. Bougrini, M., et al., *Development of a novel sensitive molecularly imprinted polymer sensor based on electropolymerization of a microporous-metal-organic framework for tetracycline detection in honey*. *Food Control*, 2016. **59**: p. 424-429.
207. Zhu, Y., et al., *Simple, rapid and sensitive detection of antibiotics based on the side-by-side assembly of gold nanorod probes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(11): p. 4387-4392.
208. Ibupoto, Z.H., et al., *ZnO Nanorods Based Enzymatic Biosensor for Selective Determination of Penicillin*. *Biosensors*, 2011. **1**(4): p. 153.
209. Zang, S., et al., *A dual amplified electrochemical immunosensor for ofloxacin: Polypyrrole film-Au nanocluster as the matrix and multi-enzyme-antibody functionalized gold nanorod as the label*. *Electrochimica Acta*, 2013. **90**(0): p. 246-253.
210. Noor, M.O. and U.J. Krull, *Silicon nanowires as field-effect transducers for biosensor development: A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2014. **825**: p. 1-25.
211. Miao, Y., et al., *An ultrasensitive fluorescence aptasensor for chloramphenicol based on FRET between quantum dots as donor and the magnetic SiO₂@Au NPs probe as acceptor with exonuclease-assisted target recycling*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016. **222**: p. 1066-1072.
212. Taranova, N.A., et al., *'Traffic light' immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. **63**: p. 255-261.
213. Taokaenchan, N., et al., *Enhanced electrogenerated chemiluminescence of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) system by l-cysteine-capped CdTe quantum dots and its application for the determination of nitrofurantoin antibiotics*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. **66**: p. 231-237.
214. Jiang, W., et al., *Development of a multiplex flow-through immunoaffinity chromatography test for the on-site screening of 14 sulfonamide and 13 quinolone residues in milk*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. **66**(0): p. 124-128.
215. Le, T., L. Zhu, and H. Yu, *Dual-label quantum dot-based immunoassay for simultaneous determination of Carbadox and Olaquinox metabolites in animal tissues*. *Food Chemistry*, 2016. **199**: p. 70-74.
216. Esteve-Turrillas, F.A. and A. Abad-Fuentes, *Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **41**(0): p. 12-29.
217. Liu, Y., et al., *A label-free photoelectrochemical aptasensor based on nitrogen-doped graphene quantum dots for chloramphenicol determination*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. **74**: p. 1016-1021.
218. Feng, X., et al., *A novel "dual-potential" electrochemiluminescence aptasensor array using CdS quantum dots and luminol-gold nanoparticles as labels for simultaneous detection of malachite green and chloramphenicol*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. **74**: p. 587-593.
219. Wang, Z., et al., *Carbon nanomaterials-based electrochemical aptasensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. **79**: p. 136-149.
220. Guo, W., et al., *A novel electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of kanamycin based on MWCNTs-HMIMPF₆ and nanoporous PtTi alloy*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. **74**: p. 691-697.

221. Xu, Y., et al., *Fast determination of sulfonamides from egg samples using magnetic multiwalled carbon nanotubes as adsorbents followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Food Chemistry, 2013. **140**(1–2): p. 83-90.
222. Cesarino, I., V. Cesarino, and M.R.V. Lanza, *Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. **188**: p. 1293-1299.
223. Zhou, L., et al., *Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012. **162**(1): p. 201-208.
224. He, Z., et al., *A multi-walled carbon nanotubes-poly(L-lysine) modified enantioselective immunosensor for ofloxacin by using multi-enzyme-labeled gold nanoflower as signal enhancer*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **73**: p. 85-92.
225. Yang, Y., et al., *Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer film via sol–gel technology and multi-walled carbon nanotubes-chitosan functional layer for sensitive determination of quinoxaline-2-carboxylic acid*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **47**: p. 475-481.
226. Zhang, Y., P. Zuo, and B.-C. Ye, *A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **68**(0): p. 14-19.
227. Pumera, M., *Graphene in biosensing*. Materials Today, 2011. **14**(7–8): p. 308-315.
228. Wu, Y., et al., *A low detection limit penicillin biosensor based on single graphene nanosheets preadsorbed with hematein/ionic liquids/penicillinase*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **39**(0): p. 92-99.
229. Wei, Q., et al., *Ultrasensitive detection of kanamycin in animal derived foods by label-free electrochemical immunosensor*. Food Chemistry, 2012. **134**(3): p. 1601-1606.
230. Yan, Z., et al., *A “signal-on” aptasensor for simultaneous detection of chloramphenicol and polychlorinated biphenyls using multi-metal ions encoded nanospherical brushes as tracers*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **74**: p. 718-724.
231. Miao, Y.-B., et al., *Switch-on fluorescence scheme for antibiotics based on a magnetic composite probe with aptamer and hemin/G-quadruplex coimmobilized nano-Pt–luminol as signal tracer*. Talanta, 2016. **147**: p. 296-301.
232. Liu, B., et al., *Au(III)-promoted magnetic molecularly imprinted polymer nanospheres for electrochemical determination of streptomycin residues in food*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **41**(0): p. 551-556.
233. Krone, J.R., *BIA/MS: interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 1997. **244**: p. 124-132.
234. Sonksen, C.P., et al., *Combining MALDI Mass Spectrometry and Biomolecular Interaction Analysis using a BIA instrument*. Analytical Chemistry, 1998. **70**: p. 2731-2736.
235. Nedelkov, D., A. Rasooly, and R.W. Nelson, *Multitoxin biosensor–mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food*. International Journal of Food Microbiology, 2000. **60**(1): p. 1-13.
236. Morlock, G.E. and W. Schwack, *The contribution of planar chromatography to food analysis*. Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 2007. **20**(6): p. 399-406.
237. Choma, I.M. and E.M. Grzelak, *Bioautography detection in thin-layer chromatography*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(19): p. 2684-2691.
238. Jiang, T., et al., *Capillary Enzyme Immunoassay with Electrochemical Detection for the Determination of Atrazine in Water*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(4): p. 1098-1104.
239. Ding, Y., et al., *Post separation adjustment of pH to enable the analysis of aminoglycoside antibiotics by microchip electrophoresis with amperometric detection*. Electrophoresis, 2012. **33**(21): p. 3245-3253.

240. Chu, Q., et al., *Multi-residue analysis of sulfonamides in animal tissues by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009. **89**(14): p. 2498-2504.
241. Su, M., W. Wei, and S. Liu, *Analytical applications of the electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) coupled to capillary/microchip electrophoresis: A review*. Analytica Chimica Acta, 2011. **704**(1-2): p. 16-32.
242. Mastichiadis, C., et al., *Capillary-based immunoassays, immunosensors and DNA sensors - steps towards integration and multi-analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(9): p. 771-784.
243. Feinberg, M., *Labo-Stat: Guide de validation des méthodes d'analyse (retirage 2012)*, ed. E.T.E.D. Lavoisier. 2009.
244. *Anses : Guide de validation des méthodes d'analyses*. 2015.
245. *NF EN ISO CEI 17025 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*. 2005.
246. *NF V 03-110, Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude*. 2010. p. 1-57.
247. *XP V 03-111, Protocole d'évaluation intra-laboratoire d'une méthode alternative d'analyse qualitative par rapport à une méthode de référence*. 1995.
248. Caporal-Gautier, J., et al., *Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission*. STP Pharma Pratiques, 1992. **2**(4): p. 205-226.
249. Caporal-Gautier, J., et al., *Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission. II. Examples of application*. STP Pharma Pratiques, 1992. **2**(4): p. 227-239.
250. Hubert, P., et al., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures - A SFSTP proposal - part I*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **36**(3): p. 579-586.
251. Hubert, P., et al., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **45**(1): p. 70-81.
252. Hubert, P., et al., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—Part III*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **45**(1): p. 82-96.
253. Hubert, P., et al., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal: Part IV. Examples of application*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **48**(3): p. 760-771.
254. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd ed. 2014.
255. *NordVal/NMKL Protocol for the validation of alternative microbiological methods*. 2009.
256. CRL, *Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer)*. 2010: Available from: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm>: Guideline_Validation_Screening_en.pdf. p. 1-18.
257. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. DRAFT GUIDANCE*. 2013: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).
258. Thompson, M., S.L.R. Ellison, and R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 2002. **74**(5): p. 835-855.
259. *ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 1996.
260. *VICH Guidance for Industry - Validation of Analytical Procedures: Methodology*. 1999.
261. *ISO 13969 (IDF 183) Lait et produits laitiers - Lignes directrices pour une description normalisée des méthodes microbiologiques de dépistage d'inhibiteurs microbiens*. 2003.

262. ISO 18330 (IDF 188) *Laits et produits laitiers -- Lignes directrices pour la description normalisée des essais immunologiques et des essais récepteur pour la détection des résidus antimicrobiens*. 2003.
263. NF EN ISO 16140 *Microbiologie des aliments – Protocole pour la validation des méthodes alternatives*. Octobre 2003.
264. NF EN ISO 16140/A1 *Microbiologie des aliments – Protocole pour la validation des méthodes alternatives – Amendement 1*. Octobre 2011.
265. NF EN FDIS 16140-1 *Microbiologie des aliments – Validation de méthodes – Partie 1 : vocabulaire*. 2015.
266. NF EN FDIS 16140-2 *Microbiologie des aliments – Validation de méthodes – Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence*. 2015.
267. AFNOR, *Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse – Application à la détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires - Exigences relatives aux études préliminaire et collaborative menées par un laboratoire expert*. 2005. p. 1-13.
268. Hubert, P.H., J.J. Nguyen-Huu, and B. Boulanger, *Validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches*. STP Pharma Pratiques, 2003. **13 N° 3**: p. 101-138.
269. Wilrich, C. and P.T. Wilrich, *Estimation of the pod function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method*. Journal of AOAC International, 2009. **92(6)**: p. 1763-1772.
270. Wehling, P., et al., *Probability of Detection (POD) as a statistical model for the validation of qualitative methods*. Journal of AOAC International, 2011. **94(1)**: p. 335-347.
271. Feinberg, M., *Validation of analytical methods based on accuracy profiles*. Journal of Chromatography A, 2007. **1158(1-2)**: p. 174-183.
272. Bourdat-Deschamps, M., *Validation de l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux de pluie par la méthode du profil d'exactitude*. Le Cahier des Techniques de l'Inra, 2010: p. 85-98.
273. Satterthwaite, F.E., *An approximate distribution of estimates of variance components*. Biometrics, 1946. **2(6)**: p. 110-114.
274. Mompelat, S., et al., *Validation of a liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix*. Journal of Chromatography A, 2015. **1407**: p. 119-129.
275. Chéneau, E., et al., *Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach*. Journal of Chromatography B, 2007. **850(1-2)**: p. 15-23.
276. Saint-Cyr, M.J., et al., *Use of accuracy profile procedure to validate a real-time PCR method to quantify bacteria in feces*. Journal of AOAC International, 2014. **97(2)**: p. 573-579.
277. Feinberg, M., D. Sohier, and J.-F. David, *Validation of an Alternative Method for Counting Enterobacteriaceae in Foods Based on Accuracy Profile*. Journal of AOAC International, 2009. **92(2)**: p. 527-537.
278. Laurentie, M. and V. Gaudin, *Use of the total error approach to evaluate the performance of a semi-quantitative immunological method (BIACORE method) for detecting sulfamethazine in bovine milk*. Journal of Chromatography B - Method validation, comparison and transfer, 2009. **877(23)**: p. 2375-2379.
279. AOAC INTERNATIONAL *Guidelines for Validation of Qualitative Binary Chemistry Methods*. Journal of AOAC International, 2014. **97(5)**: p. 1492-1495.
280. Siglez, M.A., et al., *GlutenTox® Pro Test for the Detection of Gluten in Select Foods and Surfaces*. Journal of AOAC International, 2015. **98(6)**: p. 1608-1627.

281. Feinberg, M., et al., *New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **380**(3): p. 502-514.
282. Cloke, J., et al., *Method Modification of the Thermo Scientific SureTect Listeria monocytogenes Assay for Raw Meat, Dairy, Produce, and Seafood*. Journal of AOAC International, 2015. **98**(5): p. 1315-1324.
283. Uhlig, S., L. Niewöhner, and P. Gowik, *Can the usual validation standard series for quantitative methods, ISO 5725, be also applied for qualitative methods?* Accreditation and Quality Assurance, 2011. **16**(11): p. 533-537.
284. Johnson, R., et al., *Comparative Evaluation of the VIDAS® Listeria monocytogenes Xpress (LMX) for the Detection of Listeria monocytogenes in a Variety of Foods*. Journal of AOAC International, 2013. **96**(2): p. 229-241.
285. Wallace, F.M., *DuPont BAX® System PCR Assay for Genus Listeria 24E*. Journal of AOAC International, 2013. **96**(3): p. 524-531.
286. Salter, R.S., et al., *Validation of the Charm 3 SL3 β -lactam test for screening raw milk in compliance with the U.S. pasteurized milk ordinance*. Journal of AOAC International, 2011. **94**(1): p. 348-357.
287. Salter, R.S., D. Conaway, and R. Markovsky, *Validation of the SL3 β -Lactam Test for Screening Milk in Compliance with U.S. Pasteurized Milk Ordinance: Performance-Tested Method SM 040701*. Journal of AOAC International, 2008. **91**(3): p. 675-683.
288. Abouzied, M., et al., *Validation Study of the BetaStar® Plus Lateral Flow Assay for Detection of Beta-Lactam Antibiotics in Milk*. Journal of AOAC International, 2012. **95**(4): p. 1211-1221.
289. Abouzied, M., et al., *Validation Study of a Receptor-Based Lateral Flow Assay for Detection of Beta-Lactam Antibiotics in Milk Performance-Tested Method SM 030802*. Journal of AOAC International, 2009. **92**(3): p. 959-974.
290. *Décision 93/256/CEE de la Commission, du 14 avril 1993, arrêtant les méthodes à utiliser pour la recherche de résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyrostatique 1993*: Journal officiel de la Commission Européenne. p. 0064 - 0074
291. *ISO 11843 Capacité de détection — Partie 1: Termes et définitions, Partie 2: Méthodologie de l'étalonnage linéaire*. 1997
292. *Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC*. SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008.
293. Thompson, M., *Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing*. Analyst, 2000. **125**: p. 385-386.
294. Montgomery, D.C., in *Introduction to Statistical Quality Control*, I. 6th Ed. John Wiley & Sons, Editor. 2009: New York, NY.
295. A, D.R., *Method Validation Study Report. AOAC Performance Tested Methods 2006-02-23. Method / Kit Title: Premi®Test*. 2006.
296. Waldron, T.T., *IDEXX SNAP beta-lactam ST validation for penicillin G detection*. J AOAC Int, 2013. **96**(6): p. 1343-9.
297. Paul, V., K. Steinke, and H.H.D. Meyer, *Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay for surveillance of Cry1Ab toxin in bovine blood plasma of cows fed Bt-maize (MON810)*. Analytica Chimica Acta, 2008. **607**(1): p. 106-113.
298. Johansson, M.A., K.E. Hellenas, and 2004, *Immunobiosensor determination of beta-agonists in urine using integrated immunofiltration clean-up*. International Journal of Food Science and Technology, 2004. **39**(8): p. 891-898.
299. *ISO 11843 Capacité de détection - Partie 5: Méthodologie des étalonnages linéaire et non linéaire*. 2008
300. Galarini, R., et al., *Development, validation and data quality assurance of screening methods: A case study*. Analytica Chimica Acta, 2011. **700**(1-2): p. 2-10.
301. *SANCO/12571/ 19 November 2013 - Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2013, .

302. Bilandžić, N., et al., *Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia*. Food control, 2011. **22**(12): p. 1941-1948.
303. Wang, Z., et al., *Monoclonal Antibody-Based Fluorescence Polarization Immunoassay for Sulfamethoxyipyridazine and Sulfachloropyridazine*. J. Agric. Food Chem., 2007. **55**(17): p. 6871-6878.
304. Zhang, H., Y. Zhang, and S. Wang, *Development of flow-through and dip-stick immunoassays for screening of sulfonamide residues*. Journal of Immunological Methods, 2008. **337**(1): p. 1-6.
305. Sigel, C.W., J.L. Woolley Jr, and C.A. Nichol, *Specific TLC tissue residue determination of sulfadiazine following fluorecamine derivatization*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1975. **64**(6): p. 973-976.
306. Arroyo-Manzanares, N., L. Gámiz-Gracia, and A.M. García-Campaña, *Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection*. Food Chemistry, 2014. **143**: p. 459-464.
307. Nebot, C., et al., *Rapid method for quantification of nine sulfonamides in bovine milk using HPLC/MS/MS and without using SPE*. Food Chemistry, 2013. **141**(3): p. 2294-2299.
308. Karlsson, R., *Real time competitive analysis of interactions between low molecular weight ligands in solution and surface immobilized receptors*. Analytical Biochemistry, 1994. **221**: p. 142-151.
309. Jonsson, U. and M. Malmqvist, *Real time biospecific interaction analysis. The integration of surface plasmon resonance detection, general biospecific interface chemistry and microfluidics into one analytical system*. Advances in biosensor, 1992. **2**: p. 291-336.
310. Mellgren, C., A. Sternesjo, and L. Bjorck, *Simultaneous determination of sulphamethazine and enrofloxacin in milk using an immunosensor assay*. International dairy federation. Special issue, 1995. **9505**: p. 262-263.
311. Mellgren, C., et al., *Optical immunobiosensor assay for determining enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk*. Journal of AOAC international (the), 1998. **81**(2): p. 394-397.
312. Bergstrom, C., et al., *Design and use of a general capturing surface in optical biosensor analysis of sulfamethazine in milk*. Food and Agricultural Immunology, 1999. **11**(4): p. 329-338.
313. *European Commission decision laying down the methods to be used for detecting residues of substances having a hormonal or a thyrostatic action*. 1993: Off J Eur Comm. p. 64-74.
314. Burkin, M.A. and I.A. Galvidis, *Development of a Competitive Indirect ELISA for the Determination of Lincomycin in Milk, Eggs, and Honey*. J. Agric. Food Chem., 2010. **58**(18): p. 9893-9898.
315. Cliquet, P., et al., *Penicillin-specific antibodies: Monoclonals versus polyclonals in ELISA and in an optical biosensor*. Food and Agricultural Immunology, 2005. **16**(2): p. 101-115.
316. Fodey, T., et al., *Characterisation of antibodies to chloramphenicol, produced in different species by enzyme-linked immunosorbent assay and biosensor technologies*. Analytica Chimica Acta, 2007. **592**(1): p. 51-57.
317. Gaudin, V. and P. Maris, *Development of a biosensor based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk*. Food and Agricultural Immunology, 2001. **13**: p. 77-86.
318. Rozet, E., et al., *Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation: Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts*. Analytica Chimica Acta, 2007. **591**(2): p. 239-247.
319. Huet, A.-C., et al., *Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: development of an ELISA*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2005. **22**(2): p. 128 - 134.
320. CRL, *CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. Community Reference Laboratories (CRLs) for residues according to Council Directive 96/23/EC*. Guidance paper of 7th December 2007. p. 1-8.

321. Gaudin, V., et al., *Evaluation and validation of two microbiological tests for the screening of antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013. **30**(2): p. 234-243.
322. Clark, C.M. and N.T. Crosby, *Analysis of veterinary residues in foods*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1986. **5**(5): p. 118-120.
323. Roda, A., et al., *Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **76**: p. 164-179.
324. Das, P., et al., *Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **79**: p. 386-397.
325. Zangheri, M., et al., *A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **64**: p. 63-68.
326. Vashist, S.K., et al., *A smartphone-based colorimetric reader for bioanalytical applications using the screen-based bottom illumination provided by gadgets*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **67**: p. 248-255.
327. Giavazzi, F., et al., *A fast and simple label-free immunoassay based on a smartphone*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **58**: p. 395-402.
328. Cho, S., et al., *Smartphone-based, sensitive μ PAD detection of urinary tract infection and gonorrhoea*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **74**: p. 601-611.
329. Lopes, R.P., et al., *Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2011. **28**(12): p. 1667-1676.
330. *Document N° SANCO/12495/2011 - Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2012. p. 1-41.
331. Bouabidi, A., et al., *Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(19): p. 3180-3192.
332. *Règlement (CE) no882/2004 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*. 2004.
333. Uhlig, S. and P. Gowik, *Factorial interlaboratory tests for microbiological measurement methods*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2009. **5**(1): p. 35-46.