
**Microbiologie des aliments — Protocole
pour la validation des méthodes
alternatives**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the
validation of alternative methods*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16140:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16140:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003>

© ISO 2003

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 16140 a été élaborée par le Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Tout au long du texte du présent document, lire «la présente Norme européenne ...» avec le sens de «... la présente Norme internationale...».

Sommaire

Avant-propos	vi
Introduction	vii
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principes généraux de la validation et de la certification des méthodes alternatives	3
5 Méthodes qualitatives – Protocole technique de validation	5
6 Méthodes quantitatives – Protocole technique de validation	18
Annexe A (normative) Règles spécifiques relatives à l'acceptation de résultats externes obtenus dans le cadre d'un programme de validation antérieur	38
Annexe B (informative) Classification des types d'échantillons pour les études de validation	40
Annexe C (normative) Utilisation d'échantillons naturellement contaminés et préparation d'échantillons artificiellement contaminés dans les études de validation	43
Annexe D (normative) Duplication des échantillons pour la détermination de l'exactitude relative et du niveau de détection relatif des méthodes qualitatives	45
Annexe E (normative) Calcul des intervalles de confiance associés au nombre d'échantillons soumis à essai	47
Annexe F (normative) Essai utilisé pour l'examen des résultats discordants	48
Annexe G (normative) Aspects à prendre en compte lors du choix des souches pour établir la sélectivité	49
Annexe H (normative) Lignes directrices relatives à l'organisation et à la gestion des études collaboratives	51
Annexe I (normative) Détermination de l'absence de l'analyte cible dans les témoins négatifs	54
Annexe J (normative) Réplication des échantillons pour les études interlaboratoires des méthodes qualitatives	55
Annexe K (normative) Examen des données	57
Annexe L (informative) Etude interlaboratoire de méthodes qualitatives : critères d'accord, de concordance et de ratio de chances de concordance	58
Annexe M (normative) Réplication des échantillons pour la détermination de l'exactitude relative des méthodes quantitatives	64

Annexe N (normative) Exemples de répartitions acceptables et inacceptables et domaines de mesures pour l'estimation de la droite de régression dans le cadre des méthodes quantitatives	66
Annexe O (normative) Evaluation de la linéarité des méthodes quantitatives par représentation graphique	68
Annexe P (normative) Limites de détection et de quantification des dénombrements	69
Annexe Q (normative) Estimateur robuste de la dispersion sur la base de la médiane récursive S_n de Rousseeuw [6]	71
Annexe R (normative) Calculs avec la méthode de régression	72
Annexe S (normative) Exemples de calculs pour les méthodes quantitatives	78
Annexe T (normative) Etude collaborative - Résultats d'essai circulaire avec réplicats	83
Annexe U (informative) Liste des symboles	84
Bibliographie	85

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16140:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003>

Avant-propos

Le présent document (EN ISO 16140:2003) a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 275 "Analyse des produits alimentaires - Méthodes horizontales", dont le secrétariat est tenu par le DIN, en collaboration avec le Comité Technique ISO/TC 34 "Produits alimentaires".

Cette Norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en novembre 2003, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en novembre 2003.

Les annexes A, C à K et M à T sont normatives. Les annexes B, L et U sont informatives.

La présente norme européenne contient également une bibliographie.

Selon le Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, les instituts de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette Norme européenne en application : Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Portugal, République Tchèque, Royaume-Uni, Slovaquie, Suède et Suisse.

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 16140:2003
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003>

Introduction

Le besoin que connaît l'industrie alimentaire d'évaluer rapidement la qualité microbiologique des produits bruts, des produits finis et l'état microbiologique des méthodes de fabrication (procédé de fabrication et environnement), a mené à l'élaboration et au perfectionnement des méthodes d'analyse microbiologiques alternatives plus rapides et plus faciles à réaliser que la méthode de référence correspondante. Certaines méthodes peuvent même être automatisées.

Certaines méthodes alternatives peuvent aboutir à des résultats identiques à ceux obtenus avec la méthode de référence. D'autres en revanche peuvent aboutir à des résultats sensiblement différents.

Les fournisseurs / producteurs des méthodes alternatives, l'industrie des aliments et des boissons, les services de santé publique et les autorités compétentes en matière d'agriculture ont besoin d'un protocole commun et fiable permettant de valider ces méthodes alternatives. Les données obtenues peuvent également constituer la base de la certification d'une méthode par un organisme indépendant.

La longueur de l'étude comparative des méthodes décrite ci-après à l'usage des laboratoires organisateurs, rend parfois le présent document peu pratique pour un usage par un laboratoire individuel en vue de la mise en place d'une validation interne de méthode alternative.

[ISO 16140:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16140:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003>

1 Domaine d'application

Le présent document établit le principe général ainsi que le protocole technique de validation des méthodes alternatives dans le domaine de l'analyse microbiologique des aliments, des produits alimentaires pour animaux, et des échantillons environnementaux et vétérinaires (5.1.1.2.1) en vue de :

- la validation des méthodes alternatives pouvant être utilisées en particulier dans le cadre du contrôle officiel ;
- l'acceptation internationale des résultats obtenus avec la méthode alternative.

Elle établit également les principes généraux régissant la certification de ces méthodes alternatives, sur la base du protocole de validation défini dans le présent document (voir 4.2).

Lorsqu'une méthode alternative est utilisée de façon routinière en laboratoire sans qu'il soit nécessaire de répondre à des critères extérieurs (plus exigeants) en matière d'assurance qualité, une validation comparative de la méthode alternative moins restrictive que ce que prévoit la présente norme peut convenir.

2 Références normatives

[ISO 16140:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fc83e535-62ac-4083-8be8-54d7c90c6c75/iso-16140-2003>

Cette Norme européenne comporte par référence datée ou non datée des dispositions d'autres publications. Ces références normatives sont citées aux endroits appropriés dans le texte et les publications sont énumérées ci-après. Pour les références datées, les amendements ou révisions ultérieurs de l'une quelconque de ces publications ne s'appliquent à cette norme que s'ils y ont été incorporés par amendement ou révision. Pour les références non datées, la dernière édition de la publication à laquelle il est fait référence s'applique (y compris les amendements).

ISO 3534-1, *Statistiques – Vocabulaire et symboles – Partie 1 : Probabilité et termes statistiques généraux.*

ISO 5725, *Application de la statistique – Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure.*

3 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente Norme européenne, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

méthode alternative

méthode d'analyse permettant de déterminer ou d'estimer, pour une catégorie de produits donnée, le même analyte (3.4) que celui mesuré avec la méthode de référence correspondante (3.2).

NOTE 1 La méthode peut être breveté ou non. Il n'est pas nécessaire qu'elle couvre l'intégralité du mode opératoire d'analyse, c'est-à-dire de la préparation des échantillons à la rédaction du rapport d'essai.

NOTE 2 Une méthode alternative se caractérise par des propriétés adaptées aux besoins des utilisateurs, par exemple :

- la vitesse d'analyse et/ou de réponse ;
- la facilité de réalisation et/ou d'automatisation ;
- les propriétés analytiques (fidélité, exactitude, limite de détection, etc.) ;
- la miniaturisation ;
- la réduction des coûts.

STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

NOTE 3 L'adjectif « alternatif » se réfère à la totalité du « mode opératoire d'analyse et du système de réaction ». Ce terme recouvre tous les éléments nécessaires à la mise en œuvre de la méthode, qu'ils soient matériels ou autre.

3.2

méthode de référence

méthode reconnue internationalement et largement acceptée.

NOTE Pour les besoins de la présente norme, il s'agit des méthodes ISO et CEN, et si elles n'existent pas, de certaines normes nationales de niveau équivalent.

3.3

validation d'une méthode alternative

démonstration selon laquelle ladite méthode apporte un niveau de confiance approprié, sur le fait que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence

NOTE Le mot « comparable » est défini dans le présent document par un protocole technique adapté à chaque type de méthode (voir articles 5 et 6).

3.4

analyte

composant mesuré à l'aide de la méthode d'analyse. Il peut s'agir de microorganismes

3.5**méthode qualitative**

méthode d'analyse dont la réponse est soit la présence, soit l'absence de l'analyte (3.4) détecté soit directement soit indirectement dans une quantité d'échantillon donnée

3.6**méthode quantitative**

méthode d'analyse dont la réponse est la quantité de l'analyte (3.4) mesurée soit directement (dénombrement, masse ou volume), soit indirectement (absorption colorimétrique, impédance, etc.) dans une quantité d'échantillon donnée

3.7**étude comparative des méthodes**

étude réalisée par le laboratoire organisateur consistant à comparer la méthode alternative à la méthode de référence

3.8**étude interlaboratoire**

validation des performances de la méthode par l'analyse d'échantillons courants dans plusieurs laboratoires et sous le contrôle du laboratoire organisateur

3.9**laboratoire organisateur**

laboratoire ayant l'expérience et les capacités nécessaires pour réaliser l'étude comparative des méthodes et organiser l'étude interlaboratoire

NOTE

La présence d'un statisticien expérimenté est essentielle pour l'analyse des résultats.

4 Principes généraux de la validation et de la certification des méthodes alternatives

4.1 Protocole de validation

Le protocole de validation comprend deux étapes :

- une étude comparative (3.7) de la méthode alternative (3.1) par rapport à la méthode de référence (3.2), réalisée au sein du laboratoire organisateur ;
- une étude interlaboratoire (3.8) de chacune des deux méthodes.

Si nécessaire, ces deux phases peuvent être menées en parallèle.

Les règles techniques de réalisation de l'étude comparative des méthodes et de l'étude interlaboratoire sont données en 5 et 6, en fonction de la nature qualitative ou quantitative de la méthode alternative.

Si la méthode alternative a déjà été préalablement validée et si elle est conforme aux exigences requises par un autre organisme, des règles spécifiques sont définies en annexe A afin de tenir compte des résultats de cette validation antérieure.

4.2 Principes de la certification

4.2.1 Lorsqu'une certification ultérieure de la méthode alternative est nécessaire, les deux principes suivants doivent également être appliqués (en sus de 4.1).

Les détails concernant l'organisation de la certification (déroulement de l'étude comparative des méthodes et de l'étude interlaboratoire, l'ensemble des différents participants incluant le laboratoire expert – désigné dans la présente norme sous le nom de laboratoire organisateur, les auditeurs, l'organisme de certification, etc.) sont donnés par l'organisme de certification [8].

4.2.2 Le fabricant doit appliquer un **système qualité** couvrant la ligne de production du produit à certifier, et reposant sur la norme européenne appropriée en matière de systèmes qualité ou sur une norme internationale équivalente (par exemple EN ISO 9001).

Pour accorder la certification, l'organisme de certification doit tenir compte de l'existence éventuelle de tout certificat de système de qualité délivré par un organisme de certification agréé pour les systèmes qualité.

4.2.3 Une **vérification régulière** de la qualité de la méthode certifiée doit être effectuée après que la certification a été délivrée. Un audit doit être réalisé régulièrement pour vérifier que les exigences suivantes sont respectées :

- les exigences relatives à l'assurance qualité (voir 4.2.1) ;
- les exigences relatives au contrôle de la production du produit (voir 4.2.1).

En plus des exigences générales en matière de système qualité relatives à la norme européenne ou internationale appropriée, le fabricant soumet régulièrement à l'organisme de certification une documentation mise à jour qui tient compte des modifications apportées au produit ou au processus de fabrication, modifications susceptibles d'influer sur les instructions relatives à l'utilisation de la méthode et/ou aux performances de cette dernière. L'organisme de certification décide alors si ces modifications affectent la certification.

5 Méthodes qualitatives – Protocole technique de validation

5.1 Etude comparative des méthodes

5.1.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

5.1.1.1 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente norme européenne, les termes et définitions suivantes s'appliquent :

5.1.1.1.1 Exactitude relative (AC)

Niveau de correspondance entre la réponse obtenue avec la méthode de référence et la réponse obtenue avec la méthode alternative sur des échantillons identiques¹⁾.(voir en 5.1.1.3.1).

NOTE Le terme de "exactitude relative" utilisé dans ce contexte vient compléter « l'exactitude » et la « justesse » définies dans les ISO 5725-1 et ISO 3534-1. Ces dernières définissent l'exactitude comme « l'écart de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée », et la justesse comme « l'écart de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et la valeur de référence acceptée ». Pour les besoins de la présente norme, la valeur de référence acceptée est choisie comme étant la valeur obtenue par la méthode de référence. Le terme « relatif » implique donc que la méthode de référence ne fournit pas automatiquement la valeur de référence acceptée.

5.1.1.1.2 Déviation positive (PD)

La méthode alternative présente une déviation positive si elle donne un résultat positif lorsque la méthode de référence donne un résultat négatif.

Une déviation positive devient un faux résultat positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est négatif.

Une déviation positive est considérée comme vrai positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif.

5.1.1.1.3 Déviation négative (ND)

La méthode alternative présente une déviation négative si elle donne un résultat négatif lorsque la méthode de référence donne un résultat positif.

Une déviation négative devient un faux résultat négatif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif.

¹⁾ Difficile à réaliser si les étapes de préenrichissement sont différentes.

ISO 16140:2003(F)

5.1.1.1.4 Sensibilité relative (SE)

Capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte lorsque la méthode de référence le détecte (voir 5.1.1.3.1).

5.1.1.1.5 Spécificité relative (SP)

Capacité de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte lorsque la méthode de référence ne le détecte pas. (voir 5.1.1.3.1).

5.1.1.2 Protocole de mesure

5.1.1.2.1 Échantillons d'aliments

Il est très important de trouver des échantillons d'aliments naturellement contaminés par l'analyte à mesurer pour la validation.

Si l'on cherche à valider la méthode pour tous les aliments, étudier 5 catégories d'aliments. Ce nombre peut être ramené à 1, 2, 3 ou 4 catégories si la validation de la méthode alternative est limitée à ces catégories, à la demande du fabricant. Les catégories recommandées sont énumérées en annexe B.

Les échantillons environnementaux peuvent être inclus comme une catégorie. Les échantillons vétérinaires peuvent être traités comme un autre catégorie (voir annexe B).

Il est recommandé que l'origine des échantillons d'aliments soit la plus variée possible afin de limiter les erreurs systématiques liées aux spécialités alimentaires locales et élargir la plage de validation.

Dans le cadre de l'analyse d'échantillons naturellement contaminés, il convient que la plage et la répartition de la contamination des échantillons soient représentatives des niveaux normalement relevés dans ces produits, en se concentrant cependant sur les plus petits nombres.

S'il est impossible de réunir un nombre suffisant d'aliments naturellement contaminés dans chacune des catégories, il est autorisé de recourir à la contamination artificielle d'échantillons d'aliments. Il convient que la méthode et les niveaux de contamination permettent d'obtenir des échantillons dont le comportement soit identique à celui des échantillons naturellement contaminés. Voir les méthodes d'ensemencement et les restrictions en annexe C.

5.1.1.2.2 Nombre d'échantillons

Le nombre total de prises d'essai à analyser est de 60 par catégorie d'aliments choisie dans les catégories proposées en annexe B. Au sein de chaque catégorie, sélectionner des types d'aliments représentatifs et analyser 20 prises d'essai à la fois par la méthode proposée et par la méthode de référence afin d'obtenir au moins 60 résultats par catégorie et par méthode. Les échantillons de types d'aliments naturellement contaminés doivent

être préparés selon le protocole donné en annexe D. Pour les échantillons de types d'aliments artificiellement contaminés, ajuster le niveau des ensemencements afin d'obtenir un taux de récupération positif des prises d'essai analysées par au moins une des méthodes. Le taux de récupération est considéré comme atteint quand un certain nombre de prises d'essai, pas la totalité, est déterminé comme étant positif par l'une ou les deux méthodes (méthode de référence et méthode alternative).

Il est préférable d'obtenir environ 50 % de résultats positifs et 50 % de résultats négatifs. Ceci n'est toutefois qu'une recommandation et non un pourcentage fixe à condition que certaines prises d'essai soient positives et d'autres négatives pour le même type d'aliments.

5.1.1.2.3 Préparation de l'échantillon pour essai

Dans la mesure du possible, les méthodes de référence et alternative doivent être réalisées avec exactement le même échantillon.

Donc, si la première étape des deux méthodes est la même (par exemple même bouillon de préenrichissement), réaliser la réplication lors de la deuxième étape (cas 1, annexe D).

Si tel n'est pas le cas, c'est-à-dire lorsque les premiers milieux de culture, la méthodologie ou les dilutions diffèrent, préparer en double des prises d'essai à analyser. Pour ces types de préparation, il existe deux méthodologies primaires.

Dans le premier cas, mélanger deux fois la masse de l'échantillon à une masse/volume égale d'eau stérilisée ou d'un autre diluant approprié et homogénéiser de façon appropriée. Diviser ensuite l'échantillon en deux parts, en prenant particulièrement soin d'augmenter la concentration de l'enrichissement primaire du milieu (d'environ 10 %) afin de compenser les effets de dilution de l'étape d'homogénéisation (cas 2, annexe D).

Dans le second cas, ensemercer directement le type d'aliment avec une culture de départ suffisante pour permettre un taux de récupération des microorganismes dans les prises d'essai analysées à l'aide d'au moins une des deux méthodes, une fois les microorganismes bien répartis dans le type d'aliment. Peser ensuite 25 g de prise d'essai et suivre le protocole décrit en annexe D. Cette façon de faire peut être préférable pour les produits liquides mais acceptable pour tout autre type d'aliment pour peu que l'aliment ait été convenablement homogénéisé.

5.1.1.3 Calcul et interprétation

5.1.1.3.1 Traitement des données

Répertorier sous forme de tableau les couples de résultats obtenus avec les méthodes alternative et de référence et calculer les paramètres suivants pour chaque catégorie d'aliments (60 échantillons), conformément au Tableau 1.