

Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments

RÉFÉRENCE : ANSES/LMV/16/02 version 5

Septembre 2021

Méthode de détection de résidus d'antibiotiques dans le muscle et dans le lait par CL-SM/SM

Laboratoire de Fougères

**Laboratoire national de référence Résidus
de médicaments vétérinaires et colorants
dans les denrées alimentaires d'origine
animale et aliments pour animaux**

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
0	-	Février 2016	Version initiale soumise à consultation
1	Mineures	Juin 2016	Modification suite consultation et atelier de formation des 20 et 21 avril 2016 à Anses Fougères.
2	Mineures	Septembre 2016	Modification du tableau de l'annexe 4
3	Mineures	Avril 2018	Modification du tableau de l'annexe 4 Retrait du Desfuroylceftiofur et du Tulathromycine marqueur
4	Mineures	Juin 2019	Rectification des tableaux tronqués (annexes 4 et 5) Modification de la concentration cible de Tulathromycine dans les annexes 2 et 4
5	Majeures	Septembre 2021	Extension de la méthode à la matrice lait

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de FOUGERES

Laboratoire National de Référence « Résidus Médicaments Vétérinaires »

Adresse : 10B rue Claude Bourgelat – Javené

CS 40608

35306 FOUGERES Cedex

Contacts : LNR-RMV-FOUGERES@anses.fr

BESSIRAL Méline

GAUTIER Sophie

PESEL Dominique

VERDON Eric

La présente méthode a été optimisée, caractérisée et validée par l'unité Analyse des Résidus et Contaminants du laboratoire de Fougères

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1 Objet et domaine d'application	8
2 Documents de référence	14
3 Termes, sigles et définitions	14
4 Principe de la méthode	15
5 Réactifs	15
5.1 Eau	15
5.2 Gaz	15
5.3 Réactifs	15
5.4 Solutions	16
5.5 Substances standards et préparation des solutions mères	16
6 Appareillage et matériels	23
6.1 Matériel de Laboratoire	23
6.2 Matériel de chromatographie	24
6.3 Spectrométrie de masse	24
7 Échantillons	24
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	24
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	24
8 Mode opératoire	25
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	25
8.2 Préparation des échantillons supplémentés de contrôle et du témoin	25
8.3 Extraction	26
8.4 Analyse et détection par CL-SM/SM	27
9 Résultats	33
9.1 Contrôle de la validité des résultats	33
9.2 Calculs et expression des résultats	33
10 Caractéristiques de performance de la méthode	34
10.1 Conclusion pour le muscle d'animaux de boucherie et volailles	34
10.2 Conclusion pour les produits d'aquaculture	35
10.3 Conclusion pour le lait	36

Annexe 1a : préparation de la solution de supplémentation SS-GRA-muscle	37
Annexe 1b : préparation de la solution de supplémentation SS-GRB-muscle	38
Annexe 2a : préparation de la solution de supplémentation SS-GRA-lait	39
Annexe 2b : préparation de la solution de supplémentation SS-GRB-lait	40
Annexe 3 : Mentions de danger	41
Annexe 4 « Muscle » : Feuille de décision d'envoi en confirmation pour la matrice muscle et produits d'aquaculture	45
Annexe 4 « Lait » : Feuille de décision d'envoi en confirmation pour la matrice lait	47
Annexe 5 a : performances de la méthode pour le muscle d'animaux de boucherie	48
Annexe 5 b : performances de la méthode pour le muscle de produits d'aquaculture	50
Annexe 5 c : performances de la méthode pour le lait.....	52
11 Bibliographie	54

Introduction

La méthode a pour objet la détection et l'identification de molécules appartenant à différentes familles d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, tétracyclines, macrolides, lincosamides, quinolones, sulfamides, phénicolés, pleuromutilines, polypeptides, rifamycines, dérivés diaminopyrimidiques, divers), dans le muscle d'animaux de boucherie (porcin, bovins...), de volailles, des produits d'aquaculture et dans le lait. La grande majorité des antibiotiques incluse dans ce protocole est classée dans le tableau I (substances autorisées) du règlement de la Commission (EU) N° 37/2010 du 22/12/2009. Les Limites Maximales en Résidus établies dans la matrice muscle et dans la matrice lait sont données dans le §1 (Objet et domaine d'application). Les performances de la méthode ont été estimées lors des études de validation dans le muscle et dans le lait et sont indiquées en annexe 5a, 5b et 5c.

Une extraction unique à l'acétonitrile permet d'extraire l'ensemble des molécules. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par électrospray en mode positif avec l'option MRM scheduled® (ou mode MRM segmenté) est utilisée pour la détection.

L'identification est basée sur la recherche de deux transitions par molécule au temps de rétention correspondant à l'analyte (sauf pour quelques molécules pour lesquelles la sensibilité ne permet pas de détecter les deux transitions au niveau de concentration visé mais dans ce cas le dépistage identifié de la molécule reste complètement valide).

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Cette méthode implique la connaissance par l'opérateur des règles usuelles de manipulation des produits chimiques et des solvants. Elle devra être, autant que possible, mise en œuvre sous hotte ventilée. Toutes les précautions nécessaires devront être prises lors de la manipulation des standards (pesées sous hotte, port de gants...). Il est important de bien vérifier les risques associés à chaque produit avant de les utiliser, en particulier pour les substances standards (mentions de danger en annexe 3).

1 Objet et domaine d'application

La méthode a pour objet la détection et l'identification de molécules appartenant à plusieurs familles d'antibiotiques dans le muscle, la chair des produits d'aquaculture et dans le lait. Les différentes catégories de denrées alimentaires d'origine animale sont présentées ci-dessous.

Domaine de la méthode :

Denrée : Muscle et Chair	
Catégories	Exemple d'espèces animales
Ruminants	Bovin, caprin, ovin, équin, ...
Porcins	Porcin, ...
Viandes blanches	Poulet, dinde, lapin, ...
Poissons gras	Saumon, truite, ...
Poissons maigres	Bar, turbot, daurade, ...
Crustacés	Crevette, crabe, homard, ...
Denrée : Lait	
Catégories	Exemple d'espèces animales
Lait	Vache, chèvre, brebis, ...

Les antibiotiques recherchés sont listés dans les tableaux ci-dessous. Ils ont été séparés en deux groupes, Groupe A et Groupe B pour faciliter la préparation et éviter certaines interactions pour quelques substances.

Groupe A - Muscle : 37 analytes

Analyte	LMR muscle animaux de boucherie (µg/kg)	LMR muscle poissons (µg/kg)	Concentration visée (µg/kg)
Amoxicilline	50	50 (muscle + peau)	50
Pénicilline G (Benzylpénicilline)	50	50 (muscle + peau)	50
Pénicilline V (Phénoxyéthylpénicilline)	25 (porc, vol)	Pas de LMR	25
Oxacilline	300	300 (muscle + peau)	300
Cloxacilline	300	300 (muscle + peau)	300
Nafcilline	300 (tous ruminants)	Pas de LMR	300
Dicloxacilline	300	300 (muscle + peau)	300
Céfapirine	50 ⁽³⁾ (bov)	Pas de LMR	50
Désacétylcéfapirine	50 ⁽³⁾ (bov)	Pas de LMR	50
Cefquinome	50 (bov, porc, equi)	Pas de LMR	50
Céfalonium	NA (bov)	Pas de LMR	50
Céfazoline	NA (bov, ov, cap)	Pas de LMR	50
Céfalexine	200 (bov)	Pas de LMR	200
Ceftiofur	1000 ⁽¹⁾ (tous mammif)	Pas de LMR	100
Céfopérazone	NA (bov)	Pas de LMR	50
Céfuroxime	Pas de LMR ⁽²⁾	Pas de LMR	50
Sulfaguandine	100	100 (muscle + peau)	100

Sulfadiazine	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfathiazole	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfadimérazine	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfaméthoxypyridazine	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfamonométhoxine	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfadoxine	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfaquinoxaline	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfadiméthoxine	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfanilamide	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfacétamide	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfaméthoxazole	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfamérazine	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfaméthizole	100	100 (muscle + peau)	100
Sulfachloropyridazine	100	100 (muscle + peau)	100
Dapsone	Interdit ⁽⁷⁾	Interdit	50
Sulfaclozine	100	100 (muscle + peau)	100
Oxytétracycline	100 ⁽³⁾	100 (muscle + peau) ⁽³⁾	100
Tétracycline	100 ⁽³⁾	100 (muscle + peau) ⁽³⁾	100
Chlortétracycline	100 ⁽³⁾	100 (muscle + peau) ⁽³⁾	100
Doxycycline	100	Pas de LMR	100

NA : Non Applicable

Groupe B - Muscle : 34 analytes

Analyte	LMR muscle animaux de boucherie (µg/kg)	LMR muscle poissons (µg/kg)	Concentration visée (µg/kg)
Ampicilline	50	50 (muscle + peau)	50
Lincomycine	100	100 (muscle + peau)	100
Marbofloxacin	150 (bov, porc)	Pas de LMR	150
Norfloxacine	Pas de LMR ⁽²⁾	Pas de LMR ⁽²⁾	100
Ciprofloxacine	100 ⁽³⁾	100 (muscle + peau) ⁽³⁾	50
Danofloxacine	100 ⁽⁴⁾	100 (muscle + peau) ⁽⁴⁾	100
Enrofloxacine	100 ⁽³⁾	100 (muscle + peau) ⁽³⁾	50
Sarafloxacine	30 (salmonidés) ⁽⁴⁾	30 (muscle + peau) (salmonidés)	30
Difloxacine	300 ⁽⁴⁾	300 ⁽⁴⁾	300
Acide Oxolinique	100	100 (muscle + peau)	100
Acide Nalidixique	Pas de LMR ⁽²⁾	Pas de LMR ⁽²⁾	50

Fluméquine	200 ⁽⁴⁾	600 (muscle + peau)	200
Florfénicol	100 (vol) ^{(3) (4)} 200 (bov, ov, cap) 300 (porc)	1000 (muscle + peau) ⁽³⁾	50
Florfénicol amine	100 ^{(3) (4)}	1000 (muscle + peau) ⁽³⁾	50
Thiamphénicol	50	50 (muscle + peau)	50
Tiamuline	100 ⁽⁵⁾	Pas de LMR	100
8 Hydroxymutiline	100 ⁽⁵⁾	Pas de LMR	100
Valnémuline	50 (porc)	Pas de LMR	50
Rifaximine	NA (tous mammif)	Pas de LMR	50
Trimethoprim	50 ⁽⁴⁾	50 (muscle + peau) ⁽⁴⁾	50
Baquiloprim	Pas de LMR muscle (bov, porc)	Pas de LMR	50
Novobiocine	NA (bov)	Pas de LMR	50
Tulathromycine	300 (bov) 800 (porc) ⁽⁶⁾ 450 (ov, cap)	Pas de LMR	50
Néospiramycine	200 ^{(3) (4)}	Pas de LMR	100
Spiramycine	200 (bov, poulets) ^{(3) (4)} 250 (porc)	Pas de LMR	100
Tilmicosine	50 (autres esp) ⁽⁴⁾ 75 (vol)	50 (muscle + peau) ⁽⁴⁾	50
Erythromycine	200	200 (muscle + peau)	200
Tylosine	100	100 (muscle + peau)	100
Tylvalosine	50 ⁽³⁾ (porc, vol)	Pas de LMR	25
0-acétyltylosine	50 ⁽³⁾ (porc, vol)	Pas de LMR	25
Josamycine	Pas de LMR ⁽²⁾	Pas de LMR ⁽²⁾	50
Tildipirosine	400 (bov, cap) ⁽⁴⁾ 1200 (porc)	Pas de LMR	400
Gamithromycine	Pas de LMR muscle (bov) 50 (autres ruminants) 100 (porc)	Pas de LMR	50
Pirlymicine	100 (bov)	Pas de LMR	100

NA : Non Applicable

Légende des tableaux et interprétation

- (1) La LMR est donnée pour la somme de tous les résidus conservant la structure beta-lactam exprimée en tant que Desfuroylceftiofur (sans objet pour le poisson).
- (2) Ces antibiotiques ne figurent pas dans le règlement 37/2010/CE, et ne sont pas destinés à un usage vétérinaire, donc n'ont pas de LMR
- (3) La LMR est donnée pour la somme des résidus de la molécule mère et de son métabolite ou de son épimère. Pour la Céphapirine et la Desacétylcéphapirine, la concentration visée est de 50 µg/kg alors que la LMR est fixée à 50 µg/kg pour la somme de ces deux molécules. La concentration visée aurait dû être de 25 µg/kg mais la sensibilité instrumentale était insuffisante. La concentration visée peut être abaissée selon les performances du système CL-SM/SM utilisé.
- (4) Lorsque les LMR dans le muscle sont différentes en fonction des espèces, la LMR muscle la plus basse est choisie.
- (5) La LMR est donnée pour l'ensemble des métabolites pouvant être hydrolysés en résidu marqueur
- (6) Des LMR ont été arrêtées le 18 décembre 2014 pour la Tulathromycine dans le muscle. La méthode a cependant été validée avant la fixation des LMRs muscle. De ce fait, elle a été validée à une concentration beaucoup plus basse que les LMRs. Les LMRs sont données pour le résidu marqueur. Rappel : en utilisant cette méthode sur des échantillons de terrain, le résidu marqueur ne sera sans doute pas détecté puisqu'une hydrolyse serait nécessaire. C'est pourquoi, lors du dépistage, il est important de rechercher la molécule mère à des concentrations très inférieures à la LMR.

- (7) Selon la sensibilité de l'instrument, il peut être envisagé d'avoir une concentration visée en Dapsone dans les QC inférieure à 50 µg/kg. C'est pourquoi un Signal/Bruit supérieur à 3 doit conduire à sa confirmation. Pour rappel, la dapsone fait partie des substances non autorisées en médecine vétérinaire avec une MMPR fixée à 5 µg/kg selon le « *EUROL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices* » paru en Septembre 2020 [8].

Groupe A - Lait : 39 analytes

Analyte	LMR lait (µg/kg)	Concentration visée (µg/kg)
Amoxicilline	4 (bov, ov, cap)	4
Pénicilline G (Benzylpénicilline)	4 (bov, ov, cap)	4
Pénicilline V (Phénoxyméthylpénicilline)	Pas de LMR lait	4
Oxacilline	30 (bov, ov, cap)	30
Cloxacilline	30 (bov, ov, cap)	30
Nafcilline	30 (bov, ov, cap)	30
Dicloxacilline	30 (bov, ov, cap)	30
Céfapirine	60 ⁽³⁾ (bov)	30
Désacétylcéfapirine (DAC)	60 ⁽³⁾ (bov)	30
Cefquinome	20 (bov)	20
Céfalonium	20 (bov)	20
Céfazoline	50 (bov, ov, cap)	50
Céfalexine	100 (bov)	100
Ceftiofur	100 ⁽¹⁾ (bov, ov, cap)	100
Desfuroylceftiofur disulfide (DCCD)	100 ⁽¹⁾ (bov, ov, cap)	100
Céfopérazone	50 (bov)	50
Céfacétrile	125 (bov)	125
Céfuroxime	/ ⁽²⁾	50
Sulfaguanidine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfadiazine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfathiazole	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfadimérazine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfaméthoxypyridazine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfamonométhoxine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfadoxine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfaquinoxaline	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfadiméthoxine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfanilamide	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfacétamide	100 (bov, ov, cap)	100

Sulfaméthoxazole	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfamérazine	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfaméthizole	100 (bov, ov, cap)	100
Sulfachloropyridazine	100 (bov, ov, cap)	100
Dapsone	Interdit ⁽⁶⁾	50
Sulfaclozine	100 (bov, ov, cap)	100
Oxytétracycline	100 (bov, ov, cap)	100
Tétracycline	100 (bov, ov, cap)	100
Chlortétracycline	100 (bov, ov, cap)	100
Doxycycline	Pas de LMR lait Usage interdit (*)	10

Groupe B - Lait : 34 analytes

Analyte	LMR lait (µg/kg)	Concentration visée (µg/kg)
Ampicilline	4 (bov, ov, cap)	4
Lincomycine	150 (bov, ov, cap)	150
Marbofloxacin	75 (bov)	75
Norfloxacine	/ ⁽²⁾	100
Ciprofloxacine	100 ⁽³⁾ (bov, ov, cap)	50
Danofloxacine	30 (bov, ov, cap)	30
Enrofloxacine	100 ⁽³⁾ (bov, ov, cap)	50
Sarafloxacine	Pas de LMR lait	100
Difloxacine	Pas de LMR lait Usage interdit (*)	30
Acide Oxolinique	Pas de LMR lait Usage interdit (*)	10
Acide Nalidixique	/ ⁽²⁾	100
Fluméquine	50 (bov, ov, cap)	50
Florfenicol	Pas de LMR lait Usage interdit (*)	50
Florfenicol amine	Pas de LMR lait Usage interdit (*)	50
Thiamphénicol	50 (bov, ov, cap)	50
Tiamuline	Pas de LMR lait ⁽⁴⁾	50
8 Hydroxymutiline	Pas de LMR lait ⁽⁴⁾	50
Valnémuline	Pas de LMR lait	50
Rifaximine	60 (bov)	60
Triméthoprim	50 (bov, ov, cap)	50
Baquiloprim	30 (bov)	30
Novobiocine	50 (bov)	50
Tulathromycine	Pas de LMR lait Usage interdit (*) ⁽⁵⁾	25

Spiramycine	200 ⁽³⁾ (bov)	100
Néospiramycine	200 ⁽³⁾ (bov)	100
Tilmicosine	50 (bov, ov, cap)	50
Erythromycine	40 (bov, ov, cap)	40
Tylosine	50 (bov, ov, cap)	50
Tylvalosine	Pas de LMR lait	25
3-0-Acétilytylosine	Pas de LMR lait	25
Josamycine	/ ⁽²⁾	25
Tildipirosine	Pas de LMR lait Usage interdit (*)	40
Gamithromycine	Pas de LMR lait Usage interdit (*)	5
Pirlymicine	100 (bov)	100

Légende des tableaux et interprétation

(*) Ne pas utiliser chez les animaux produisant du lait destiné à la consommation humaine

⁽¹⁾ La LMR est donnée pour la somme de tous les résidus conservant la structure β lactam exprimée en tant que Desfuroylceftiofur.

⁽²⁾ Ces antibiotiques ne figurent pas dans le règlement 37/2010/CE, et ne sont pas destinés à un usage vétérinaire, donc n'ont pas de LMR.

⁽³⁾ La LMR est donnée pour la somme des résidus de la molécule mère et de son métabolite ou de son épimère. Pour la Céphapirine et la Desacétylecéphapirine, la concentration visée était de 50 μ g/kg lors de la validation dans le muscle alors que la LMR est fixée à 50 μ g/kg pour la somme de ces deux molécules car la sensibilité de l'API4000 était insuffisante. Donc la concentration visée pour le lait sera si possible de 25 μ g/kg.

⁽⁴⁾ La LMR est donnée pour l'ensemble des métabolites pouvant être hydrolysés en 8-hydroxymutiline.

⁽⁵⁾ En utilisant cette méthode sur des échantillons de terrain, la Tulathromycine marqueur ne sera sans doute pas détectée puisqu'une hydrolyse serait nécessaire. C'est pourquoi, lors du dépistage, il est important de rechercher la molécule mère à des concentrations très basses.

⁽⁶⁾ Selon la sensibilité de l'instrument, il peut être envisagé d'avoir une concentration visée en Dapsone dans les QC inférieure à 50 μ g/kg. C'est pourquoi un Signal/Bruit supérieur à 3 doit conduire à sa confirmation. Pour rappel, la dapsone fait partie des substances non autorisées en médecine vétérinaire avec une MMPR fixée à 5 μ g/kg selon le « EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices » paru en Septembre 2020 [8].

2 Documents de référence

- [1] Décision de la Commission Européenne 2002/657/CE du 12 Août 2002. Off J Eur Commun. L221: 8-36.
- [2] CRL Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines of January 2010
- [3] F/RD//GU/001 version 4 du 10/12/2020 : Guide de validation des méthodes de dépistage.
- [4] F/RD//GU/003 version 4 du 27/02/2018 : Guide de validation des méthodes analytiques de confirmation par CL-SM/SM
- [5] Règlement (UE) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009, Journal Officiel de l'Union européenne L15/1 (2010)
- [6] Directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996, Off J Eur Commun. L125 : 10-32
- [7] Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017, Journal officiel de l'Union européenne, L95 : 1-142
- [8] EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices, version 1 parue en Septembre 2020 (disponible sur le site web commun des LRUEs de Berlin, Fougères et Wageningen) <https://sitesv2.anses.fr/en/minisite/eurl-fougères/eu-food-safety-regulations-vmp-residues-food-animal-origin> ou bien <https://eurl-residues.eu/eurl-portal/portal-guidance-documents/>

3 Termes, sigles et définitions

CL-SM/SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

Mode MRM segmenté ou Mode MRM scheduled (Sciex) : c'est une segmentation automatique des acquisitions avec des fenêtres de temps déterminées. Ce mode d'acquisition permet d'intégrer un nombre plus important de transitions en adaptant les « dwell-time » au nombre de transitions à rechercher dans chaque fenêtre de temps.

ACN : acétonitrile

PFPA : acide pentafluoropropionique

HFBA : acide heptafluorobutyrique

4 Principe de la méthode

Le protocole comprend 2 étapes principales :

- une extraction des analytes par l'acétonitrile.
- une séparation par CLHP sur colonne de silice greffée de type C18 suivie d'une ionisation par électrospray en mode positif et d'une détection en spectrométrie de masse en tandem avec acquisition en mode MRM segmenté(2 transitions par analyte).

5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1 Eau

Utiliser de l'eau déminéralisée ultra-pure, de type eau purifiée par appareil Milli-Q (Millipore).

5.2 Gaz

5.2.1 Gaz de nébulisation et de séchage : air purifié

5.2.2 Gaz rideau et de collision : azote pur à 99,995%

5.3 Réactifs

Les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique.

5.3.1	Acétonitrile pour HPLC (Fisher A/0626/17)	N° CAS : [75-05-8]
5.3.2	Acétonitrile optima LC/MS Grade (Fisher A/955-212)	N° CAS : [75-05-8]
5.3.3	Acétate d'ammonium (Merck 01116)	N° CAS : [631-61-8]
5.3.4	Méthanol (Fisher M/4000/17)	N° CAS : [67-56-1]
5.3.5	Acide heptafluorobutyrique 99,5 % HFBA (Sigma 52411)	N° CAS : [375-22-4]
5.3.6	Acide pentafluoropropionique PFPA (Acros Organics 416920500)	N° CAS : [422-64-0]

5.4 Solutions

- 5.4.1** Solution d'acétate d'ammonium 0,2 mol/L : préparer dans un premier temps une solution d'acétate d'ammonium à 2 mol/L (15,4 g dans 100 mL d'eau ultra pure) puis la diluer au 1/10^{ème} dans l'eau ultra pure.
- 5.4.2** Phase mobile aqueuse : Solution d'HFBA 1 mmol/L (soit 0,013 %) + PFPA 9,5 mmol/L (soit 0,1 %) dans l'eau (pour la phase mobile A) : verser environ 450 mL d'eau ultra pure dans une fiole de 500 mL. Ajouter 65 µL d'HFBA et 500 µL de PFPA puis ajuster à 500 mL avec de l'eau ultra pure.
- 5.4.3** Phase mobile organique : Solution d'HFBA 1mmol/L (soit 0,013 %) + PFPA 9,5 mmol/L (soit 0,1%) dans l'acétonitrile optima LC/MS Grade (pour la phase mobile B) : verser environ 450 mL d'acétonitrile dans une fiole de 500 mL. Ajouter 65 µL d'HFBA et 500 µL de PFPA puis ajuster à 500 mL avec de l'acétonitrile.

5.5 Substances standards et préparation des solutions mères

5.5.1 Préparation des solutions mères

Des solutions mères à 0,5 mg/mL en substance active sont préparées individuellement pour chacune des molécules. Le solvant de dilution à utiliser et des données sur le stockage et la stabilité sont précisés pour chacun des antibiotiques dans le tableau suivant. Lorsque la stabilité n'a pas été déterminée, il conviendra de préparer les solutions fraîches avant utilisation. La solubilité des différentes substances actives dans les solvants indiqués est assurée à une concentration de 0,5 mg/mL. Si des solutions mères sont préparées à des concentrations différentes, il conviendra d'adapter ensuite les dilutions pour la préparation des solutions de supplémentation.

Beta-lactamines

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Amoxicilline Trihydrate	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	1 an à environ -18°C	[61336-70-7]
Ampicilline sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Acétonitrile, 75/25 (V/V)	1 an à environ +4°C	[69-52-3]
Pénicilline G sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	7 mois à au moins -18°C	[69-57-8]
Pénicilline V potassique	Sigma-Aldrich	Eau/Acétonitrile, 75/25 (V/V)	1 an à environ +4°C	[132-98-9]
Oxacilline sodique Monohydrate	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	1 an à au moins -18°C	[7240-38-2]
Cloxacilline sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	1 an à au moins -18°C	[7081-44-9]
Nafcilline sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	2 mois à au moins -18°C	[7177-50-6]
Dicloxacilline sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Acétonitrile, 75/25 (V/V)	6 mois à environ +4°C	[13412-64-1]
Céphapirine sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	1 an à au moins -18°C	[24356-60-3]
Desacétylcéphapirine sodique (DAC)	CIL Cluzeau	Eau/Acétonitrile, 75/25 (V/V)	1 mois à environ +4°C	[104557-89-3]
Céfquinome sulfate	Sigma-Aldrich	Eau/Acétonitrile, 75/25 (V/V)	2 mois à environ +4°C	[118443-88-2]
Céfalonium hydrate	Sigma-Aldrich	Eau/Acétonitrile, 75/25 (V/V)	1 mois à environ +4°C	[5575-21-3]
Céfazoline sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	1 an à au moins -18°C	[27164-46-1]
Céfalexine hydrate	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	1 an à au moins -18°C	[15686-71-2]
Ceftiofur hydrochloride	Sigma-Aldrich	Eau/Acétonitrile, 75/25 (V/V)	1 an à environ +4°C	[103980-44-5]
Desfuroylceftiofur cystéine disulfide	CIL Cluzeau	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	9 mois à au moins -18°C	[158039-15-7]
Céfopérazone sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	7 mois à au moins -18°C	[62893-20-3]
Céfuroxime sodique	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	3 mois à au moins -18°C	[56238-63-2]
Céfacétrile sodique	CIL Cluzeau	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	6 mois à au moins -18°C	[23239-41-0]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté, ajuster au trait de jauge avec le mélange Eau/Méthanol 50/50 (V/V) ou le mélange Eau/Acétonitrile 75/25 (V/V) en fonction, de l'analyte puis passer la fiole aux ultrasons.

Sulfamides

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Sulfaphénazole (standard interne)	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[526-08-9]
Sulfaguanidine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[57-67-0]
Sulfadiazine sodique*	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[547-32-0]
Sulfathiazole	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[72-14-0]
Sulfadimérazine (Sulfadimidine-Sulfaméthazine)	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[57-68-1]
Sulfaméthoxy-pyridazine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[80-35-3]
Sulfamonométhoxine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[1220-83-3]
Sulfadoxine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[2447-57-6]
Sulfaquinoxaline sodique	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[967-80-6]
Sulfadiméthoxine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[122-11-2]
Sulfanilamide	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[63-74-1]
Sulfacétamide	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[144-80-9]
Dapsone	Sigma-Aldrich	Méthanol	2 ans à au moins -18°C	[80-08-0]
Sulfaméthoxazole	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[723-46-6]
Sulfamérazine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[127-79-7]
Sulfaméthizole	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[144-82-1]
Sulfachloropyridazine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[80-32-0]
Sulfaclozine sodique	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[23307-72-4]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le méthanol. Passer la fiole aux ultrasons.

* La sulfadiazine sous sa forme base est peu soluble dans le méthanol, il est donc important d'utiliser la forme sodique.

Macrolides et apparentés (lincosamides)

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Tulathromycine	Zoetis	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[217500-96-4]
Spiramycine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[8025-81-8]
Tilmicosine	Sigma-Aldrich	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[108050-54-0]
Erythromycine	Sigma-Aldrich	Méthanol	3 mois à au moins -18°C	[114-07-8]
Tylosine tartrate	Sigma-Aldrich	Méthanol	3 mois à au moins -18°C	[1405-54-5]
Tylvalosine tartrate (Acétylisovaléryltylosine)	Eco Animal Health	Méthanol	2 mois à au moins -18°C	[63428-13-7]
Josamycine	Sigma-Aldrich	Méthanol	2 mois à au moins -18°C	[16846-24-5]
Lincomycine chlorhydrate	Sigma-Aldrich	Méthanol	6 mois à au moins -18°C	[859-18-7]
Tildipirosine	Lonza	Méthanol	2 ans à au moins -18°C	[328898-40-4]
Gamithromycine	CIL Cluzeau	Méthanol	5 mois à au moins -18°C	[145435-72-9]
Pirlymicine chlorhydrate	Zoetis	Méthanol	5 mois à au moins -18°C	[77495-92-2]
3-O-acétyltylosine	Eco Animal Health	Méthanol	1 an à au moins -18°C	[63409-10-9]
Néospiramycine	CIL Cluzeau	Méthanol	6 mois à au moins -18°C	[70253-62-2]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le méthanol. Passer la fiole aux ultrasons.

Tétracyclines

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Oxytétracycline chlorhydrate	Sigma-Aldrich	Méthanol	6 mois à au moins -18°C	[2058-46-0]
Tétracycline chlorhydrate	Sigma-Aldrich	Méthanol	6 mois à au moins -18°C	[64-75-5]
Chlortétracycline chlorhydrate	Sigma-Aldrich	Méthanol	6 mois à au moins -18°C	[64-72-2]
Doxycycline hyclate	Sigma-Aldrich	Méthanol	6 mois à au moins -18°C	[24390-14-5]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le méthanol. Passer la fiole aux ultrasons.

Quinolones

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Marbofloxacin	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	1 an à au moins -18°C	[115550-35-1]
Norfloxacin	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	6 mois à au moins -18°C	[70458-96-7]
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	1 an à au moins -18°C	[85721-33-1]
Danofloxacin	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	3 mois à au moins -18°C	[112398-08-0]
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	1 an à au moins -18°C	[93106-60-6]
Sarafloxacin chlorhydrate	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	1 an à au moins -18°C	[91296-87-6]
Difloxacin chlorhydrate	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	6 mois à au moins -18°C	[91296-86-5]
Acide Oxolinique	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	6 mois à au moins -18°C	[14698-29-4]
Acide Nalidixique	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	6 mois à au moins -18°C	[389-08-2]
Fluméquine	Sigma-Aldrich	Méthanol + 1 mL de soude 1N	6 mois à au moins -18°C	[42835-25-6]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté. Ajouter environ 5 mL de méthanol puis 1 mL de soude 1N pour une fiole de 20 mL. Ajuster au trait de jauge avec le méthanol puis passer la fiole aux ultrasons.

Phénicolés

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Florfenicol amine	Sigma-Aldrich	Méthanol	2 ans à au moins -18°C	[76639-93-5]
Thiamphénicol	Sigma-Aldrich	Méthanol	2 ans à au moins -18°C	[15318-45-3]
Florfenicol	Sigma-Aldrich	Méthanol	2 ans à au moins -18°C	[73231-34-2]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le méthanol. Passer la fiole aux ultrasons.

Pleuromutilines

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Tiamuline fumarate	Sigma-Aldrich	Méthanol	7 mois à au moins -18°C	[55297-96-6]
8 Hydroxymutiline	Novartis	Méthanol	2 ans à au moins -18°C	[87680-55-5]
Valnémuline hydrochloride	Sigma-Aldrich	Méthanol	3 mois à au moins -18°C	[101312-92-9]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le méthanol. Passer la fiole aux ultrasons.

Rifamycine

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Rifaximine	Sigma-Aldrich	Méthanol	Non déterminée	[80621-81-4]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le méthanol. Passer la fiole aux ultrasons.

Dérivés diaminopyrimidiques

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Trimethoprim	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	3 mois à au moins -18°C	[738-70-5]
Baquiloprim	Sigma-Aldrich	Eau/Méthanol, 50/50 (V/V)	3 mois à au moins -18°C	[102280-35-3]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le mélange Eau/méthanol 50/50 (V/V). Passer la fiole aux ultrasons.

Divers

Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation de la solution mère	Stabilité solution mère	N° CAS
Novobiocine sodique	Sigma-Aldrich	Méthanol	3 mois à au moins -18°C	[1476-53-5]

Peser la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté puis ajuster au trait de jauge avec le méthanol. Passer la fiole aux ultrasons.

5.5.2 Préparation des solutions de supplémentation (SS)

Les solutions de supplémentation doivent être préparées comme indiqué en annexes 1a et 1b pour la matrice muscle et en annexes 2a et 2b pour la matrice lait. Elles sont utilisées pour préparer les échantillons supplémentés de contrôle : SS-GRA-muscle et SS-GRB-muscle, SS-GRA-lait et SS-GRB-lait. Les analytes sont tous intégrés dans les solutions de supplémentation pour assurer l'identification en cas de résultat positif.

SS	Annexes
SS-GRA-Muscle	annexe 1a
SS-GRB-Muscle	annexe 1b
SS-GRA-Lait	annexe 2a
SS-GRB-Lait	annexe 2b

5.5.3 Préparation de la solution de standard interne de Sulfaphénazole à 1 µg/mL (SI)

Une solution intermédiaire à 20 µg/mL est préparée en prélevant 800 µL de la solution mère à 0,5 mg/mL dans une fiole jaugée de 20 mL et en complétant avec du méthanol. Cette solution se conserve 6 mois à au moins -18°C.

La solution de supplémentation en standard interne est préparée en prélevant 1 mL de la solution intermédiaire dans une fiole jaugée de 20 mL et en complétant avec de l'eau déminéralisée. Cette solution se conserve 3 mois à environ +4°C.

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Les références sont données à titre indicatif. Tout matériel équivalent peut être utilisé.

6.1 Matériel de Laboratoire

- 6.1.1 Tubes en verre de volume supérieur à 6 mL.
- 6.1.2 Fioles jaugées en verre de différentes capacités et bouchons adaptés.
- 6.1.3 Sabots de pesée.
- 6.1.4 Broyeur (Moulinex)
- 6.1.5 Evaporateur sous flux d'azote (J. Toulemonde).
- 6.1.6 Distributeurs de solvant à volume variable (Socorex).
- 6.1.7 Tubes à centrifuger de 16 mL en propylène Nalgène (VWR 525-2855) avec obturateurs (VWR 525-2934)
- 6.1.8 Pipettes automatiques de laboratoire et cônes correspondants (Gilson-Biohit).
- 6.1.9 Agitateur électrique type VORTEX (Bioblock).
- 6.1.10 Agitateur rotatif type HEIDOLPH "Rheax II".
- 6.1.11 Balance de précision (résolution $\leq 0,1$ mg).
- 6.1.12 Balance de précision analytique (résolution ≤ 10 mg).
- 6.1.13 Ultracentrifugeuse réfrigérée pouvant atteindre 14000 g type Multifuge X3R (Thermofisher)
- 6.1.14 Filtres 0,45 μ m diamètre 13 mm type Millex HV PVDF (Millipore) et seringues 1 mL pour filtration.
- 6.1.15 Flacon à injection à vis en polypropylène de 500 μ L, type Interchim (CH963290)
- 6.1.16 Pipettes pasteur 7 mL non-stériles graduées 3 mL type VWR (612-1681)
- 6.1.17 Flacons à scintillation en polyéthylène de 20 mL, type Wheaton (986721)

6.2 Matériel de chromatographie

- 6.2.1** Pompe CLHP (système binaire) LC-20AD XR (Shimadzu) ou équivalent.
- 6.2.2** Injecteur automatique SIL-20ACXR (Shimadzu) ou équivalent.
- 6.2.3** Four à colonne CTO-20AC (Shimadzu) ou équivalent
- 6.2.4** Précolonne Symmetry C18, 5 µm, 20 x 3,9 mm (Waters) ou Security Guard C18, 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex).
- 6.2.5** Colonne analytique Symmetry C18, 5 µm, 150 X 3,9 mm (Waters).

6.3 Spectrométrie de masse

- 6.3.1** Vanne de dérivation Valco ou équivalent.
- 6.3.2** Spectromètre de masse triple quadripôle (API 4000 ou API5500, Sciex) avec interface « turboionspray » et station informatique avec logiciel ANALYST ou système équivalent.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant mise en analyse, les échantillons doivent être conservés à au moins -18°C.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

8.1.1 Muscle d'animaux de boucherie et volailles

Décongeler l'échantillon et broyer une portion du muscle.

Peser $2 \pm 0,04$ g de muscle broyé.

8.1.2 Produits d'aquaculture

Décongeler l'échantillon.

Pour les poissons, prélever un filet en entier ou une partie du filet (avec la peau), l'homogénéiser par broyage et peser $2 \pm 0,04$ g

Pour les crevettes, homogénéiser une quantité de chair suffisante par broyage, peser $2 \pm 0,04$ g.

8.1.3 Lait

Décongeler et homogénéiser l'échantillon.

Peser $2 \pm 0,04$ g de lait.

8.2 Préparation des échantillons supplémentés de contrôle et du témoin

Ces échantillons sont supplémentés au niveau de concentration visé (cf. annexes 1a - 1b - 2a et 2b). Ils peuvent être préparés au préalable puis congelés à au moins -18°C . Ils peuvent être conservés 6 mois au maximum.

Peser $2 \pm 0,04$ g de matrice (muscle ou chair broyé, lait) exempt d'antibiotique.

Ajouter 200 μl de solution SS sauf pour le témoin, agiter et congeler l'échantillon si nécessaire.

Muscle d'animaux de boucherie et de volailles

Il est possible de préparer 3 types d'échantillons supplémentés de contrôle pour représenter l'ensemble des espèces d'animaux de boucherie et volailles.

- Des échantillons supplémentés de contrôle dans le poulet peuvent ainsi être utilisés pour la viande blanche : poulet, dinde, lapin.
- Des échantillons supplémentés de contrôle dans le bœuf peuvent être utilisés pour la viande rouge (ruminants) : bœuf, mouton, cheval, chèvre.
- Puis, un troisième type d'échantillons supplémentés de contrôle doit être préparé dans le porc.

Produits d'aquaculture

Il est préférable de préparer 3 types d'échantillons pour les produits d'aquaculture.

- Des échantillons supplémentés de contrôle dans un poisson maigre au choix peuvent ainsi être utilisés pour les représenter (ex : bar, turbot, daurade, ...).
- Des échantillons supplémentés de contrôle dans un poisson gras (salmonidés) au choix peuvent ainsi être utilisés pour les représenter (ex : saumon, truite, ...).
- Des échantillons supplémentés de contrôle spécifiques dans les crevettes doivent aussi être préparés.

Lait

Il est possible de préparer 1 type d'échantillon supplémenté de contrôle pour représenter la catégorie lait.

- Des échantillons supplémentés de contrôle dans le lait de vache peuvent ainsi être utilisés pour représenter les autres espèces animales (ex : brebis, chèvre, ...).

8.3 Extraction

Pour s'assurer de la qualité des réactifs utilisés (contaminations), il est conseillé d'ajouter un blanc réactif à la série d'analyse.*

**remplacer les 2g de matrice par 2g d'eau déminéralisée.*

- 8.3.1** Ajouter 200 µL de solution de Sulfaphénazole à 1 µg/mL (standard interne) à chacun des tubes. Agiter.
- 8.3.2** Ajouter 800 µL d'eau aux échantillons à analyser ainsi qu'au témoin et au blanc réactif et seulement 600 µL d'eau aux échantillons supplémentés de contrôle. Agiter.
- 8.3.3** Laisser les échantillons 10 min à l'obscurité.
- 8.3.4** Ajouter 8 mL d'acétonitrile.
- 8.3.5** Boucher les tubes et agiter 10 min à l'agitateur rotatif à 100 tours/min.
- 8.3.6** Centrifuger 5 minutes à 14000 g à environ 4° C (une étude de robustesse a montré qu'il est possible de centrifuger à 5000 g)
- 8.3.7** Transférer 6 mL du surnageant dans un autre tube.
- 8.3.8** Évaporer à sec sous flux d'azote à environ 50°C.
- 8.3.9** Dissoudre le résidu dans 0,6 mL d'acétate d'ammonium 0,2 mol/L.
- 8.3.10** Agiter au vortex.
- 8.3.11** Filtrer les extraits à l'aide de filtres 0,45 µm.

8.4 Analyse et détection par CL-SM/SM

8.4.1 Conditions chromatographiques

8.4.1.1 Débit : 0,6 mL/min

8.4.1.2 Volume d'injection : 25 µL (appareil de type Sciex API4000) ou 5 µL (appareil de type Sciex API5500)

8.4.1.3 Température du four de la colonne : 25°C

8.4.1.4 Température du passeur : ambiante

8.4.1.5 Gradient d'élution :

T (min)	Voie A %	Voie B %
0	90	10
4	70	30
5	70	30
7	30	70
10	30	70
11	90	10
15	90	10

A : Solution d'HFBA 1 mmol/L (soit 0,013 %) + PFPA 9,5 mmol/L (soit 0,1 %) dans l'eau.

B : Solution d'HFBA 1mmol/L (soit 0,013 %) + PFPA 9,5 mmol/L (soit 0,1 %) dans l'acétonitrile optima LC/MS Grade.

8.4.1.6 Vanne valco : ouverture de 2,6 min à 14 min.

8.4.2 Conditions de détection sur un triple quadripôle

Les conditions de détection mentionnées ci-dessous concernent les spectromètres de masse API 4000 et 5500 (Sciex).

8.4.2.1 Conditions de source pour un API4000 :

Type de scan : MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ionisation : turbo Spray, mode positif

Hauteur de l'électrode : 3 mm

Température de source : 700°C

Curtain gas : 20 psi

GS1 : 40 psi

GS2 : 50 psi

IS : 5500 V

EP: 10 V

CAD : 3

8.4.2.2 Conditions de source pour un API5500

Type de scan : MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ionisation : turbo Spray, mode positif

Hauteur de l'électrode : 3 mm

Température de source : 600°C

Curtain gas : 35 psi

GS1 : 50 psi

GS2 : 60 psi

IS : 5500 V

EP: 10 V

CAD : medium

8.4.3 MRM ajusté ou scheduled® (systèmes Sciex):

MRM detection window : 60 sec

Target scan time : 2 sec

Type de scan : MRM avec fenêtre MRM ajustée pour chaque transition au temps de rétention attendu ± 30 sec.

8.4.4 Transitions recherchées et temps de rétention

Les transitions recherchées et les temps de rétention sont donnés à titre indicatif. Ces derniers peuvent varier en fonction du matériel chromatographique utilisé. Ils devront être ajustés précisément pour l'utilisation d'un mode MRM segmenté ou ajusté.

	Transition	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	DP	CE	CXP	TR (min) (API4000)	TR (min) (API5500)
8 Hydroxymutiline	1	337,2	301,5	46	11	18	7,7	7,7
	2	337,2	283,3	46	13	18	7,7	7,7
Acide Nalidixique	1	233,2	215	42	22	15	8,9	9
	2	233,2	187	42	35	15	8,9	9
Acide Oxolinique	1	262,2	244	53	25	15	8,1	8,3
	2	262,2	216	53	40	15	8,1	8,3
Amoxicilline*	1	366,1	349	50	13	12	4,7	5,4
	2	366,1	114	50	33	12	4,7	5,4
	3	366,1	208	50	20	12	4,7	5,4

Ampicilline	1	350,3	106	50	20	12	5,9	6,5
	2	350,3	160	50	20	12	5,9	6,5
Baquiloprim	1	309,2	294,2	91	29	18	5,1	6
	2	309,2	266,2	91	41	16	5,1	6
Céfacétrile-NH4	1	357,0	280	21	13	13	/	6,1
	2	357,0	252	21	21	20	/	6,1
Céfalexine	1	348,0	158	50	10	12	5,9	6,5
	2	348,0	106	50	23	12	5,9	6,5
Céfalonium	1	459,0	152	50	25	12	5,7	6,4
	2	459,0	337	50	15	12	5,7	6,4
Céfazoline	1	455,2	322,9	50	15	12	6,2	6,6
	2	455,2	155,9	50	23	12	6,2	6,6
Céfopérazone	1	646,0	530	60	17	12	7,2	7,6
	2	646,0	143,2	60	50	12	7,2	7,6
Cefquinome	1	529,1	134	50	25	12	5,2	6,2
	2	529,1	125	50	75	12	5,2	6,2
Ceftiofur	1	523,9	240,9	50	25	12	7,8	8,1
	2	523,9	125	50	70	12	7,8	8,1
Céfuroxime	1	447,1	385,9	81	17	24	7,3	7,5
	2	447,1	342	81	19	22	7,3	7,5
Céphapirine	1	424,0	152	50	35	12	5,2	5,9
	2	424,0	124	50	70	12	5,2	5,9
Chlortétracycline	1	479,2	444	60	29	15	7,7	8,1
	2	479,2	461,8	60	23	15	7,7	8,1
Ciprofloxacine	1	332,2	314	61	30	15	6,1	6,7
	2	332,2	231	61	47	15	6,1	6,7
Cloxacilline	1	436,1	277	50	20	12	9,2	9,3
	2	436,1	160	50	20	12	9,2	9,3
Danofloxacine	1	358,3	340	60	33	15	6,2	6,9
	2	358,3	255	60	50	15	6,2	6,9
Dapsone	1	249,2	156,1	81	21	8	7,3	7,2
	2	249,2	108,1	81	29	10	7,3	7,2
Desacétylcéphapirine	1	382,1	152,1	66	35	12	5,1	5,2
	2	382,1	112,1	66	39	12	5,1	5,2
Desfuroylceftiofur	1	548,9	183,1	76	41	12	/	5,8
	2	548,9	241,1	76	29	12	/	5,8
Dicloxacilline	1	470,0	160	50	20	12	9,6	9,6
	2	470,0	310,8	50	20	12	9,6	9,6
Difloxacine	1	400,2	382	80	30	15	7,2	7,9

	2	400,2	356	80	26	15	7,2	7,9
Doxycycline	1	445,0	428	55	25	15	7,8	8,1
	2	445,0	154,1	55	40	15	7,8	8,1
Enrofloxacin	1	360,1	342	72	30	15	6,4	7,2
	2	360,1	286	72	50	15	6,4	7,2
Erythromycin	1	734,4	158	90	50	12	7,9	8,3
	2	734,4	576,5	90	25	12	7,9	8,3
Florfenicol	1	358,0	339,9	51	13	20	8,1	8,1
	2	358,0	241	51	23	20	8,1	8,1
Florfenicol amine	1	248,2	230	51	17	14	4,4	4,8
	2	248,2	130,1	51	33	10	4,4	4,8
Flumequin	1	262,3	244	44	25	15	9	9
	2	262,3	202	44	45	15	9	9
Gamithromycin	1	777,6	619,6	81	47	8	7,8	8,1
	2	777,6	158,2	81	61	10	7,8	8,1
Josamycin	1	828,5	174,1	80	45	12	8,3	8,7
	2	828,5	229	80	45	12	8,3	8,7
Lincomycin	1	407,5	126	60	40	15	5,3	5,9
	2	407,5	359	60	26	15	5,3	5,9
Marbofloxacin	1	363,0	345	70	30	15	5,9	6,6
	2	363,0	320	70	22	15	5,9	6,6
Nafcillin	1	415,1	199	50	20	12	9,2	9,3
	2	415,1	171	50	50	12	9,2	9,3
Néospiramycin	1	699,3	174,1	80	42	12	6,6	7,8
	2	699,3	540,2	80	25	12	6,6	7,8
Norfloxacin	1	320,2	302	60	33	15	6	6,6
	2	320,2	231	60	50	15	6	6,6
Novobiocin	1	613,2	189,2	71	39	12	13	11,3
	2	613,2	218,2	71	19	12	13	11,3
3-o-acétyltylosine	1	958,5	174,2	121	59	12	8	8,4
	2	958,5	814,5	121	43	12	8	8,4
Oxacillin	1	402,1	160	50	18	12	8,9	9
	2	402,1	243	50	18	12	8,9	9
Oxytétracycline	1	461,0	426	65	30	15	6,1	6,7
	2	461,0	443	65	17	15	6,1	6,7
Pénicilline G	1	335,1	160	50	15	12	8,5	8,7
	2	335,1	176	50	15	12	8,5	8,7
Pénicilline V	1	351,2	160	50	15	12	8,8	8,9
	2	351,2	114	50	45	12	8,8	8,9
Pirlymicin	1	411,3	112,3	86	37	8	7	7,8
	2	411,3	363,1	86	25	26	7	7,8

Rifaximine	1	786,5	754,3	101	29	12	9,7	9,8
	2	786,5	151,2	101	47	8	9,7	9,8
Sarafloxacin	1	386,3	368	50	30	15	7,1	7,9
	2	386,3	348	50	50	15	7,1	7,9
Spiramycine	1	843,5	174,1	100	47	12	7,2	7,9
	2	843,5	540,1	100	42	12	7,2	7,9
Sulfacétamide	1	215,5	156	61	13	16	4,8	4,8
	2	215,5	108,2	61	31	10	4,8	4,8
Sulfachloropyridazine	1	284,9	156,1	66	19	10	7,6	7,5
	2	284,9	108,2	66	37	8	7,6	7,5
Sulfaclozine	1	284,9	108,2	66	35	8	8,3	8,4
	2	284,9	130,1	66	31	10	8,3	8,4
Sulfadiazine	1	251,0	156	53	22	12	4,6	4,8
	2	251,0	108	53	30	12	4,6	4,8
Sulfadimérazine	1	279,1	156	50	25	12	5,3	5,5
	2	279,1	108	50	36	12	5,3	5,5
Sulfadiméthoxine	1	311,1	156	60	25	12	8,3	8,4
	2	311,1	108	60	40	12	8,3	8,4
Sulfadoxine	1	311,0	156	60	25	12	7,6	7,8
	2	311,0	108	60	40	12	7,6	7,8
Sulfaguanidine	1	215,0	156	20	20	12	3	3,4
	2	215,0	108	20	30	12	3	3,4
Sulfamérazine	1	265,1	156	66	23	14	5,1	5,2
	2	265,1	108,2	66	39	12	5,1	5,2
Sulfaméthizole	1	271,2	156,1	56	21	14	6,1	6,2
	2	271,2	108,2	56	37	12	6,1	6,2
Sulfaméthoxazole	1	254,0	156,1	66	23	14	8	8,1
	2	254,0	108,2	66	33	8	8	8,1
Sulfaméthoxypyridazine	1	281,0	156	60	25	12	5,9	6,1
	2	281,0	108	60	35	12	5,9	6,1
Sulfamonométhoxine	1	281,1	156	60	25	12	6,7	6,8
	2	281,1	108	60	35	12	6,7	6,8
Sulfanilamide	1	173,1	155,9	76	11	10	3,4	3,6
	2	173,1	108,2	76	23	8	3,4	3,6
Sulfaphénazole		315,0	156	50	30	12	8,4	8,4
Sulfaquinoxaline	1	301,0	156	50	23	12	8,2	8,4
	2	301,0	108	50	40	12	8,2	8,4
Sulfathiazole	1	256,0	156	53	20	12	4,9	5,2
	2	256,0	108	53	34	12	4,9	5,2

Tétracycline	1	445,0	410	55	27	15	6,4	7,2
	2	445,0	427	55	25	15	6,4	7,2
Thiamphénicol	1	356,1	337,9	51	13	20	6	6,1
	2	356,1	307,9	51	21	18	6	6,1
Tiamuline	1	494,3	192,2	81	31	12	8,2	8,6
	2	494,3	119,1	81	57	8	8,2	8,6
Tildipirosine	1	734,5	98,2	106	75	8	6,1	7,3
	2	734,5	174,4	106	49	14	6,1	7,3
Tilmicosine	1	869,5	174,1	120	63	12	7,8	8,1
	2	869,5	696	120	55	12	7,8	8,1
Trimethoprim	1	291,2	230,2	36	31	14	6,1	6,7
	2	291,2	123,1	36	33	6	6,1	6,7
Tulathromycine	1	806,6	577,4	126	33	12	6,7	7,9
	2	806,6	158,2	126	59	12	6,7	7,9
Tylosine	1	916,7	174,1	120	50	12	7,9	8,3
	2	916,7	772,3	120	40	12	7,9	8,3
Tylvalosine	1	1042,6	109,3	121	95	12	8,5	8,9
	2	1042,6	174,1	121	57	12	8,5	8,9
Valnémuline	1	565,4	263,2	71	23	20	8,3	8,7
	2	565,4	147,2	71	51	12	8,3	8,7

*Cf. paragraphe 10.3

8.4.5 Séquence d'acquisition

Lors d'analyses de routine, les échantillons seront injectés de préférence de la façon suivante :

- Blanc réactif,
- Témoin,
- Echantillons supplémentés de contrôle,
- Injection d'eau/ACN,
- Extraits à analyser : il est préférable d'injecter de l'eau/ACN entre chaque échantillon afin d'éviter toute contamination en cas de fortes teneurs en antibiotique,
- Témoin,
- Echantillons supplémentés de contrôle. Cet échantillon de contrôle peut aussi être injecté en milieu de séquence si le nombre d'échantillons à analyser est important.
- Injection d'eau/ACN.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La présence du standard interne (SI) Sulfaphénazole dans chaque chromatogramme doit être vérifiée.

La présence de chacun des antibiotiques à la concentration cible dans les échantillons supplémentés de contrôle doit être vérifiée et le pic chromatographique doit avoir un rapport Signal/Bruit ≥ 3 au minimum évalué sur la deuxième transition (ou sur la première transition pour les analytes pour lesquels la deuxième transition n'est pas présente).

Une hauteur minimale de signal (ex : pour le standard interne ou un panel d'antibiotiques) peut être déterminée sur chaque appareil.

Lorsqu'un analyte est détecté, vérifier que ce même analyte n'est pas présent dans le témoin.

9.2 Calculs et expression des résultats

Identification et estimation de la concentration

L'identification des analytes recherchés est validée lorsqu'il y a présence de signaux chromatographiques pour chacune des transitions spécifiques à chaque composé au temps de rétention attendu (voir tableau § 8.4.4). Pour certains antibiotiques comme la Céfuroxime, la Desacétylephapirine, le Thiamphénicol, la Tylvalosine, l'Ampicilline, la Pénicilline V, l'Amoxicilline, la présence d'une seule transition peut être suffisante pour passer à l'étape de confirmation car le signal est parfois insuffisant sur la deuxième transition (API4000).

Chaque antibiotique détecté sera identifié par la **présence d'une transition** (pour les antibiotiques cités précédemment) **ou des deux transitions** pour les autres antibiotiques et par le temps de rétention.

Les règles de décision pour l'envoi en confirmation ont été établies à partir des données de validation et sont décrites dans le paragraphe suivant. Une méthode de semi-quantification est créée afin d'estimer les concentrations en analyte. Un modèle de régression linéaire à deux points est construit en utilisant le témoin et l'échantillon supplémenté de contrôle (rapports de surfaces Analyte/SI).

Décision :

Les résultats de validation ont permis de fixer les règles de décision d'envoi des échantillons en confirmation selon le tableau ci-après.

<u>Pour le muscle</u>	<u>Pour les produits d'aquaculture</u>	<u>Pour le lait</u>
Appareil de type API4000 (Sciex)	Appareil de type API5500 (Sciex)	Appareil de type API5500 (Sciex)
Un échantillon peut être considéré comme SUSPECT pour un analyte soit si $C_{estimée} \geq 1/10$ LMR ou $\geq 1/4$ LMR en fonction de l'analyte dépisté et de la matrice cible soit si le rapport Signal/Bruit ≥ 3 pour la Dapsone. La feuille récapitulative des seuils d'envoi en confirmation dans la matrice muscle et produits d'aquaculture se trouve en Annexe 4 « muscle ».		Un échantillon peut être considéré comme SUSPECT pour un analyte si $C_{estimée} \geq 1/2$ LMR sauf pour le Désacétylcéphapirine, la Tulathromycine, la Tylvalosine, la Tiamuline et la Valnémuline dont le seuil correspond au 1/10 ^{ème} LMR. La feuille récapitulative des seuils d'envoi en confirmation dans la matrice lait se trouve en Annexe 4 « lait ».

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Les tableaux de caractéristiques de la méthode se trouvent en annexe 5a pour le muscle d'animaux de boucherie et volailles, en annexe 5b pour les produits d'aquaculture et en annexe 5c pour le lait.

10.1 Conclusion pour le muscle d'animaux de boucherie et volailles

La méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques en MRM scheduled® par CL-SM/SM sur l'API4000 pour le muscle d'animaux de boucherie et volailles a fait l'objet d'une étude de validation initiale afin de déterminer ses caractéristiques de performance (spécificité, CC β , LOD, ...). **Les résultats sont satisfaisants pour la majorité des molécules des différentes familles.**

Remarque

Pour cinq antibiotiques : Néospiramycine, Baquiloprim, 8-hydroxymutiline, Thiamphénicol, Valnémuline, le CC β est supérieur à Cval pour les 2 transitions mais la sensibilité est > 95% pour au moins une transition et la limite de détection est largement inférieure à la concentration de validation. Ceci est dû à une grande variabilité qui provient du mode d'extraction simple retenu (acétonitrile), de la non-utilisation de standards internes dédiés, et de l'usage d'un grand nombre de matrices très différentes pour la validation générale de la méthode. Il n'y aura donc pas de problème en routine pour assurer leur détection dans un contexte de

dépistage pour envoi en confirmation. Compte-tenu de l'ensemble des paramètres (CC β , LODs, et sensibilité), la méthode est considérée comme validée pour ces antibiotiques également.

Pour deux antibiotiques, l'étude des paramètres a montré des résultats moins satisfaisants :

-la Céphapirine : CC β > Cval, non validée. La Céphapirine pourra être favorablement détectée à la concentration ciblée grâce à la 2^{ème} transition de son métabolite la Désacétylcéphapirine.

-le Desfuroylceftiofur : CC β > Cval, non validé. Il sera détecté à la concentration ciblée par la présence de la molécule parente, le Ceftiofur. Le Desfuroylceftiofur sera toujours très peu détecté dans ce contexte de dépistage car il serait nécessaire de réaliser une hydrolyse incompatible avec l'approche multi-résidus d'antibiotiques. Le Desfuroylceftiofur ne figure donc plus dans la méthode de dépistage pour la matrice muscle. De ce fait, l'ensemble des critères de performance techniques n'est pas atteint pour ces deux molécules. Pour toutes les autres molécules, l'ensemble des critères de performance techniques et non techniques est atteint.

En conclusion, la méthode est validée dans la matrice muscle (capacités de détection inférieures aux LMRs) pour l'ensemble des molécules excepté pour la Céphapirine.

10.2 Conclusion pour les produits d'aquaculture

Le transfert de la méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le muscle en MRM scheduled par CL-SM/SM vers l'API5500 et pour la chair de poissons et crevettes a fait l'objet d'une étude de validation complémentaire (transfert par une journée de validation) afin de déterminer ses caractéristiques de performance (spécificité, CC β , LODs, ...). **Les résultats sont satisfaisants pour la majorité des molécules des différentes familles.**

Remarque

Pour certains antibiotiques : Pirlimycine, Néospiramycine, Tildipirosine, Tulathromycine, Josamycine, Spiramycine, Tilmicosine, Tylosine, O-acétyltylosine, Tylvalosine, Tiamuline, Valnémuline, Novobiocine, Rifaximine, le CC β ou capacité de détection est supérieur à Cval pour les 2 transitions mais la sensibilité est > 95% pour au moins une transition et la limite de détection est largement inférieure à la concentration de validation. Ceci est dû à une grande variabilité qui provient du mode d'extraction simple retenu (acétonitrile), de la non-utilisation de standards internes dédiés, et de l'usage d'un grand nombre de matrices très différentes pour la validation générale de la méthode. Il n'y aura donc pas de problème en routine pour assurer leur détection dans un contexte de dépistage pour envoi en confirmation. Compte-tenu de l'ensemble des paramètres (CC β , LODs, et sensibilité), la méthode est considérée comme validée pour ces antibiotiques également.

En conclusion, la méthode est donc validée dans les produits d'aquaculture (capacités de détection inférieures aux concentrations de validation) pour l'ensemble des molécules.

10.3 Conclusion pour le lait

La méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques en MRM scheduled® par CL-SM/SM sur l'API5500 pour le lait a fait l'objet d'une étude de validation initiale afin de déterminer ses caractéristiques de performance (spécificité, CC β , LODs, ...). Les résultats sont satisfaisants pour toutes les molécules des différentes familles. Au regard des critères de performance et autres exigences applicables aux méthodes d'analyse de dépistage, la méthode issue du projet 20.QS-VALILA est validée pour les 39 molécules du groupe A et les 34 molécules du groupe B :

CC β < ½ LMR donc < LMR

Taux de faux conformes < 5% pour ½ Cval

En conclusion, la méthode est donc validée dans le lait (CC β inférieures aux concentrations de validation) pour l'ensemble des molécules.

Les seuils d'envoi en confirmation ont été estimés au regard des incertitudes élargies des molécules. En conclusion, le seuil correspond à la ½ LMR pour la plupart des antibiotiques, sauf pour le Désacétylcéphapirine, la Tulathromycine, la Tylvalosine, la Tiamuline et la Valnémuline dont le seuil correspond au 1/10ème LMR.

Pour la détection de l'Amoxicilline dans le lait, la semi-quantification est à réaliser préférentiellement sur la transition 3 car elle est généralement la plus sensible.

Le standard de résidu marqueur de la Tulathromycine étant difficile à obtenir, aux vues des différentes publications sur le sujet et les seuils d'envoi en confirmation suffisamment bas (estimés au 1/10ème LMR) pour ne pas passer à côté d'un échantillon suspect en Tulathromycine, il a été décidé de retirer le résidu marqueur de la méthode de dépistage des Antibiotiques dans le muscle et le lait (ANSES/LMV/16/02 v5).

Annexe 1a : préparation de la solution de supplémentation SS-GRA-muscle

G R O U P E A	AnalYTE	Concentrati on visée (µg/kg)	Volume (µL) à prélever de la SM à 0,5mg/mL et à mettre dans une fiole de 100 mL qsp eau	Concentration de la solution SS-GRA-muscle µg/mL
	PENICILLINES			
	Amoxicilline	50	100	0,5
	Penicilline G	50	100	0,5
	Penicilline V	25	50	0,3
	Oxacilline	300	600	3,0
	Cloxacilline	300	600	3,0
	Nafcilline	300	600	3,0
	Dicloxacilline	300	600	3,0
	CEPHALOSPORINES			
	Cephapirine	50	100	0,5
	Désacétylcéphapirine	50	100	0,5
	Cefquinome	50	100	0,5
	Cephalonium	50	100	0,5
	Cefazoline	50	100	0,5
	Cephalexine	200	400	2,0
	Ceftiofur	100	200	1,0
	Cefoperazone	50	100	0,5
	Céfuroxime	50	100	0,5
	SULFAMIDES			
	Sulfaguavidine	100	200	1,0
Sulfadiazine	100	200	1,0	
Sulfathiazole	100	200	1,0	
Sulfadimersazine	100	200	1,0	
Sulfamethoxypyridazine	100	200	1,0	
Sulfamonomethoxine	100	200	1,0	
Sulfadoxine	100	200	1,0	
Sulfaquinoxaline	100	200	1,0	
Sulfadimethoxine	100	200	1,0	
Sulfanilamide	100	200	1,0	
Sulfacétamide	100	200	1,0	
Sulfaméthoxazole	100	200	1,0	
Sulfamérazine	100	200	1,0	
Sulfaméthizole	100	200	1,0	
Sulfachloropyridazine	100	200	1,0	
Dapsone	50	100	0,5	
Sulfaclozine	100	200	1,0	
TETRACYCLINES				
Oxytetracycline	100	200	1,0	
Tetracycline	100	200	1,0	
Chlortetracycline	100	200	1,0	
Doxycycline	100	200	1,0	

Annexe 1b : préparation de la solution de supplémentation SS-GRB-muscle

		Concentration visée (µg/kg)	Volume (µL) à prélever de la SM à 0,5mg/mL et à mettre dans une fiole de 100 mL qsp eau	Concentration de la solution SS-GRB-muscle µg/mL
PENICILLINES				
Ampicilline		50	100	0,5
MACROLIDES ET APPARENTES (LINCOSAMIDES)				
Tulathromycine		800	1600	8,0
Neospiramycine		100	200	1,0
Spiramycine		100	200	1,0
Tilmicosine		50	100	0,5
Erythromycine		200	400	2,0
Tylosine		100	200	1,0
Tylvalosine		25	50	0,3
O-acetyltylosine		25	50	0,3
Josamycine		50	100	0,5
Tildipirosine		400	800	4,0
Gamithromycine		50	100	0,5
Pirlimycine		100	200	1,0
Lincomycine		100	200	1,0
QUINOLONES				
G R O U P E B	Marbofloxacin	150	300	1,5
	Norfloxacin	100	200	1,0
	Ciprofloxacin	50	100	0,5
	Danofloxacin	100	200	1,0
	Enrofloxacin	50	100	0,5
	Sarafloxacin	30	60	0,3
	Difloxacin	300	600	3,0
	Acide oxolinique	100	200	1,0
	Acide nalidixique	50	100	0,5
Flumequine		200	400	2,0
PHENICOLES				
Florfenicol amine		50	100	0,5
Florfenicol		50	100	0,5
Thiamphénicol		50	100	0,5
PLEUROMUTILINES				
Tiamuline		100	200	1,0
8 hydroxymutiline		100	200	1,0
Valnémuline		50	100	0,5
RIFAMICINE				
Rifaximine		50	100	0,5
DERIVÉS DIAMINOPYRIMIDIQUES				
Triméthoprim		50	100	0,5
Baquiloprim		50	100	0,5
DIVERS				
Novobiocine		50	100	0,5


















Annexe 2a : préparation de la solution de supplémentation SS-GRA-lait

















Analyte	Concentration visée (µg/kg)	Volume (µl) à prélever de la SM à 0,5mg/ml et à mettre dans une fiole de 500 ml qsp eau	Concentration de la SS-GRA-lait (µg/ml)
Amoxicilline	4	40	0,04
Penicilline G	4	40	0,04
Penicilline V	4	40	0,04
Oxacilline	30	300	0,3
Cloxacilline	30	300	0,3
Nafcilline	30	300	0,3
Dicloxacilline	30	300	0,3
Céphapirine	30	300	0,3
Désacétylcéphapirine	30	300	0,3
Cefquinome	20	200	0,2
Céphalonium	20	200	0,2
Céfazoline	50	500	0,5
Céphalexine	100	1000	1
Ceftiofur	100	1000	1
Desfuroylceftiofur disulfide (DCCD)	100	1000	1
Céferazone	50	500	0,5
Céfuroxime	50	500	0,5
Céfacétrile	125	1250	1,25
Sulfaguanidine	100	1000	1
Sulfadiazine	100	1000	1
Sulfathiazole	100	1000	1
Sulfadimerazine	100	1000	1
Sulfamethoxypyridazine	100	1000	1
Sulfamonomethoxine	100	1000	1
Sulfadoxine	100	1000	1
Sulfaquinoxaline	100	1000	1
Sulfadimethoxine	100	1000	1
Sulfanilamide	100	1000	1
Sulfacétamide	100	1000	1
Sulfaméthoxazole	100	1000	1
Sulfamérazine	100	1000	1
Sulfaméthizole	100	1000	1
Sulfachloropyridazine	100	1000	1
Dapsone	50	500	0,5
Sulfaclozine	100	1000	1
Oxytetracycline	100	1000	1
Tetracycline	100	1000	1
Chlortetracycline	100	1000	1
Doxycycline	10	100	0,1













Annexe 2b : préparation de la solution de supplémentation SS-GRB-lait








Analyte	Concentration visée (µg/kg)	Volume (µl) à prélever de la SM à 0,5mg/ml et à mettre dans une fiole de 500 ml qsp eau	Concentration de la SS-GRB-lait (µg/ml)
Ampicilline	4	40	0,04
Lincomycine	150	1500	1,5
Marbofloxacin	75	750	0,75
Norfloxacine	100	1000	1
Ciprofloxacine	50	500	0,5
Danofloxacine	30	300	0,3
Enrofloxacine	50	500	0,5
Sarafloxacine	100	1000	1
Difloxacine	30	300	0,3
Acide oxolinique	10	100	0,1
Acide nalidixique	100	1000	1
Flumequine	50	500	0,5
Florfenicol	50	500	0,5
Florfenicol amine	50	500	0,5
Thiamphénicol	50	500	0,5
Tiamuline	50	500	0,5
8 hydroxymutiline	50	500	0,5
Valnémuline	50	500	0,5
Rifaximine	60	600	0,6
Triméthoprim	50	500	0,5
Baquiloprim	30	300	0,3
Novobiocine	50	500	0,5
Tulathromycine	25	250	0,25
Neospiramycine	100	1000	1
Spiramycine	100	1000	1
Tilmicosine	50	500	0,5
Erythromycine	40	400	0,4
Tylosine	50	500	0,5
Tylvalosine	25	250	0,25
O-acetyltylosine	25	250	0,25
Josamycine	25	250	0,25
Tildipirosine	40	400	0,4
Gamithromycine	5	50	0,05
Pirlymicine	100	1000	1








Annexe 3 : Mentions de danger

Analytes	Pictogrammes de danger	Code	Mentions de danger
Amoxicilline		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Ampicilline sodique		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Pénicilline G sodique		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Pénicilline V potassique	 	H302 H317 H334	Nocif en cas d'ingestion. Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Oxacilline sodique	 	H315 H317 H319 H334 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.
Cloxacilline sodique	 	H315 H317 H319 H334 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.
Nafcilline sodique	 	H315 H317 H319 H334 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.
Dicloxacilline sodique	 	H315 H317 H319 H334 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.
Céfapirine sodique	 	H315 H317 H319 H334 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.
Désacétylcéfapirine sodique	 	H315 H317 H319 H334 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.

Céfazoline sodique		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Céfalexine hydrate		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Céfopérazone sodique		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Ceftiofur		H300	Mortel en cas d'ingestion
Céfuroxime		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Sulfaguanidine		H315 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Sulfadiazine sodique*		H302 H315 H317 H319 H334 H335	Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.
Sulfathiazole		H315 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Sulfaméthoxypyridazine		H315 H318 H335	Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves. Peut irriter les voies respiratoires.
Sulfamonométhoxine		H315 H317 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Sulfadoxine		H315 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Sulfaquinoxaline		H302 H317 H334	Nocif en cas d'ingestion Peut provoquer une allergie cutanée Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Sulfadiméthoxine		H315 H317 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Dapsone		H302	Nocif en cas d'ingestion
Sulfaméthoxazole		H315 H317 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Sulfamérazine		H315 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.

Sulfaméthizole		H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
Sulfachloropyridazine		H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
Tulathromycine		H317 H319 H412	Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme
Tylosine		H317 H334	Peut provoquer une allergie cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Tylvalosine		H315 H317 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
3-O-acétyltylosine		H315 H317 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Tildipirosine		H317 H361f H373	Peut provoquer une allergie cutanée. Susceptible de nuire à la fertilité. Risque présumé d'effets graves pour les organes (indiquer tous les organes affectés, s'ils sont connus) à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)
Gamithromycine		H315 H319 H361d	Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus (indiquer l'effet s'il est connu) (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)
Pirlimycine		H315 H318	Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves
Oxytétracycline chlorhydrate		H361d	Susceptible de nuire au fœtus.
Tétracycline chlorhydrate		H361 H411	Susceptible de nuire à la fertilité et au fœtus Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme
Chlortétracycline chlorhydrate		H315 H319 H335	Provoque une irritation cutanée Provoque une sévère irritation des yeux Peut irriter les voies respiratoires

Doxycycline hyclate		H302 H315 H319 H335	Nocif en cas d'ingestion Provoque une irritation cutanée Provoque une sévère irritation des yeux Peut irriter les voies respiratoires
Marbofloxacin		R52/53	Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.
Acide oxolinique		H302	Nocif en cas d'ingestion
Acide nalidixique sodique		H302	Nocif en cas d'ingestion
Tiamuline	 	H317 H319 H410	Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme
Baquiloprim		H302 H315 H319 H335	Nocif en cas d'ingestion Provoque une irritation cutanée Provoque une sévère irritation des yeux Peut irriter les voies respiratoires
Novobiocine		H317 H319	Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux.

REACTIFS	Pictogrammes de danger	Code	Mentions de danger
Acétonitrile	 	H225 H302 H312 H319 H332	Liquide et vapeurs très inflammables Nocif en cas d'ingestion Nocif par contact cutané Provoque une sévère irritation des yeux Nocif par inhalation
Méthanol	  	H225 H331 H311 H301 H370	Liquide et vapeurs très inflammables Toxique par inhalation Toxique par contact cutané Toxique en cas d'ingestion Risque avéré d'effets graves pour les organes (ou indiquer tous les organes affectés, s'ils sont connus) (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)
Acide heptafluorobutyrique		H314	Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires
Acide Pentafluoropropionique		H314	Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires.

Les analytes et les réactifs présents dans la méthode et non notés dans ces tableaux ne représentent aucun danger.

Annexe 4 « Muscle » : Feuille de décision d'envoi en confirmation pour la matrice muscle et produits d'aquaculture

[illegible]

46 / 54

Annexe 4 « Lait » : Feuille de décision d'envoi en confirmation pour la matrice lait

GROUPE A		
Analyte	C _{val} (µg/kg)	Envoi en confirmation si :
Amoxicilline	4	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Penicilline G	4	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Penicilline V	4	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Oxacilline	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Cloxacilline	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Nafcilline	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Dicloxacilline	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Céphapirine	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Désacétylcéphapirine	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{10} C_{val}$
Cefquinome	20	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Céphalonium	20	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Céfazoline	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Céphalexine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Ceftiofur	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Desfuroyleftiofur disulfide (DCCD)	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Céfopérazone	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Céfuroxime	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Céfaclor	125	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfaguanidine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfadiazine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfathiazole	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfadimérazine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfaméthoxy-pyridazine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfamonométhoxine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfadoxine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfaquinoxaline	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfadiméthoxine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfanilamide	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfacétamide	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfaméthoxazole	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfamérazine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfaméthizole	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfachloropyridazine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Dapsone	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sulfachlozine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Oxytétracycline	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Tétracycline	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Chlortétracycline	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Doxycycline	10	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$

GROUPE B		
Analyte	C _{val} (µg/kg)	Envoi en confirmation si :
Ampicilline	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Lincomycine	150	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Marbofloxacine	75	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Norfloxacine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Ciprofloxacine	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Danofloxacine	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Enrofloxacine	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Sarafloxacine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Difloxacine	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Acide oxolinique	10	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Acide nalidixique	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Flumequine	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Florfenicol	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Florfenicol amine	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Thiamphénicol	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Tiamuline	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{10} C_{val}$
8 hydroxymutiline	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Valnemuline	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{10} C_{val}$
Rifaximine	60	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Triméthoprim	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Baquioprim	30	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Novobiocine	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Tulathromycine	25	[] $I_{estimée} > \frac{1}{10} C_{val}$
Neospiramycine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Spiramycine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Tilmicosine	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Erythromycine	40	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Tylosine	50	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Tylosine	25	[] $I_{estimée} > \frac{1}{10} C_{val}$
0-acétyltylosine	25	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Josamycine	25	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Tildipirosine	40	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Gamithromycine	5	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$
Pirymicine	100	[] $I_{estimée} > \frac{1}{2} C_{val}$

Annexe 5 a: performances de la méthode pour le muscle d'animaux de boucherie

	Analyte	Cval (µg/kg)	LOD (Transition (1) ou (2))	CVr %	CCβ transi 1	Sensibilité à Cval	CCβ transi 2	Sensibilité à Cval
G R O U P E A	PENICILLINES							
	Amoxicilline	50	3 (3)	54,6	> Cval	3	> Cval	86
	Amoxicilline (transi 3)	50	/	/	< Cval (transi 3)	98 (transi 3)	/	/
	Ampicilline	50	≤ 1 (1)	38,4	< Cval	100	< Cval	100
	Penicilline G	50	≤ 1 (1)	37,6	< Cval	100	< Cval	100
	Penicilline V	25	≤ 1 (1)	38,6	< Cval	98	> Cval	70
	Oxacilline	300	≤ 1 (2)	29,4	< Cval	98	< Cval	100
	Cloxacilline	300	≤ 1 (1)	28,2	< Cval	100	< Cval	100
	Nafcilline	300	≤ 1 (1)	29,5	< Cval	100	< Cval	100
	Dicloxacilline	300	≤ 1 (1)	25,7	< Cval	100	< Cval	100
	CEPHALOSPORINES							
	Cephapirine	50	4 (1)	79,4	> Cval	94	> Cval	83
	Désacétylcéphapirine	50	9 (2)	38,9	> Cval	89	< Cval	100
	Cefquinome	50	≤ 1 (1)	25,3	< Cval	100	< Cval	100
	Cephalonium	50	≤ 1 (1)	33,7	< Cval	100	< Cval	100
	Cefazoline	50	4 (1)	29,8	< Cval	100	< Cval	100
	Cephalexine	200	≤ 1 (1)	40,8	< Cval	100	< Cval	100
	Ceftiofur	100	≤ 1 (1)	31,7	< Cval	100	< Cval	100
	Desfuroyceftiofur	100	25 (1)	46,5	> Cval	94	> Cval	87
	Cefoperazone	50	≤ 1 (1)	42,0	> Cval	100	< Cval	100
	Céfuroxime	50	8 (1)	39,4	< Cval	100	< Cval	100
	SULFAMIDES							
	Sulfaguanidine	100	4 (2)	37,5	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfadiazine	100	≤ 1 (1)	51,4	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfathiazole	100	2 (2)	38,9	> Cval	95	< Cval	100
	Sulfadimerazine	100	≤ 1 (1)	34,1	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfamethoxypyridazine	100	≤ 1 (1)	37,6	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfamonomethoxine	100	≤ 1 (1)	38,0	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfadoxine	100	≤ 1 (1)	29,3	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfaquinoxaline	100	≤ 1 (1)	33,5	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfadimethoxine	100	≤ 1 (1)	27,5	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfanilamide	100	38 (2)	49,8	> Cval	40	< Cval	100
	Sulfacétamide	100	4 (1)	52,6	< Cval	100	> Cval	100
	Sulfaméthoxazole	100	≤ 1 (1)	32,4	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfamérazine	100	2 (2)	40,4	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfaméthizole	100	≤ 1 (1)	34,0	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfachloropyridazine	100	≤ 1 (1)	30,6	< Cval	100	< Cval	100
	Dapsone	50	≤ 1 (1)	41,3	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfaclozine	100	2 (1)	29,2	< Cval	100	< Cval	100
	TETRACYCLINES							
	Oxytetracycline	100	≤ 1 (1)	32,9	< Cval	100	< Cval	100
	Tetracycline	100	≤ 1 (1)	29,9	< Cval	100	< Cval	100
	Chlortetracycline	100	≤ 1 (1)	41,0	< Cval	100	< Cval	100
	Doxycvline	100	≤ 1 (1)	25,7	< Cval	100	< Cval	100

	Analyte	Cval (µg/kg)	LOD (Transition (1) ou (2))	CVr %	CCβ transi 1	Sensibilité à Cval	CCβ transi 2	Sensibilité à Cval
G R O U P E B	MACROLIDES ET APPARENTES (LINCOSAMIDES)							
	Tulathromycine	50	≤ 1 (1)	44,8	< Cval	100	< Cval	100
	Tulathromycine marqueur	25	≤ 1 (1)	32,1	< Cval	98	< Cval	98
	Neospiramycine	100	≤ 1 (1)	53,0	> Cval	100	> Cval	83
	Spiramycine	100	≤ 1 (1)	37,2	< Cval	100	> Cval	100
	Tilmicosine	50	≤ 1 (1)	33,2	< Cval	98	< Cval	98
	Erythromycine	200	3 (2)	40,3	< Cval	98	< Cval	98
	Tylosine	100	≤ 1 (1)	44,8	< Cval	98	< Cval	98
	Tylvalosine	25	≤ 1 (1)	40,5	< Cval	98	< Cval	98
	O-acetyltylosine	25	≤ 1 (1)	42,6	< Cval	98	< Cval	98
	Josamycine	50	≤ 1 (1)	33,8	< Cval	98	< Cval	98
	Tildipirosine	400	≤ 1 (1)	24,6	< Cval	100	< Cval	100
	Gamythromycine	50	≤ 1 (1)	31,3	< Cval	98	< Cval	98
	Pirlymicine	100	≤ 1 (1)	37,7	< Cval	100	< Cval	100
	Lincomycine	100	5 (2)	53,9	< Cval	97	> Cval	97
	QUINOLONES							
	Marbofloxacin	150	≤ 1 (2)	33,7	< Cval	97	< Cval	98
	Norfloxacin	100	≤ 1 (1)	35,4	< Cval	98	< Cval	100
	Ciprofloxacin	50	≤ 1 (1)	31,5	< Cval	98	< Cval	100
	Danofloxacin	100	≤ 1 (1)	31,6	< Cval	98	< Cval	100
	Enrofloxacin	50	≤ 1 (1)	27,4	< Cval	100	< Cval	98
	Sarafloxacin	100	≤ 1 (1)	28,3	< Cval	98	< Cval	100
	Difloxacin	300	≤ 1 (1)	29,5	< Cval	98	< Cval	98
	Acide oxolinique	100	≤ 1 (1)	19,2	< Cval	100	< Cval	98
	Acide nalidixique	50	≤ 1 (1)	19,9	< Cval	98	< Cval	98
	Flumequine	200	≤ 1 (1)	17,3	< Cval	98	< Cval	98
	PHENICOLES							
	Florfenicol amine	100	2 (2)	35,7	< Cval	98	< Cval	98
	Florfenicol	100	≤ 1 (1)	27,5	< Cval	98	< Cval	100
	Thiamphénicol	50	3 (2)	38,1	> Cval	38	> Cval	97
	PLEUROMUTILINES							
	Tiamuline	100	≤ 1 (1)	28,4	< Cval	98	< Cval	98
	8 hydroxymutiline	100	6 (2)	35,0	> Cval	97	> Cval	100
	Valnémuline	50	≤ 1 (1)	50,8	> Cval	98	> Cval	95
	RIFAMICINE							
	Rifaximine	50	≤ 1 (1)	43,6	< Cval	97	< Cval	97
DERIVES DIAMINOPYRIMIDIQUES								
Triméthoprim	50	≤ 1 (1)	40,0	< Cval	98	< Cval	98	
Baquiloprim	50	≤ 1 (1)	90,4	> Cval	98	> Cval	98	
DIVERS								
Novobiocine	50	≤ 1 (1)	39,6	< Cval	98	< Cval	97	

La sensibilité est évaluée en pourcentage par le rapport d'échantillons détectés positifs sur le nombre d'échantillons supplémentés (Sensibilité = nombre de vrai positif / nombre d'échantillons supplémentés x 100).

Annexe 5 b : performances de la méthode pour le muscle de produits d'aquaculture

	Analyte	Cval (µg/kg)	LOD (Transi(1) ou (2))	CVr (%)	CCβ Transi 1	Sensibilité à Cval	CCβ Transi 2	Sensibilité à Cval
PENICILLINES								
	Amoxicilline	50	≤ 1 (3)	19,6	< Cval	100	< Cval	100
	Amoxicilline (Transi 3)	50	/	/	< Cval (transi3)	100 (transi3)	/	/
	Ampicilline	50	≤ 1 (1)	16,1	< Cval	100	< Cval	100
	Penicilline G	50	≤ 1 (1)	19,5	< Cval	100	< Cval	100
	Penicilline V	25	≤ 1 (1)	23,4	< Cval	100	< Cval	100
	Oxacilline	300	≤ 1 (2)	22,7	< Cval	100	< Cval	100
	Cloxacilline	300	≤ 1 (1)	26,4	< Cval	100	< Cval	100
	Nafcilline	300	≤ 1 (1)	28,0	< Cval	100	< Cval	100
	Dicloxacilline	300	≤ 1 (1)	37,8	< Cval	100	< Cval	100
CEPHALOSPORINES								
	Cephapirine	50	3 (1)	13,7	< Cval	100	< Cval	100
	Désacétylcéphapirine	50	5 (5)	14,4	< Cval	100	< Cval	100
	Cefquinome	50	≤ 1 (1)	15,1	< Cval	100	< Cval	100
	Cephalonium	50	≤ 1 (1)	13,9	< Cval	100	< Cval	100
	Cefazoline	50	≤ 1 (1)	13,1	< Cval	100	< Cval	100
	Cephalexine	200	≤ 1 (1)	21,3	< Cval	100	< Cval	100
	Ceftiofur	100	≤ 1 (1)	18,9	< Cval	100	< Cval	100
G	Desfuroycefiofur	100	15 (1)	40,2	< Cval	100	> Cval	100
R	Cefoperazone	50	≤ 1 (1)	8,7	< Cval	100	< Cval	100
O	Céfuroxime	50	3 (1)	12,1	< Cval	100	< Cval	100
SULFAMIDES								
P	Sulfaguandine	100	6 (1)	36,2	< Cval	100	< Cval	100
E	Sulfadiazine	100	≤ 1 (1)	18,5	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfathiazole	100	≤ 1 (2)	11,0	> Cval	100	< Cval	100
A	Sulfadimerazine	100	≤ 1 (2)	33,0	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfamethoxypyridazine	100	≤ 1 (1)	26,4	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfamonomethoxine	100	≤ 1 (1)	13,4	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfadoxine	100	≤ 1 (1)	24,7	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfaquinoxaline	100	≤ 1 (1)	26,4	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfadimethoxine	100	≤ 1 (1)	26,0	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfanilamide	100	7 (2)	85,0	> Cval	4	< Cval	100
	Sulfacétamide	100	≤ 1 (2)	7,5	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfaméthoxazole	100	≤ 1 (1)	11,7	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfamérazine	100	2 (1)	21,3	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfaméthizole	100	≤ 1 (1)	8,0	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfachloropyridazine	100	≤ 1 (1)	11,1	< Cval	100	< Cval	100
	Dapsone	50	≤ 1 (1)	17,1	< Cval	100	< Cval	100
	Sulfaclozine	100	≤ 1 (2)	10,4	< Cval	100	< Cval	100
TETRACYCLINES								
	Oxytetracycline	100	3 (1)	28,4	< Cval	100	< Cval	96
	Tetracycline	100	≤ 1 (1)	28,1	< Cval	100	< Cval	100
	Chlortetracycline	100	≤ 1 (1)	35,9	< Cval	100	< Cval	100
	Doxycycline	100	≤ 1 (1)	25,5	< Cval	100	< Cval	100

	Analyte	Cval (µg/kg)	LOD (Transi(1) ou (2))	CvR (%)	CCβ Transi 1	Sensibilité à Cval	CCβ Transi 2	Sensibilité à Cval
G R O U P E B	MACROLIDES ET APPARENTES (LINCOSAMIDES)							
	Tulathromycine	50	≤ 1 (2)	116,4	> Cval	96	> Cval	100
	Tulathromycine marqueur	50	≤ 1 (1)	45,4	< Cval	100	< Cval	100
	Neospiramycine	100	3 (1)	71,1	> Cval	100	> Cval	100
	Spiramycine	100	2 (1)	83,0	> Cval	100	> Cval	100
	Tilmicosine	50	≤ 1 (1)	66,6	> Cval	100	> Cval	100
	Erythromycine	200	1 (2)	59,8	< Cval	100	< Cval	100
	Tylosine	100	1 (1)	73,6	> Cval	100	> Cval	100
	Tylvalosine	25	6 (1)	109,9	> Cval	96	> Cval	89
	O-acetyltylosine	25	2 (1)	73,5	> Cval	100	> Cval	100
	Josamycine	50	≤ 1 (1)	76,6	> Cval	100	> Cval	100
	Tildipirosine	400	42 (1)	59,6	> Cval	96	> Cval	96
	Gamythromycine	50	≤ 1 (1)	55,6	< Cval	100	< Cval	100
	Pirlimycine	100	≤ 1 (1)	66,0	> Cval	100	> Cval	100
	Lincomycine	100	≤ 1 (1)	24,9	< Cval	100	< Cval	100
	QUINOLONES							
	Marbofloxacin	150	≤ 1 (1)	14,3	< Cval	100	< Cval	100
	Norfloxacin	100	≤ 1 (1)	18,2	< Cval	100	< Cval	100
	Ciprofloxacin	50	≤ 1 (1)	17,7	< Cval	100	< Cval	100
	Danofloxacin	100	≤ 1 (1)	16,4	< Cval	100	< Cval	100
	Enrofloxacin	50	≤ 1 (1)	13,9	< Cval	100	< Cval	100
	Sarafloxacin	30	≤ 1 (1)	17,5	< Cval	100	< Cval	100
	Difloxacin	300	≤ 1 (1)	13,2	< Cval	100	< Cval	100
	Acide oxolinique	100	≤ 1 (1)	8,7	< Cval	100	< Cval	100
	Acide nalidixique	50	≤ 1 (1)	11,9	< Cval	100	< Cval	100
	Flumequine	200	≤ 1 (1)	21,9	< Cval	100	< Cval	100
	PHENICOLES							
	Florfenicol amine	100	≤ 1 (2)	16,5	< Cval	100	> Cval	100
	Florfenicol	100	≤ 1 (2)	13,4	< Cval	100	< Cval	100
	Thiamphénicol	50	≤ 1 (2)	24,9	> Cval	11	< Cval	100
	PLEUROMUTILINES							
	Tiamuline	100	≤ 1 (1)	60,6	> Cval	100	> Cval	100
	8 hydroxymutiline	100	2 (1)	9,1	< Cval	100	< Cval	100
	Valnémuline	50	≤ 1 (1)	137,1	> Cval	100	> Cval	100
	RIFAMICINE							
	Rifaximine	50	≤ 1 (1)	69,0	> Cval	100	> Cval	100
	DERIVES DIAMINOPYRIMIDIQUES							
	Triméthoprim	50	≤ 1 (1)	27,6	< Cval	100	< Cval	100
	Baquioprim	50	6 (1)	36,5	< Cval	100	> Cval	96
	DIVERS							
	Novobiocine	50	≤ 1 (1)	68,3	> Cval	100	> Cval	100

La sensibilité est évaluée en pourcentage par le rapport d'échantillons détectés positifs sur le nombre d'échantillons supplémentés (Sensibilité = nombre de vrai positif / nombre d'échantillons supplémentés x 100)

Annexe 5 c : performances de la méthode pour le lait

				Transition 1						
Analyte	Cval (µg/kg)	Tr (min)	LD transition (1) ou (2) (3)	Sensibilité (%)			CCβ (µg/kg)	CVr (%)		
				Niv 0,1	Niv 0,5	Niv 1		Niv 0,1	Niv 0,5	Niv 1
PENICILLINES										
Pénicilline G	4	5,4	2 (1)	100	100	100	≤ 0,4	11	8	12
Ampicilline	4	6,5	2 (1)	100	100	100	≤ 0,4	28	16	14
Pénicilline V	4	8,7	2 (1)	95	100	100	≤ 0,4	28	7	12
Amoxicilline	4	8,9	2 (1)	90	100	100	≤ 2,0	47	17	14
Oxacilline	30	9,1	12 (1)	100	100	100	≤ 3,0	6	6	10
Nafcilline	30	9,3	13 (1)	100	100	100	≤ 3,0	8	6	10
Cloxacilline	30	9,3	12 (2)	100	100	100	≤ 3,0	11	9	12
Dicloxacilline	30	9,6	13 (1)	100	100	100	≤ 3,0	8	6	10
CEPHALOSPORINES										
Céphapirine	30	5,9	13 (1)	100	100	100	≤ 3,0	6	6	10
DAC	30	5,2	17 (2)	90	100	100	≤ 15,0	75	28	22
Cefquinome	20	6,2	8 (1)	100	100	100	≤ 2,0	15	14	17
Céphalonium	20	6,4	9 (1)	100	100	100	≤ 2,0	10	7	11
Céfazoline	50	6,6	22 (1)	100	100	100	≤ 5,0	9	6	11
Céphalexine	100	6,5	39 (1)	100	100	100	≤ 10,0	8	7	11
Ceftiofur	100	8,1	42 (1)	100	100	100	≤ 10,0	9	8	10
DCCD	100	5,8	42 (2)	100	100	100	≤ 10,0	7	9	12
Céfopérazone	50	7,6	23 (1)	100	100	100	≤ 5,0	11	8	12
Céfuroxime	50	7,5	33 (1)	100	100	100	≤ 5,0	16	13	11
Céfacétrile	125	6,1	1 (1)	100	100	100	≤ 12,5	8	7	10
SULFAMIDES										
Sulfaguanidine	100	3,4	33 (1)	100	100	100	≤ 10,0	22	14	13
Sulfadiazine	100	4,8	41 (2)	100	100	100	≤ 10,0	7	5	5
Sulfathiazole	100	5,2	40 (1)	100	100	100	≤ 10,0	10	8	6
Sulfadimérazine	100	5,5	43 (1)	100	100	100	≤ 10,0	9	9	7
Sulfaméthoxypyridazine	100	6,1	45 (1)	100	100	100	≤ 10,0	10	7	6
Sulfamonométhoxine	100	6,8	44 (1)	100	100	100	≤ 10,0	10	11	8
Sulfadoxine	100	7,8	43 (1)	100	100	100	≤ 10,0	10	10	8
Sulfaquinoxaline	100	8,4	37 (1)	100	100	100	≤ 10,0	7	5	3
Sulfadiméthoxine	100	8,4	45 (2)	100	100	100	≤ 10,0	12	9	7
Sulfanilamide	100	3,6	32 (1)	100	100	100	≤ 10,0	9	6	5
Sulfacétamide	100	4,8	42 (2)	100	100	100	≤ 10,0	9	4	5
Sulfaméthoxazole	100	8,1	37 (1)	100	100	100	≤ 10,0	6	4	4
Sulfamérazine	100	5,2	43 (1)	100	100	100	≤ 10,0	11	9	6
Sulfaméthizole	100	6,2	42 (1)	100	100	100	≤ 10,0	16	11	11
Sulfachloropyridazine	100	7,5	44 (2)	100	100	100	≤ 10,0	6	5	5
Dapsone	50	7,2	23 (1)	100	100	100	≤ 5,0	6	8	7
Sulfaclozine	100	8,5	36 (2)	100	100	100	≤ 10,0	8	6	6
TETRACYCLINES										
Tétracycline	100	6,7	45 (1)	100	100	100	≤ 10,0	13	11	17
Oxytétracycline	100	7,2	43 (2)	100	100	100	≤ 10,0	14	15	17
Chlortétracycline	100	8,1	41 (1)	100	100	100	≤ 10,0	15	19	20
Doxycycline	10	8,1	4 (1)	100	100	100	≤ 1,0	13	10	16

				Transition 1						
Analyte	Cval (µg/kg)	Tr (min)	LD transition (1) ou (2) (3)	Sensibilité (%)			CCβ (µg/kg)	CVR (%)		
				Niv 0,1	Niv 0,5	Niv 1		Niv 0,1	Niv 0,5	Niv 1
MACROLIDES ET APPARENTES (LINCOSAMIDES)										
Lincomycine	150	5,9	63 (2)	100	100	100	≤ 15,0	18	9	13
Tulathromycine	25	7,9	10 (1)	100	100	100	≤ 2,5	39	36	40
Tulathromarqueur	25	6,7	11 (1)	100	100	100	≤ 2,5	23	11	14
Néospiramycine	100	7,8	42 (1)	100	100	100	≤ 10,0	25	26	28
Spiramycine	100	7,9	35 (1)	100	100	100	≤ 10,0	35	21	22
Tilmicosine	50	8,1	19 (1)	100	100	100	≤ 25,0	40	22	27
Erythromycine	40	8,3	16 (1)	100	100	100	≤ 4,0	30	15	15
Tylosine	50	8,3	18 (1)	100	100	100	≤ 5,0	43	18	14
Tylvalosine	25	8,9	10 (1)	62	100	100	≤ 12,5	95	49	28
O-acétyltylosine	25	8,4	9 (1)	100	100	100	≤ 2,5	43	11	11
Josamycine	25	8,7	10 (1)	100	100	100	≤ 2,5	39	19	18
Tildipirosine	40	7,3	16 (1)	100	100	100	≤ 4,0	41	18	21
Gamithromycine	5	8,1	2 (1)	100	100	100	≤ 0,5	41	16	13
Pirlymicine	100	7,9	38 (1)	100	100	100	≤ 10,0	21	11	12
QUINOLONES										
Marbofloxacin	75	6,6	30 (1)	100	100	100	≤ 7,5	18	5	11
Norfloxacin	100	6,6	43 (1)	100	100	100	≤ 10,0	21	8	13
Ciprofloxacin	50	6,7	22 (1)	100	100	100	≤ 5,0	19	7	12
Danofloxacin	30	6,9	14 (1)	100	100	100	≤ 3,0	18	9	13
Enrofloxacin	50	7,2	22 (2)	100	100	100	≤ 5,0	20	10	14
Sarafloxacin	100	7,9	35 (1)	100	100	100	≤ 10,0	33	15	11
Difloxacin	30	8,0	11 (2)	100	100	100	≤ 3,0	21	12	17
Acide Oxolinique	10	8,3	4 (1)	100	100	100	≤ 1,0	16	7	8
Acide Nalidixique	100	9,0	44 (1)	100	100	100	≤ 10,0	31	12	14
Fluméquine	50	9,0	22 (1)	100	100	100	≤ 5,0	18	8	12
PHENICOLES										
Florfenicol	50	8,1	22 (1)	100	100	100	≤ 5,0	30	12	13
Florfenicol Amine	50	4,8	20 (2)	100	100	100	≤ 5,0	16	6	10
Thiamphénicol	50	6,1	21 (2)	24	100	100	≤ 25,0	121	10	13
PLEUROMUTILINES										
Tiamuline	50	8,6	21 (1)	95	100	100	≤ 5,0	60	30	27
8-Hydroxymutiline	50	7,8	22 (1)	100	100	100	≤ 5,0	26	11	13
Valnémuline	50	8,7	18 (1)	100	95	100	≤ 5,0	39	37	36
RIFAMICINE										
Rifaximine	60	9,8	20 (1)	100	100	100	≤ 6,0	40	37	36
DERIVES DIAMINOPYRIMIDIQUES										
Trimethoprim	50	6,7	22 (1)	100	100	100	≤ 5,0	22	8	12
Baquioprim	30	6,0	13 (1)	100	95	100	≤ 3,0	74	30	28
DIVERS										
Novobiocine	50	11,3	12 (1)	100	100	100	≤ 5,0	18	11	15

11 Bibliographie

Bogialli, S. and A. Di Corcia (2009). "Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin." Analytical and Bioanalytical Chemistry 395(4): 947-966.

Dubreil, E., Gautier, S., Fourmond, M.P., Bessiral, M., Gaugain, M., Verdon, E., Pessel, D. (2017). "Validation approach for a fast and simple targeted screening method for 75 antibiotics in meat and aquaculture products using LC-MS/MS". Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 34, 453-468.

Freitas, A., J. Barbosa, et al. (2013). "Development and validation of a multi-residue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk." International Dairy Journal 33(1): 38-43.

Gaugain-Juhel, M., B. Delépine, et al. (2009). "Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: A qualitative approach." Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 26(11): 1459-1471.

Stolker, A. A. M., P. Rutgers, et al. (2008). "Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS." Analytical and Bioanalytical Chemistry 391(6): 2309-2322.