
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Validation des
méthodes —**

**Partie 2:
Protocole pour la validation de
méthodes alternatives (commerciales)
par rapport à une méthode de
référence**

ISO 16140-2:2016
Microbiology of the food chain — Method validation —
Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary)
methods against a reference method

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16140-2:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b91c0caf-7d2d-4517-aba4-5eb22f58b086/iso-16140-2-2016>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2016, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principes généraux de la validation des méthodes alternatives	1
5 Méthodes qualitatives — Protocole technique de validation	2
5.1 Étude comparative des méthodes.....	2
5.1.1 Considérations générales.....	2
5.1.2 Étude de méthodes appariées ou non appariées.....	2
5.1.3 Étude de sensibilité.....	3
5.1.4 Étude de niveau relatif de détection.....	7
5.1.5 Étude d'inclusivité et étude d'exclusivité.....	9
5.2 Étude interlaboratoires.....	11
5.2.1 Considérations générales.....	11
5.2.2 Protocole de mesure.....	11
5.2.3 Calculs et récapitulatif des données.....	12
5.2.4 Interprétation des données.....	15
6 Méthodes quantitatives — Protocole technique de validation	17
6.1 Étude comparative des méthodes.....	17
6.1.1 Considérations générales.....	17
6.1.2 Étude de justesse relative.....	17
6.1.3 Étude du profil d'exactitude.....	21
6.1.4 Étude de la limite de quantification.....	25
6.1.5 Étude d'inclusivité et étude d'exclusivité.....	26
6.2 Étude interlaboratoires.....	27
6.2.1 Considérations générales.....	27
6.2.2 Protocole de mesure.....	28
6.2.3 Calculs, récapitulatif et interprétation des données.....	29
Annexe A (informative) Classification de types d'échantillon et suggestions de combinaisons cibles pour les études de validation	32
Annexe B (normative) Ordre de préférence pour l'utilisation d'échantillons naturellement et artificiellement contaminés dans les études de validation	48
Annexe C (informative) Protocoles généraux de contamination par mélange et de contamination artificielle d'aliments	49
Annexe D (informative) Modèles de calcul de RLOD en utilisant les données provenant de l'étude comparative des méthodes	52
Annexe E (normative) Aspects à prendre en compte lors du choix des souches pour les études d'inclusivité et d'exclusivité	54
Annexe F (informative) Considérations pour les calculs du niveau de détection relatif (RLOD) entre laboratoires effectués dans le cadre d'une étude interlaboratoires	56
Annexe G (informative) Principe du profil d'exactitude pour la validation de modèles quantitatifs	59
Annexe H (informative) Application du profil d'exactitude dans l'étude comparative des méthodes	61
Annexe I (informative) Exemple d'application du profil d'exactitude pour une étude interlaboratoires	64

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16140-2:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b91c0caf-7d2d-4517-aba4-5eb22f58b086/iso-16140-2-2016>

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: Avant-propos — Informations supplémentaires. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b91c0ca1-7d2d-4517-aba4-5eb22f58b086/iso-16140-2-2016>

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette première édition de l'ISO 16140-2, conjointement avec l'ISO 16140-1, annule et remplace l'ISO 16140:2003. Cette édition constitue une révision technique. Elle incorpore également l'Amendement ISO 16140:2003:Amd.1:2011.

L'ISO 16140 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes*:

- *Partie 1: Vocabulaire*
- *Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence*

Les parties suivantes sont en cours de préparation:

- *Partie 3: Protocole de vérification de méthodes de référence et alternatives validées appliquées dans un laboratoire*
- *Partie 4: Protocole pour la validation de méthodes de laboratoire (internes)*
- *Partie 5: Protocole pour la validation interlaboratoires de méthodes non commerciales par plan factoriel*
- *Partie 6: Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) pour la confirmation microbiologique et le typage*

Introduction

De nombreuses méthodes alternatives, qui sont pour la plupart commerciales, sont actuellement utilisées pour évaluer la qualité microbiologique de matières premières et de produits finis ainsi que l'état microbiologique de l'environnement de production. Ces méthodes sont souvent plus rapides et plus faciles à mettre en œuvre que la méthode normalisée correspondante. Les développeurs, les utilisateurs finaux et les autorités ont besoin d'un protocole commun et fiable permettant de valider ces méthodes alternatives. Les données obtenues fourniront également aux utilisateurs finaux potentiels des données de performance pour une méthode donnée, leur permettant ainsi de faire un choix réfléchi concernant l'adoption d'une méthode particulière. Ces données obtenues peuvent également constituer la base de la certification d'une méthode par un organisme indépendant.

La présente partie de l'ISO 16140:

- vise à fournir un protocole et des lignes directrices spécifiques pour la validation des méthodes commerciales plus rapides et plus faciles à mettre en œuvre que la méthode de référence correspondante,
- peut également être appliquée pour la validation d'autres méthodes non commerciales, utilisées à la place de la méthode de référence,
- vise à remplacer le protocole de validation publié dans la première version de l'ISO 16140 (ISO 16140:2003), et
- est principalement rédigée pour la validation de méthodes permettant de cultiver le micro-organisme cible, mais peut également être appliquée aux méthodes relatives aux micro-organismes non cultivables, notamment les virus (par exemple le norovirus) et les parasites protozoaires (par exemple *Cryptosporidium* ou *Giardia*). Dans ces cas-là, certaines expressions doivent être interprétées pour s'adapter à la situation des organismes non cultivables.

L'application de la présente partie de l'ISO 16140 requiert une expertise des domaines tels que la microbiologie, la réalisation de plans d'expérience et l'analyse statistique, comme indiqué dans les parties respectives. L'expertise statistique comprend un aperçu de la théorie de l'échantillonnage, des plans d'expériences, des analyses statistiques de données microbiologiques (qualitatives et quantitatives) et un aperçu de concepts statistiques relatifs à l'échantillonnage aléatoire, l'hétérogénéité de l'échantillon, la stabilité de l'échantillon, les plans d'expériences et les composantes de la variance.

Lorsque la présente partie de l'ISO 16140 sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les lignes directrices auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes de validation ne peut pas être immédiate. Pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou nationales dont les méthodes ne sont pas conformes à la présente partie de l'ISO 16140, peuvent déjà avoir été publiées. Il y a lieu d'espérer que les révisions de ces normes conduiront à leur modification afin d'être en conformité avec l'ISO 16140 et que, dans le futur, les écarts restants par rapport à la présente partie de l'ISO 16140 seront uniquement des écarts justifiés sur le plan technique. Par exemple, l'ISO 16297[3] traite d'une validation très particulière pour un produit donné (l'état hygiénique des échantillons de lait cru) et conservera son statut de norme verticale en parallèle de l'ISO 16140. Si cette validation est nécessaire, la norme verticale prévaut.

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes —

Partie 2:

Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 16140 établit le principe général ainsi que le protocole technique de validation des méthodes alternatives, qui sont pour la plupart commerciales, dans le domaine de la microbiologie de la chaîne alimentaire. Les études de validation conformément à la présente partie de l'ISO 16140 sont destinées à être effectuées par des organismes impliqués dans la validation de méthode.

La présente partie de l'ISO 16140 est applicable à la validation de méthodes pour l'analyse (détection ou quantification) de micro-organismes présents dans:

- les produits destinés à la consommation humaine,
- les produits destinés à l'alimentation animale,
- les échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de produits alimentaires, et
- les échantillons au stade de la production primaire.

La présente partie de l'ISO 16140 est notamment applicable aux bactéries et aux champignons. Certains paragraphes de la présente partie de l'ISO 16140 peuvent être applicables à d'autres micro-organismes ou à leurs métabolites au cas par cas. À l'avenir, des préconisations concernant d'autres organismes (par exemple, virus et parasites) seront incluses dans la présente partie ou dans une partie distincte de l'ISO 16140.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités en référence de manière normative, en intégralité ou en partie, dans le présent document et sont indispensables pour son application. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 16140-1, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 2: Vocabulaire*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 16140-1 s'appliquent.

4 Principes généraux de la validation des méthodes alternatives

Le protocole de validation comprend deux étapes:

- une étude comparative de la méthode alternative (commerciale) par rapport à la méthode de référence, réalisée au sein du laboratoire organisateur,

- une étude interlaboratoires de la méthode alternative (commerciale) par rapport à la méthode de référence, réalisée au sein de différents laboratoires.

Les règles techniques de réalisation de l'étude comparative des méthodes et de l'étude interlaboratoires sont données dans l'Article 5 et dans l'Article 6, en fonction de la nature qualitative ou quantitative de la méthode alternative (commerciale). Les données obtenues dans certaines parties de l'étude de validation sont évaluées à l'aide des limites d'acceptabilité (AL) et aucune évaluation statistique des données n'est effectuée. Ces AL reposent sur le jugement des experts et sur les données obtenues lors des études de validation existantes.

5 Méthodes qualitatives — Protocole technique de validation

5.1 Étude comparative des méthodes

5.1.1 Considérations générales

L'étude comparative des méthodes est la partie du processus de validation effectuée au sein du laboratoire organisateur. Elle comprend trois parties, à savoir:

- une étude comparative des résultats de la méthode de référence par rapport aux résultats de la méthode alternative des échantillons (naturellement et/ou artificiellement) contaminés (appelée étude de sensibilité),
- une étude comparative permettant de déterminer le niveau de détection relatif (RLOD) dans des échantillons artificiellement contaminés (appelée étude RL0D),
- une étude d'inclusivité/d'exclusivité de la méthode alternative.

Les résultats (tableaux et calculs) des différentes parties et l'interprétation des résultats, y compris des résultats divergents, doivent être consignés dans un rapport d'étude.

La taille des prises d'essai utilisées doit être celle indiquée dans la méthode de référence.

5.1.2 Étude de méthodes appariées ou non appariées

Les méthodes de référence et alternative doivent être réalisées avec, dans la mesure du possible, avec un échantillon exactement identique (même prise d'essai). Cependant, il existe une distinction entre les études dans lesquelles la même prise d'essai peut être utilisée pour la méthode de référence et pour la méthode alternative, puisque les deux méthodes comportent exactement la même étape initiale dans le protocole (d'enrichissement) et les études dans lesquelles deux prises d'essais sont nécessaires afin d'en utiliser une pour la méthode de référence et une pour la méthode alternative (par exemple, en raison de bouillons d'enrichissement différents). Dans le cas où la même prise d'essai est utilisée pour les deux méthodes, les résultats desdites méthodes sont étroitement liés les uns aux autres. Par exemple, pour un échantillon non contaminé, il convient que les deux méthodes aboutissent à un résultat négatif. En raison de cette relation, les données produites par la méthode de référence et la méthode alternative sont nommées «données **appariées**». Dans la présente partie de l'ISO 16140, l'expression «étude de méthodes appariées» sera utilisée pour ce type d'étude.

La situation contraire est également possible lorsque l'étape (d'enrichissement) initiale des méthodes de référence et alternative n'est pas commune. Dans ce cas, deux prises d'essai, prélevées du même lot de produit, doivent être utilisées pour les deux méthodes et les données obtenues sont nommées «données **non appariées**». Dans la présente partie de l'ISO 16140, l'expression «étude de méthodes non appariées» sera utilisée pour ce type d'étude. Le fait d'obtenir une étude de **méthodes appariées** ou **non appariées** dépend des protocoles de la méthode de référence et de la méthode alternative. Si l'étape initiale des protocoles (d'enrichissement) est commune aux deux méthodes, le modèle d'étude de **méthodes appariées** est obligatoire.

Ce paragraphe décrit l'étude comparative des méthodes pour le cas où l'étape initiale du protocole (d'enrichissement) de la méthode de référence et de la méthode alternative est identique (étude de

méthodes **appariées**) et pour le cas contraire (étude de méthodes **non appariées**). Les différences entre ces deux types d'études sont spécifiées dans le texte, lorsque nécessaire.

5.1.3 Étude de sensibilité

L'étude de sensibilité vise à déterminer la différence de sensibilité entre la méthode de référence et la méthode alternative. Cette étude est effectuée en utilisant des échantillons naturellement et/ou artificiellement contaminés. Différents types et catégories doivent être soumis à essai à cette fin. Des limites d'acceptabilité ont été définies pour la différence maximale acceptable en fonction du type d'étude (études de méthodes **appariées**/études de méthodes **non appariées**) et du nombre de catégories soumises à essai.

5.1.3.1 Sélection des catégories devant être utilisées

La sélection des catégories et des types utilisés pour la validation dépendra du type ou du groupe du micro-organisme et du domaine d'application de la validation.

Si la méthode est destinée à être appliquée à une vaste gamme d'aliments, alors au moins cinq catégories d'aliment doivent être étudiées. Le rapport d'étude de validation doit mentionner les catégories d'aliment utilisées dans cette étude. Si la méthode doit être validée pour un nombre limité de catégories d'aliment, par exemple pour les catégories «produits à base de viande prêts à consommer ou prêts à réchauffer» et «lait et produits laitiers pasteurisés traités thermiquement», alors seules ces catégories ont besoin d'être étudiées. Outre les aliments, des échantillons prélevés sur des aliments pour animaux, dans l'environnement et au stade de la production primaire peuvent être inclus comme catégories supplémentaires. Cela permettra d'élargir l'application de la méthode alternative pour ces catégories supplémentaires.

Pour toutes les catégories sélectionnées (aliments et autres), au moins trois types différents par catégorie doivent être compris dans l'étude. L'[Annexe A](#) présente un aperçu des catégories et des types par micro-organisme particulier pouvant être pertinents pour la validation. Il convient d'utiliser l'[Annexe A](#) pour faciliter la sélection des catégories, des types et des matrices en fonction du micro-organisme particulier impliqué. Il convient de ne pas la considérer comme étant obligatoire.

Lors de la sélection des échantillons pour l'étude, trouver les échantillons naturellement contaminés est une priorité absolue. S'il n'est pas possible d'obtenir un nombre suffisant d'échantillons naturellement contaminés, l'utilisation d'échantillons artificiellement contaminés est permise (voir les [Annexes B](#) et [C](#)). Il convient de fournir tous les détails relatifs à la préparation des échantillons artificiellementensemencés dans le rapport d'étude de validation. Il est souhaitable que la nature des échantillons d'aliment choisis soient aussi diversifiée que possible afin de réduire tout biais lié aux spécialités alimentaires locales et d'élargir le domaine de validation.

La sélection des différents types doit permettre d'inclure dans l'étude à la fois des échantillons présentant une microflore annexe (naturelle) élevée ou faible, ainsi que différents types de stress, en fonction de la transformation ou non des produits.

EXEMPLE Pour la validation d'une méthode pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de la catégorie «produits à base de viande prêts à consommer ou prêts à réchauffer», les types peuvent être (1) produits cuits (flore annexe faible, stress à la chaleur), (2) produits de salaison ou fermentés (flore annexe élevée, stress au pH) et (3) viandes crues de salaison (fumées) ($a_w < 0,92$) (flore annexe intermédiaire, stress osmotique a_w).

Dans certains cas, par exemple pour une méthode alternative applicable à une vaste gamme d'aliments, il est possible de combiner les catégories «prêt à consommer» et «cru» à partir d'un même groupe de produit. Par exemple, les catégories de viandes (ou de produits à base de viande) crues et prêtes à consommer peuvent être combinées en seule catégorie sous-divisée en trois types divisés selon les types d'aliment pertinents crus et prêts à consommer. Il convient que la sélection des catégories d'aliment (combinées) repose sur l'analyse des risques.

5.1.3.2 Nombre d'échantillons

Pour chaque catégorie soumise à examen, un minimum de 60 échantillons individuels constitués d'au moins trois types contenant au moins 20 échantillons représentatifs par type doit être soumis à essai (trois types × 20 échantillons pour chaque type = 60 échantillons). Des résultats positifs partiels doivent être obtenus pour chaque type soumis à essai, avec la méthode de référence ou alternative (c'est-à-dire qu'il convient que les échantillons ne soient pas tous positifs ou tous négatifs). Idéalement, il convient que 10 échantillons (50 %) soumis à essai par type soient positifs et que 10 échantillons soient négatifs, l'intervalle devant s'étendre de 25 % à 75 %. Pour chaque catégorie, au moins 30 échantillons doivent avoir un résultat positif par la méthode de référence et/ou alternative.

5.1.3.3 Résultat de la méthode alternative et confirmation

De nombreux protocoles de méthodes alternatives comprennent deux étapes, la première étant l'étape d'enrichissement et de détection, et la deuxième étant la confirmation du résultat de détection obtenu lors de la première étape. Le résultat final de la méthode alternative est le résultat obtenu après la deuxième étape. Le résultat final sera identique au résultat obtenu après enrichissement et détection si aucune étape de confirmation n'est incluse dans le protocole de la méthode alternative.

Dans l'étude de sensibilité, le résultat (final) de la méthode alternative doit être confirmé. Dans l'étude de **méthodes non appariées**, tous les résultats obtenus avec la méthode alternative doivent être confirmés. Dans l'étude de **méthodes appariées**, seuls les résultats positifs obtenus avec la méthode alternative, pour lesquels le résultat correspondant avec la méthode de référence était négatif, doivent être confirmés. Cette confirmation est nécessaire pour déterminer si le résultat est un vrai positif ou un faux positif. Le ou les essai(s) de confirmation doit/doivent permettre de récupérer un isolat et de le confirmer comme étant la cible de la méthode. Ce(s) essai(s) peut/peuvent reposer sur le mode opératoire de confirmation de la méthode de référence, sur l'étape de confirmation de la méthode alternative si ce mode opératoire permet d'isoler et de confirmer l'identité de l'analyte cible, sur une combinaison des deux, ou sur tout autre moyen permettant d'isoler et de confirmer l'identité de l'analyte cible.

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/b91c0caf-7d2d-4517-aba4-5eb2758b086/iso-16140-2-2016>

Si les bouillons d'enrichissement des méthodes de référence et alternative diffèrent en termes de nombre de bouillons d'enrichissement (par exemple, primaires/non sélectifs et secondaires/sélectifs) ou de durée totale d'incubation, une voie de confirmation supplémentaire de l'étude de validation est nécessaire. La première voie doit être celle utilisée dans la méthode alternative en fonction de son mode opératoire/ses instructions (conditions d'essai en analyse de routine par la méthode alternative selon le mode opératoire de la notice de la trousse, n'incluant pas les essais complémentaires qui peuvent être mis en œuvre pendant l'étude de validation). Pour la deuxième voie, une partie du bouillon d'enrichissement incubé de la méthode alternative doit être transférée dans celui de la méthode de référence de sorte qu'au moins la durée totale d'incubation du ou des bouillon(s) d'enrichissement de la méthode de référence soit respectée. Les résultats des deux voies de confirmation doivent être consignés séparément.

5.1.3.4 Calcul et interprétation de la sensibilité

En général, les données doivent être présentées dans un rapport de manière à avoir une vue globale des données brutes obtenues. Des informations sur le type de contamination (échantillons naturellement ou artificiellement contaminés) des échantillons utilisés, sur le type de plan d'étude utilisé (par exemple, étude de méthodes **appariées** ou **non appariées**) et sur le(s) essai(s) de confirmation utilisé(s) pour confirmer le résultat de la méthode alternative, doivent être indiquées. Pour les échantillons artificiellement contaminés, le mode opératoire (ou une référence au mode opératoire) utilisé pour la préparation doit être spécifié (voir également l'[Annexe C](#)).

Les résultats obtenus pour les méthodes de référence et alternative sur un même échantillon, c'est-à-dire une prise d'essai en cas d'étude de méthodes **appariées** ou deux prises d'essai en cas d'étude de méthodes **non appariées**, doivent être décrits pour une étude de méthodes **appariées** conformément au [Tableau 1](#) et pour une étude de méthodes **non appariées** conformément au [Tableau 2](#). Le [Tableau 3](#) est préparé pour les résultats d'échantillons récapitulés pour toutes les catégories en fonction de la

catégorie (≥ 60 échantillons) et du type (≥ 20 échantillons) pour une étude de méthodes **appariées** et **non appariées**.

Tableau 1 — Comparaison et interprétation de résultats des échantillons entre la méthode de référence et la méthode alternative pour une étude de méthodes appariées

Résultat de la méthode (de référence ou alternative) en fonction de l'échantillon			
Méthode de référence	Méthode alternative (incluant les confirmations décrites dans le protocole de la méthode alternative)	Méthode alternative après confirmation (par n'importe quel moyen) ^a	Interprétation (sur la base du résultat de la méthode alternative après confirmation)
+	+	Non requis ^b	Accord positif (PA)
-	-	Non requis ^b	Accord négatif (NA)
+	-	Non requis ^b	Déviations négatives dues à un résultat faux négatif de la méthode alternative (ND)
-	+	+	Déviations positives (PD)
-	+	-	Accord négatif dû à un résultat faux positif de la méthode alternative (NA) ^c

^a La confirmation du résultat de la méthode alternative est effectuée selon [5.1.3.3](#).

^b Aucun essai de confirmation supplémentaire n'est nécessaire. Le résultat de la méthode alternative après confirmation est identique au résultat de la méthode alternative.

^c Ce résultat faux positif (FP) doit également être utilisé pour calculer le rapport des résultats faux positifs.

Tableau 2 — Comparaison et interprétation de résultats des échantillons entre la méthode de référence et la méthode alternative pour une étude de méthodes non appariées

Résultat de la méthode (de référence ou alternative) en fonction de l'échantillon			
Méthode de référence	Méthode alternative (incluant les confirmations décrites dans le protocole de la méthode alternative)	Méthode alternative après confirmation (par n'importe quel moyen) ^a	Interprétation (sur la base du résultat de la méthode alternative après confirmation)
+	+	+	Accord positif (PA)
+	+	-	Déviations négatives dues à un résultat faux positif de la méthode alternative (ND) ^b
-	-	-	Accord négatif (NA)
-	-	+	Accord négatif dû à un résultat faux négatif de la méthode alternative (NA)
+	-	-	Déviations négatives (ND)
+	-	+	Déviations négatives dues à un résultat faux négatif de la méthode alternative (ND)
-	+	+	Déviations positives (PD)
-	+	-	Accord négatif dû à un résultat faux positif de la méthode alternative (NA) ^b

^a La confirmation du résultat de la méthode alternative est effectuée selon [5.1.3.3](#).

^b Ces résultats faux positifs (FP) doivent également être utilisés pour calculer le rapport des résultats faux positifs.

Tableau 3 — Récapitulatif des résultats obtenus avec la méthode de référence et la méthode alternative de tous les échantillons pour chaque catégorie

	Résultat positif de la méthode de référence (R+)	Résultat négatif de la méthode de référence (R-)
Résultat positif de la méthode alternative (A+)	+/+ Accord positif (PA)	-/+ Déviation positive (PD)
Résultat négatif de la méthode alternative (A-)	+/- Déviation négative (ND)	-/- Accord négatif (NA)

D'après les données récapitulées dans le [Tableau 3](#), pour l'ensemble des catégories combinées, pour chaque catégorie et pour chaque type, calculer les valeurs de sensibilité de la méthode alternative (1) et de la méthode de référence (2), ainsi que la justesse relative (3) et le rapport de résultats faux positifs pour la méthode alternative après confirmation supplémentaire des résultats (4), comme suit:

$$\text{Sensibilité de la méthode alternative: } SE_{alt} = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{Sensibilité de la méthode de référence: } SE_{ref} = \frac{(PA + ND)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (2)$$

$$\text{Justesse relative: } RT = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100 \% \quad (3)$$

$$\text{Rapport des résultats faux positifs pour la méthode alternative: } FPR = \frac{FP}{NA} \times 100 \% \quad (4)$$

où N est le nombre total d'échantillons ($NA + PA + PD + ND$) et FP correspond aux résultats faux positifs. Pour une explication des abréviations utilisées, voir les [Tableaux 1 à 3](#).

Les résultats de la méthode alternative après confirmation doivent être utilisés pour déterminer si la méthode alternative produit des résultats comparables à ceux de la méthode de référence.

Calculer la différence entre ($ND - PD$) pour des études de méthodes **appariées** et **non appariées**, et la somme de ($ND + PD$) pour des études de méthodes **appariées**. Vérifier si cette différence et/ou cette somme de PD et ND sont conformes à la limite d'acceptabilité (AL) donnée dans le [Tableau 4](#) en tenant compte du type d'étude (méthodes **appariées** ou **non appariées**) et du nombre de catégories utilisés lors de l'évaluation.

NOTE Les limites d'acceptabilité (AL) sont basées sur des données et reposent sur un consensus d'experts. Les AL ne reposent pas sur l'analyse statistique des données.

L'interprétation des résultats doit être effectuée pour chaque catégorie et pour l'ensemble des catégories utilisées lors de l'étude de validation. Une interprétation des résultats doit également être réalisée pour chaque protocole d'enrichissement au cas où différents protocoles sont utilisés pour différents types d'échantillons. Les conditions ne sont pas acceptables lorsque la valeur observée est supérieure à l' AL . Dans ce cas, il convient de mener des investigations (par exemple, une analyse des causes) pour expliquer les résultats observés. La non-conformité de la méthode alternative pour l'analyse de la catégorie ou des catégories étudiée(s) est basée sur l' AL et sur des informations supplémentaires collectées. Si la méthode alternative est acceptée avec une AL non conforme, les raisons de son acceptation doivent être indiquées dans le rapport d'étude.

Tableau 4 — Paramètres et valeurs de limite d'acceptabilité pour des études de méthodes appariées et non appariées en fonction du nombre de catégories utilisé

Nombre de catégories	Méthodes appariées		Méthodes non appariées
	(ND ^a - PD ^b)	(ND + PD)	(ND - PD)
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

^a ND = nombre d'échantillons ayant des résultats de déviation négative.
^b PD = nombre d'échantillons ayant des résultats de déviation positive.

NOTE Il convient de présenter les informations sur les différences observées entre les résultats de la méthode alternative avant et après confirmation (étapes 1 et 2) selon le protocole de la méthode alternative, dans le rapport de validation, sous forme d'informations supplémentaires. Elles ne sont cependant pas utilisées dans l'évaluation globale de la performance de la méthode alternative.

5.1.4 Étude de niveau relatif de détection

Une étude comparative est menée pour évaluer le niveau de détection (LOD) de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence. L'évaluation est fondée sur le calcul du niveau de détection relatif (RLOD). Lors de l'étude, des répliquats préparés à partir d'échantillons artificiellement contaminés sont utilisés à trois niveaux de contamination ou plus. De préférence, les niveaux sont connus afin de pouvoir calculer le LOD. Néanmoins, cela n'est pas une exigence.

5.1.4.1 Sélection des catégories, nombre d'échantillons et de répliquats soumis à essai

Pour la sélection des catégories et des types, voir en 5.1.3.1. Les mêmes catégories que celles sélectionnées pour l'étude de sensibilité (voir en 5.1.3) seront utilisées. Pour chaque catégorie, un seul type pertinent est sélectionné. De manière à avoir une meilleure représentation de la catégorie évaluée, il convient que ce type soit différent de ceux utilisés dans l'étude de sensibilité (si possible). Les échantillons doivent être artificiellement contaminés. Les modes opératoires de préparation d'échantillons artificiellement contaminés sont présentés dans l'Annexe C. Chaque type seraensemencé avec une souche différente.

Au moins trois niveaux par type seront préparés, parmi lesquels au moins un niveau de témoin négatif, un niveau bas et un niveau supérieur. Idéalement, le niveau bas doit être le niveau de détection théorique (par exemple 0,7 UFC par prise d'essai) et le niveau élevé doit être légèrement supérieur au niveau de détection théorique (par exemple, de 1 UFC à 1,5 UFC par prise d'essai). Il convient que le niveau bas permette *a minima* d'obtenir des résultats positifs partiels pour la méthode de référence (il convient que les résultats positifs partiels au niveau bas soient compris entre 25 % et 75 % du nombre d'échantillons soumis à essai). Il est recommandé d'effectuer une estimation du niveau de contamination (sauf pour le témoin négatif). Il convient de soumettre à essai par les deux méthodes au moins cinq répliquats du témoin négatif. Au deuxième niveau (bas) (niveau de détection théorique), il convient de soumettre à essai par les deux méthodes au moins vingt répliquats, et au troisième niveau (élevé), au moins cinq. Le niveau de témoin négatif ne doit pas produire de résultats positifs. Lorsque des résultats positifs sont obtenus, les expériences doivent être répétées pour tous les niveaux.

Les résultats d'essai de déviation positive obtenus avec la méthode alternative doivent être en outre confirmés (voir en 5.1.3.3). Le RLOD doit être évalué après confirmation.

NOTE 1 De manière à avoir une meilleure garantie d'obtention de résultats positifs partiels, plusieurs niveaux de contamination peuvent être soumis à essai.

NOTE 2 Dans le cas où la méthode alternative présente un LOD inférieur à celui de la méthode de référence, le niveau de contamination requis cible celui de la méthode de référence.

5.1.4.2 Calcul et interprétation du niveau RLOD

Le RLOD est défini comme étant le rapport du LOD de la méthode alternative sur celui de la méthode de référence:

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}} \tag{5}$$

Pour chaque catégorie, au moins les RLOD doivent être estimés par ajustement à un modèle logarithme-logarithme complémentaire (LLC) des données d'absence/de présence combinées pour chacune des deux méthodes. Les niveaux de contamination ne sont pas nécessaires aux calculs de RLOD, car ils sont inclus dans le modèle, ce qui permet de présenter des courbes dans un graphique représentant la probabilité de détection en fonction du logarithme de la dose (niveau de contamination). Le modèle statistique et les calculs sont détaillés dans l'Annexe D. Les calculs peuvent être effectués à l'aide de la feuille de calcul Excel¹⁾ de la présente partie de l'ISO 16140. La feuille de calcul Excel[®] destinée à calculer des valeurs RLOD peut être téléchargée gratuitement via le lien <http://standards.iso.org/iso/16140> à partir duquel le fichier relatif au RLOD peut ensuite être sélectionné. Pour les calculs utilisant cette feuille de calcul Excel[®], l'option «concentration inconnue» doit être utilisée. Calculer, pour chaque matrice *i*, le RLOD_{*i*}. Présenter les résultats sous forme de tableau conformément au Tableau 5.

Tableau 5 — Présentation du RLOD avant et après confirmation des résultats de la méthode alternative

Catégorie (<i>i</i>)	RLOD en utilisant les résultats de la méthode alternative	RLOD en utilisant les résultats de la méthode alternative après confirmation
1	RLOD ₁	RLOD ₁
2		
...		
k		
Combinées		

Une limite d'acceptabilité (AL) pour le RLOD, fondée sur les résultats de la méthode alternative après confirmation, spécifie l'augmentation maximale de LOD de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence, qui ne sera pas considérée comme appropriée au vu de l'adéquation avec l'objectif de la méthode. Par conséquent, la limite AL sera une valeur > 1. Il convient d'interpréter les résultats pour chaque matrice.

La limite AL pour des données d'étude de **méthodes appariées** est établie à 1,5, ce qui signifie que le LOD de la méthode alternative ne doit pas être supérieur de plus de 1,5 fois le LOD de la méthode de référence. Une valeur de LOD de la méthode alternative inférieure à la valeur de LOD de la méthode de référence est toujours acceptée, car cela signifie que la méthode alternative est susceptible de détecter des niveaux de contamination inférieurs à ceux de la méthode de référence.

La limite AL pour des données d'étude de **méthodes non appariées** est établie à 2,5, ce qui signifie que le LOD de la méthode alternative ne doit pas être supérieur de plus de 2,5 fois le LOD de la méthode de référence. Une valeur de LOD de la méthode alternative inférieure à la valeur de LOD de la méthode de

1) Excel est un exemple d'un produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

référence est toujours acceptée, car cela signifie que la méthode alternative est susceptible de détecter des niveaux de contamination inférieurs à ceux de la méthode de référence.

La limite AL n'est pas atteinte lorsque la valeur observée est supérieure à la limite AL. Lorsque la limite AL n'est pas atteinte, il convient de faire des recherches (par exemple, une analyse des causes) pour donner une explication des résultats observés. D'après la limite AL et les informations supplémentaires, la décision de considérer la méthode alternative comme inadaptée à la matrice ou à la catégorie impliquée est prise. Si la limite AL n'est pas atteinte, les raisons de l'acceptation de la méthode alternative doivent être indiquées dans le rapport d'étude.

Outre le calcul du RLOD, les données peuvent être évaluées en utilisant le modèle de probabilité de détection (POD) de l'AOAC décrit dans la Référence [14] et inclus dans les lignes directrices de validation de l'AOAC[6]. L'évaluation utilisant le modèle POD peut donner des informations supplémentaires sur l'équivalence des méthodes.

5.1.5 Étude d'inclusivité et étude d'exclusivité

5.1.5.1 Sélection et nombre des souches

Un large choix de souches doit être utilisé. Les critères de sélection des souches d'essai sont donnés dans l'Annexe E. Pour le choix des souches à utiliser, il convient de prendre en compte le principe de la méthode alternative (par exemple, méthode basée sur une mise en culture, méthode basée sur un immunoessai et méthode moléculaire). Des principes de mesure différents peuvent nécessiter l'utilisation de différents types de souches.

Chaque souche utilisée doit être caractérisée biochimiquement et/ou sérologiquement et/ou génétiquement selon un degré de détail suffisant pour pouvoir l'identifier. Il convient en particulier que les souches utilisées aient été isolées à partir d'aliments, d'aliments pour animaux, d'environnement de production d'aliments ou de production primaire, en prenant en compte le domaine d'application de la validation. Néanmoins, les souches cliniques, environnementales et de collection de souches peuvent être utilisées. Il convient de connaître la source d'origine de tous les isolats et il convient que les isolats appartiennent à une collection de souches locale (par exemple, d'un laboratoire expert), nationale ou internationale afin de pouvoir les utiliser lors d'essais futurs si requis.

Pour l'étude d'inclusivité, au moins 50 cultures pures de micro-organismes (cibles) doivent être soumises à essai. Pour l'étude d'inclusivité de méthodes concernant les Salmonelles, au moins 100 cultures pures de différents sérotypes de *Salmonella* doivent être soumises à essai.

Pour l'étude d'exclusivité, au moins 30 cultures pures de micro-organismes (non cibles) doivent être soumises à essai.

Certains micro-organismes seront difficiles voire impossibles à cultiver, notamment les virus ou les parasites protozoaires. Lorsque l'organisme cible ne peut pas être cultivé, il convient d'utiliser des suspensions pures de souches d'essai pour contaminer à l'étape la plus précoce et la plus appropriée de la méthode.

NOTE 1 Pour certains micro-organismes, il sera difficile d'obtenir le nombre de souches requis pour l'inclusivité et l'exclusivité. Dans ces cas-là, il convient que les parties impliquées dans l'étude de validation choisissent ensemble les souches d'essai.

NOTE 2 L'ISO 11133[2] contient des lignes directrices relatives à la préservation et à la conservation des souches dans les collections (locales).

5.1.5.2 Ensemencement des souches cibles (inclusivité)

Chaque essai est effectué une seule fois et seulement avec la méthode alternative (incluant une étape de confirmation si elle est requise dans le protocole de la méthode alternative). L'ensemencement d'un milieu de culture adapté est effectué à partir d'une dilution d'une culture pure de chaque souche d'essai. Cette culture est utilisée pour les essais d'inclusivité. Aucun échantillon n'est ajouté.