



Norme  
internationale

**ISO 16140-2**

**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**

**AMENDEMENT 1: Révision de  
l'évaluation des données des études de  
comparaison de méthodes qualitatives,  
des calculs du niveau de détection  
de l'étude interlaboratoires et de  
l'interprétation de l'étude de justesse  
relative, et ajout d'un protocole  
pour la détermination de la stérilité  
commerciale pour des produits  
spécifiques**

*Microbiology of the food chain — Method validation —*

*Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary)  
methods against a reference method*

*AMENDMENT 1: Revision of qualitative method comparison  
study data evaluation, relative level of detection calculations in  
the interlaboratory study, calculation and interpretation of the  
relative trueness study, and inclusion of a commercial sterility  
testing protocol for specific products*

Numéro de référence  
ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024(fr)

Première édition  
2016-06-15

AMENDEMENT 1  
2024-09

© ISO 2024

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO 16140-2:2016/Amd 1:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a7daf4fb-bac6-46e9-8b7e-9d01cdf96783/iso-16140-2-2016-amd-1-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a7daf4fb-bac6-46e9-8b7e-9d01cdf96783/iso-16140-2-2016-amd-1-2024>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2024

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +41 22 749 01 11  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://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 (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](http://www.iso.org/directives)).

L'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de brevet revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets). L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

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 nature volontaire des normes, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, *Microbiologie de la chaîne alimentaire*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Une liste de toutes les parties de la série ISO 16140 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).



# 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

AMENDEMENT 1: Révision de l'évaluation des données des études de comparaison de méthodes qualitatives, des calculs du niveau de détection de l'étude interlaboratoires et de l'interprétation de l'étude de justesse relative, et ajout d'un protocole pour la détermination de la stérilité commerciale pour des produits spécifiques

*Introduction*

Remplacer le texte par ce qui suit:

### Introduction

#### 0.1 Série ISO 16140

La série ISO 16140 a été étendue en réponse à la nécessité de disposer de différents protocoles pour la validation ou la vérification des méthodes d'essai. Elle succède à l'ISO 16140:2003. La série ISO 16140 comprend six parties ayant 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;*
- *Partie 3: Protocole pour la vérification de méthodes de référence et de méthodes alternatives validées dans un seul laboratoire;*
- *Partie 4: Protocole pour la validation de méthodes dans un seul laboratoire;*
- *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.*

L'ISO 17468 est une Norme internationale étroitement liée, qui établit les règles techniques pour le développement et la validation de méthodes normalisées.

En général, deux étapes sont nécessaires avant de pouvoir utiliser une méthode en laboratoire:

- la première étape est la validation de la méthode. Celle-ci est effectuée à l'aide d'une étude dans un seul laboratoire suivie d'une étude interlaboratoires (voir le présent document, l'ISO 16140-5 et l'ISO 16140-6).

## ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024(fr)

Dans le cas où une méthode est validée dans un seul laboratoire (voir l'ISO 16140-4), aucune étude interlaboratoires n'est effectuée;

- la seconde étape est la vérification des méthodes, au cours de laquelle un laboratoire prouve qu'il peut effectuer une méthode validée de manière satisfaisante. Celle-ci est décrite dans l'ISO 16140-3. La vérification est uniquement applicable aux méthodes qui ont été validées à l'aide d'une étude interlaboratoires.

On distingue en général deux types de méthodes: les méthodes de référence et les méthodes alternatives.

Une méthode de référence est définie dans l'ISO 16140-1:2016, 2.59, comme étant une «méthode reconnue internationalement et largement acceptée». La note à l'article précise que «ces normes sont des normes ISO et des normes publiées conjointement par l'ISO et le CEN ou d'autres normes régionales/nationales de niveau équivalent».

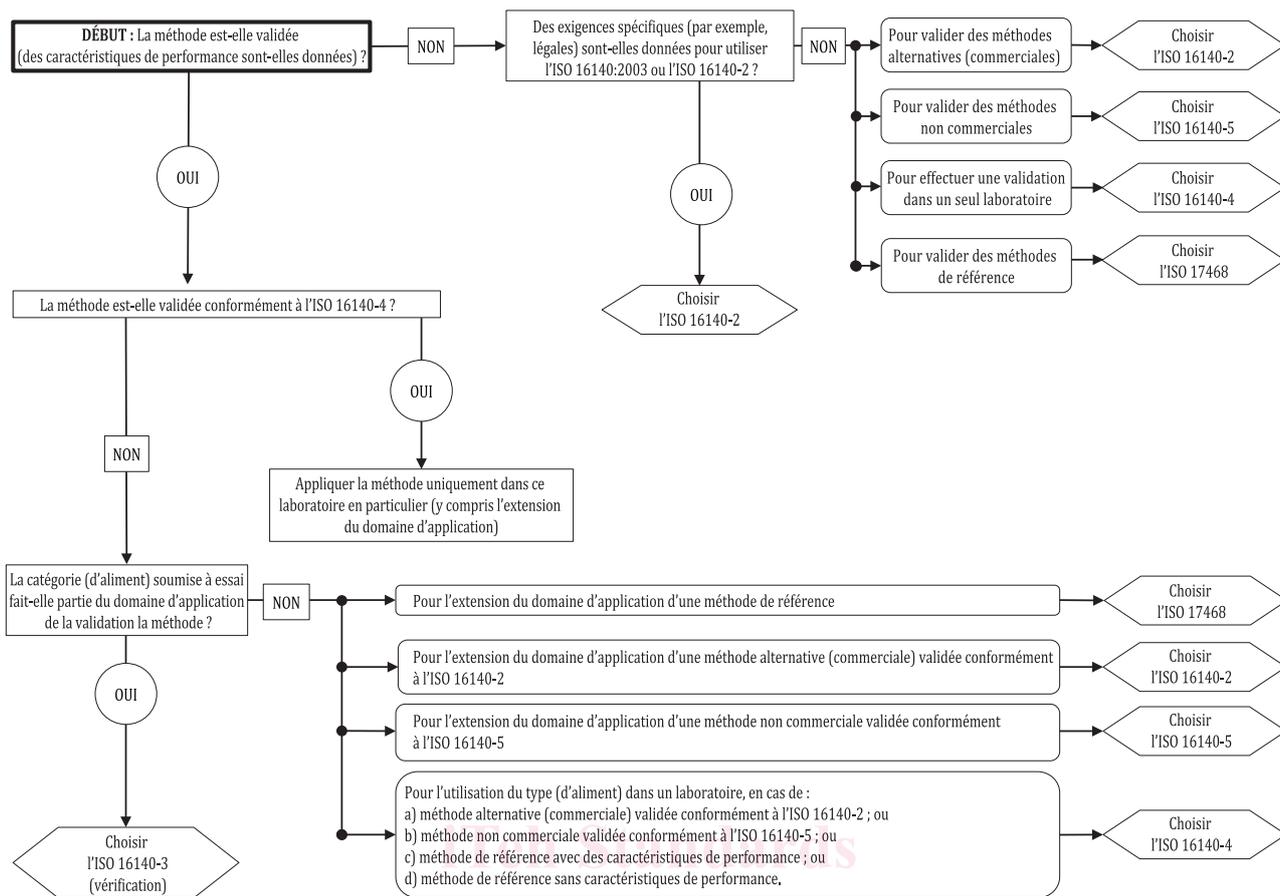
Dans la série ISO 16140, les méthodes de référence comprennent les méthodes de référence normalisées (ISO et CEN) telles que définies dans l'ISO 17468:2023, 3.7, en tant que «méthode de référence décrite dans une norme».

Une méthode alternative (méthode soumise à validation) est définie dans l'ISO 16140-1:2016, 2.4, en tant que «méthode d'analyse permettant de détecter ou de quantifier, pour une catégorie de produits donnée, le même analyte que celui détecté ou quantifié avec la méthode de référence correspondante». La note à l'article précise que: «La méthode peut être commerciale. L'adjectif «alternatif» se réfère à la totalité du «mode opératoire d'analyse et du système réactionnel». Ce terme recouvre tous les éléments nécessaires à la mise en œuvre de la méthode, qu'ils soient matériels ou autres.»

L'ISO 16140-4 traite de la validation dans un seul laboratoire. Par conséquent, les résultats sont uniquement valides pour le laboratoire effectuant l'étude. Dans ce cas, aucune vérification (comme décrit dans l'ISO 16140-3) n'est applicable. L'ISO 16140-5 décrit les protocoles applicables aux méthodes non commerciales dans lesquelles une validation plus rapide est nécessaire ou dans lesquelles la méthode à valider est hautement spécialisée, et le nombre de laboratoires participants requis par le présent document ne peut pas être atteint. L'ISO 16140-4 et l'ISO 16140-5 peuvent être utilisées pour la validation avec méthode de référence. L'ISO 16140-4 (concernant les méthodes qualitatives et quantitatives) et l'ISO 16140-5 (concernant les méthodes quantitatives uniquement) peuvent également être utilisées pour la validation sans méthode de référence.

Le logigramme de la Figure 0.1 donne un aperçu des relations entre les différentes parties susmentionnées. Il aide également l'utilisateur à choisir la partie appropriée de la série ISO 16140, en tenant compte de l'objectif de l'étude et des remarques énoncées ci-dessus.

## ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024(fr)

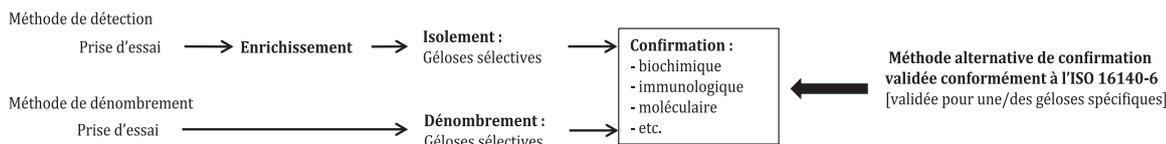


**Figure 0.1 — Logigramme relatif à l'application de la série ISO 16140**

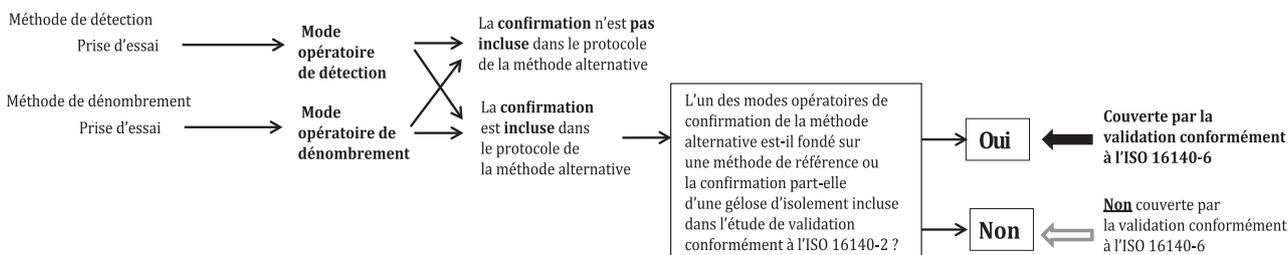
NOTE Dans le présent document, les termes «catégorie», «type» et/ou «matrice» sont parfois associés au terme «(aliment)» pour une meilleure compréhension. Cependant, le terme «(aliment)» peut être remplacé par «aliment pour (animaux)» et par les autres secteurs de la chaîne alimentaire tels que mentionnés à l'Article 1.

L'ISO 16140-6 est quelque peu différente des autres parties de la série ISO 16140 car elle concerne une situation très spécifique dans laquelle seul le mode opératoire de confirmation d'une méthode doit être validé [par exemple, la confirmation biochimique des *Enterobacteriaceae* (voir l'ISO 21528-2)]. Le mode opératoire de confirmation modifie un résultat suspecté (présomptif) en un résultat positif confirmé. La validation des méthodes alternatives de typage (par exemple, sérotypage de *Salmonella*) est également couverte par l'ISO 16140-6. L'étude de validation de l'ISO 16140-6 définit clairement la ou les géloses sélectives à partir desquelles les souches peuvent être confirmées en utilisant la méthode alternative de confirmation. Lorsque la méthode alternative de confirmation est validée, elle ne peut être appliquée que si les souches sont cultivées sur une gélose utilisée et jugée acceptable lors de l'étude de validation. La Figure 0.2 illustre les situations dans lesquelles une méthode alternative de confirmation validée conformément à l'ISO 16140-6 peut être appliquée (voir le texte dans les cases).

**Méthode de référence**



**Méthode alternative validée conformément à l'ISO 16140-2**



**Figure 0.2 — Utilisation de méthodes alternatives de confirmation (voir l'ISO 16140-6)**

**EXEMPLE** Un exemple d'application d'une méthode alternative de confirmation validée est donné ci-après.

Une méthode alternative de confirmation fondée sur une ELISA a été validée (conformément à l'ISO 16140-6) pour remplacer la confirmation biochimique de *Salmonella* tel qu'il est décrit dans l'ISO 6579-1. Lors de l'étude de validation, la gélose XLD (gélose obligatoire conformément à l'ISO 6579-1) ainsi que la gélose BGA et une gélose chromogène spécifiée (deux géloses facultatives pour le deuxième ensemencement conformément à l'ISO 6579-1) ont été utilisées pour commencer la confirmation. La méthode de confirmation validée peut être utilisée pour remplacer la confirmation biochimique dans les conditions suivantes:

- par des laboratoires utilisant l'ISO 6579-1; ou
- par des laboratoires utilisant une méthode alternative validée selon l'ISO 16140-2 faisant référence à l'ISO 6579-1 pour la confirmation; ou
- par des laboratoires utilisant une méthode alternative validée selon l'ISO 16140-2 dont la confirmation débute avec la gélose XLD et/ou la gélose BGA et/ou la gélose chromogène spécifiée.

La méthode de confirmation validée ne peut pas être utilisée dans les conditions suivantes:

- par des laboratoires utilisant une méthode alternative validée selon l'ISO 16140-2 faisant uniquement référence à des géloses autres que celles incluses dans la validation pour commencer la confirmation (par exemple, la gélose Hektoen et la gélose SS uniquement); ou
- par des laboratoires utilisant une méthode alternative validée selon l'ISO 16140-2 faisant uniquement référence à un mode opératoire de confirmation ne nécessitant pas d'isolement sur gélose.

**0.2 Protocoles de validation dans la série ISO 16140**

Le présent document décrit l'approche générale de validation de la méthode dans le domaine de la microbiologie de la chaîne alimentaire et sert de fondement à d'autres parties de la série ISO 16140, qui y font référence. Une connaissance des caractéristiques de performance, des catégories (d'aliments), du protocole technique et de l'analyse des données tels que décrits dans le présent document, facilite l'application de la série ISO 16140 en général.

*Article 4*

Ajouter le texte suivant à la fin du paragraphe:

Pour la validation d'une méthode qualitative alternative, une méthode de référence qualitative est choisie pour effectuer l'étude de validation. Cela est couramment effectué à l'aide de prises d'essai de 10 g, 25 g

ou plus. Dans certains cas, il peut être intéressant de valider une méthode alternative qualitative par rapport à une méthode de référence quantitative, à l'aide de prises d'essai plus petites.

EXEMPLE 1 Le critère *Enterobacteriaceae* pour le lait pasteurisé et les autres produits pasteurisés liquides du Règlement (CE) n° 2073/2005 est  $< 10$  UFC/ml et fait référence à la méthode quantitative ISO 21528-2.

Dans ce cas, il est intéressant de valider la performance des méthodes alternatives qualitatives par rapport à la méthode de référence (quantitative) spécifiée. Pour cela, le protocole technique pour la validation des méthodes qualitatives (voir Article 5) doit être utilisé. Pour cette étude de validation, les résultats quantitatifs de la méthode de référence doivent être convertis en résultats qualitatifs avant l'interprétation selon l'Article 5.

EXEMPLE 2 Lorsqu'une ou plusieurs colonies sont observées sur une boîte en utilisant 1 ml d'une dilution  $10^{-2}$ , ce résultat correspond à une détection positive dans 0,01 g.

NOTE L'Annexe J fournit le cas particulier de validation d'une méthode pour la détermination de la stérilité commerciale de produits spécifiques [produits laitiers et produits liquides à base de plantes stérilisés ou à ultra-haute température (UHT)].

Si une modification technique d'une méthode alternative (commerciale) validée est jugée majeure, une nouvelle validation de cette méthode alternative conformément au présent document est nécessaire.

Lorsqu'une nouvelle validation de la méthode alternative est effectuée, l'impact sur les caractéristiques de performance doit être évalué pour déterminer si les modifications doivent être jugées majeures (les caractéristiques de performance ont nettement changé) ou mineures (un impact nul ou mineur sur les caractéristiques de performance a été observé). Dans certains cas, une modification technique majeure de la méthode peut être jugée mineure si l'étude de la nouvelle validation montre l'absence d'impact significatif sur les caractéristiques de performance ou les résultats d'essai. Une modification (technique) majeure qui, après nouvelle validation, a un impact majeur sur les caractéristiques de performance de la méthode alternative, nécessite une nouvelle vérification de la méthode par le laboratoire de l'utilisateur, conformément à l'ISO 16140-3.

## Document Preview

### 5.1.1

Ajouter le texte suivant à la fin du paragraphe:

Le laboratoire organisateur doit avoir les compétences pour mettre en œuvre la méthode de référence et la méthode alternative.

NOTE Les compétences peuvent être démontrées de différentes manières (par exemple, pour la méthode de référence, une preuve documentée de la conformité aux exigences de l'ISO/IEC 17025 et pour la méthode alternative, une formation documentée).

### 5.1.2

Ajouter le texte suivant à la fin du paragraphe:

Lorsque la méthode de référence et la méthode alternative reposent sur deux principes différents et sont effectués avec la même prise d'essai mais pas avec le même mode opératoire d'enrichissement, une étude de données appariées est effectuée. Par exemple, lorsqu'une méthode alternative qualitative est validée par rapport à une méthode de référence quantitative à une limite de 100 UFC/g. Dans ce cas, une suspension de la matrice (d'aliment) peut être utilisée pour ensemercer les milieux de culture de la méthode de référence et de la méthode alternative avant l'enrichissement/la multiplication du micro-organisme.

### 5.1.3.3

Ajouter le texte suivant à la fin du paragraphe:

La méthode alternative doit être évaluée pour une taille de prise d'essai définie (par exemple 25 g, 200 g, 375 g) pendant l'étude de validation. La méthode est jugée validée pour n'importe quelle taille de prise d'essai jusqu'à la taille de prise d'essai validée si le protocole d'essai (rapport de dilution, durée d'incubation et température d'incubation) est le même que celui utilisé pendant l'étude de validation.

**EXEMPLE** Une méthode de référence utilisée dans une étude de validation selon le présent document a été validée pour une «vaste gamme d'aliments» en utilisant une prise d'essai de 25 g et un rapport de dilution de 1:10. La méthode alternative a été validée pour une «vaste gamme d'aliments» en utilisant une prise d'essai de 375 g et un rapport de dilution de 1:5 à une durée d'incubation déterminée. En pratique, un laboratoire utilisateur peut utiliser la méthode alternative pour toutes les matrices d'aliments (vaste gamme d'aliments) en utilisant une taille de prise d'essai allant jusqu'à 375 g et un rapport de dilution de 1:5 à la durée d'incubation validée (sauf indication contraire de la part de l'organisme chargé de la validation de la méthode).

5.1.3.4

Ajouter le texte suivant avant la dernière phrase du deuxième alinéa:

L'interprétation des résultats (accord positif, accord négatif, etc.) repose sur une comparaison du résultat de la méthode de référence (colonne 1 des Tableaux 1 et 2) et du résultat de la méthode alternative, incluant les confirmations décrites dans le protocole de la méthode alternative (colonne 2 des Tableaux 1 et 2). Si des déviations positives ou négatives sont obtenues, il convient d'ajouter une note de bas de page à la fin de chaque tableau pour fournir des explications supplémentaires pour l'interprétation des déviations. Les notes de bas de page indiquent si le résultat est dû à un résultat faux positif ou faux négatif de la méthode alternative. La note de bas de page est une comparaison des résultats de la méthode alternative (incluant les confirmations décrites dans le protocole de la méthode alternative) (colonne 2 des Tableaux 1 et 2) et de la méthode alternative après confirmation (par n'importe quel moyen) (colonne 3 des Tableaux 1 et 2).

5.1.3.4, après le deuxième alinéa

Remplacer le texte par ce qui suit:

**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) <sup>a</sup>	Interprétation (sur la base du résultat de la méthode alternative après confirmation)
+	+	Non requis <sup>b</sup>	Accord positif (PA)
-	-	Non requis <sup>b</sup>	Accord négatif (NA)
+	-	Non requis <sup>b</sup>	Déviations négatives dues à un résultat faux négatif de la méthode alternative (ND <sub>FN(alt)</sub> )
-	+	+	Déviations positives (PD)
-	+	-	Déviations positives dues à un résultat faux positif de la méthode alternative (PD <sub>FP(alt)</sub> ) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> La confirmation du résultat de la méthode alternative est effectuée selon 5.1.3.3.

<sup>b</sup> Aucun essai de confirmation supplémentaire n'est nécessaire. Le résultat de la méthode alternative après confirmation est identique au résultat de la méthode alternative.

<sup>c</sup> 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) <sup>a,b</sup>	Interprétation (sur la base du résultat de la méthode alternative après confirmation)
+	+	+	Accord positif (PA)
+	+	-	Accord positif dû à un résultat faux positif de la méthode alternative (PA <sub>FP(alt)</sub> ) <sup>c</sup>
-	-	-	Accord négatif (NA)
-	-	+	Accord négatif dû à un résultat faux négatif de la méthode alternative (NA <sub>FN(alt)</sub> )
+	-	-	Déviations négatives (ND)
+	-	+	Déviations négatives dues à un résultat faux négatif de la méthode alternative (ND <sub>FN(alt)</sub> )
-	+	+	Déviations positives (PD)
-	+	-	Déviations positives dues à un résultat faux positif de la méthode alternative (PD <sub>FP(alt)</sub> ) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> La confirmation du résultat de la méthode alternative est effectuée selon 5.1.3.3.

<sup>b</sup> La confirmation par n'importe quel moyen est uniquement requise lorsque le résultat de la méthode alternative ne produit pas d'organismes viables. Celui-ci est utilisé comme résultat de la méthode alternative après confirmation en comparaison avec le résultat de la méthode de référence.

<sup>c</sup> Ces résultats faux positifs (FP) doivent également être utilisés pour calculer le rapport des résultats faux positifs.

Déterminer la déviation négative totale (TND) et l'accord négatif total (TNA) pour l'étude de validation.

ISO 16140-2:2016/Amd 1:2024

Évaluation des méthodes appariées: Déviation négative totale:  $TND = ND_{FN(alt)}$

Accord négatif total:  $TNA = NA + PD_{FP(alt)}$

Évaluation des méthodes non appariées: Déviation négative totale:  $TND = ND + ND_{FN(alt)} + PA_{FP(alt)}$

Accord négatif total:  $TNA = NA + NA_{FN(alt)} + PD_{FP(alt)}$

**Tableau 3 — Récapitulatif des résultats obtenus avec la méthode de référence et la méthode alternative (après confirmation) 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 totale (TND)	-/- Accord négatif total (TNA)

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 [voir Formule (1)] et de la méthode de référence [voir Formule (2)], ainsi que la justesse relative [voir Formule (3)] et le rapport de résultats faux positifs pour la méthode alternative après confirmation supplémentaire des résultats [voir Formule (4)].