N° d'identification de l'application : **NF102**
Date d'édition : **17/05/2017**
Date d'approbation : **17/05/2017**

Validation des méthodes d'analyse

Application à l'agroalimentaire

Exigences relatives aux études de validation mises en œuvre selon le protocole de la norme EN ISO 16140-2

Projet Révision N°6 – Adoptée par AFNOR Certification le 17 mai 2017
(suite à approbation du Bureau Technique concerné)

11 rue Francis de Pressensé - 93751 La Plaine Saint-Denis Cedex - France -T. +33 (0)1 41 62 80 11 - F : +33 (0)1 49 17 90 00
SAS au capital de 18 187 000 euros - 479 076 002 RCS Bobigny
www.afnor.org

SOMMAIRE

AVANT PROPOS 4

OBJET 4
MISE A JOUR/DIFFUSION 4
NOTE 1: CRITERES D'ACCEPTABILITE DES RESULTATS 4
NOTE 2 : ACCEPTATION DES RESULTATS EXTERNES 4
NOTE 3 : RESULTATS BRUTS 4
NOTE 5 : RESPECT DES PRESENTES EXIGENCES 4
NOTE 6 : MODALITES DE TRANSITION EN ISO 16140-2 4

METHODES QUALITATIVES (§ 5 DE LA NORME EN ISO 16140-2) 5

CONDITIONS DE CONFIRMATION DES RESULTATS POSITIFS 5
ETUDE COMPARATIVE DES METHODES (§ 5.1) 7
Considérations générales (§ 5.1.1) 7
Etude de sensibilité (§ 5.1.3) 7
Etude du niveau de détection relatif (§ 5.1.4) 10
Etude d'inclusivité et d'exclusivité (§ 5.1.5) 11
Etude de praticabilité de la méthode alternative (exigence spécifique) 12
ETUDE INTERLABORATOIRES (§ 5.2) 13
Considérations générales (§ 5.2.1) 13
Protocole de mesure (§ 5.2.2) 13
Calculs et synthèse des données (§ 5.2.3) 14
Interprétation des données (§ 5.2.4) 14

METHODES QUANTITATIVES (§ 6 DE LA NORME EN ISO 16140-2) 15

ETUDE COMPARATIVE DES METHODES (§ 6.1) 15
Considérations générales (§ 6.1.1) 15
Etude de justesse relative (§ 6.1.2) 15
Etude du profil d'exactitude (§ 6.1.3) 15
Etude de la limite de quantification (§ 6.1.4) 16
Etude d'inclusivité et d'exclusivité (§ 6.1.5) 16
Etude de praticabilité de la méthode alternative (exigence spécifique) 16
ETUDE INTERLABORATOIRES (§ 6.2) 17
Considérations générales (§ 6.2.1) 17
Protocole de mesure (§ 6.2.2) 17
Calculs, synthèse et interprétation des données (§ 6.2.3) 18

MODALITES D'INSTRUCTION PAR LE BUREAU TECHNIQUE DES ETUDES MENEES PAR LE LABORATOIRE EXPERT 19

1 PRESENTATION D'UN PROJET D'ETUDE COMPARATIVE 19
2 REALISATION DE L'ETUDE COMPARATIVE ET PRESENTATION DES RESULTATS 20
3 REALISATION DE L'ETUDE INTERLABORATOIRES ET PRESENTATION DES RESULTATS 21
4 ELABORATION DU CERTIFICAT NF VALIDATION 21
5 RAPPORT DE SYNTHESE DES ETUDES 22
6 DUREE DE LA CERTIFICATION 22
7 CAS D'UNE EXTENSION/MODIFICATION 22
8 CAS DE LA RECONDUCTION 22

Annexe 1 ..... *24*
Modalités de transition pour le passage à la norme EN ISO 16140-2 (2016) *24*
Annexe 2 ..... *26*
Dispositions spécifiques pour la validation de méthodes alternatives pour la détection des STEC en comparaison à la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136 ..... *26*
Annexe 3 ..... *29*
Catégories de produits et types de produits par germe cible, stress et modes de contamination associés (liste informative) *29*
Annexe 4 ..... *30*
Etude de sélectivité Salmonella - Listes de souches obligatoires *30*
Annexe 5 ..... *33*
Modalités générales d'organisation de l'étude interlaboratoires *33*
Annexe 6 ..... *35*
Exemple de protocole de contamination et de dénombrement pour les faibles taux *35*
Annexe 7 ..... *38*
Modèles de rapport d'étude et de synthèse pour les études selon la norme EN ISO 16140-2 ..... *38*

AVANT PROPOS

Objet

Ce document s'applique en complément de la norme EN ISO 16140-2 à laquelle il ne se substitue pas. Il constitue en partie un guide d'application de cette norme et contient des dispositions spécifiques supplémentaires exigées par la marque NF VALIDATION.

Mise à jour/Diffusion

Ce document est mis à jour par AFNOR Certification à chaque modification apportée par le Bureau Technique Agroalimentaire et/ou par AFNOR Certification.
Il est diffusé par AFNOR Certification de façon contrôlée à chaque mise à jour, aux laboratoires experts qualifiés et aux membres du Bureau Technique.
Il est diffusé de façon non contrôlée à tout demandeur.

Note 1: Critères d'acceptabilité des résultats

La norme EN ISO 16140-2 a introduit des limites d'acceptabilité des résultats pour les critères principaux. Il revient toutefois au Bureau Technique d'examiner et d'évaluer les résultats pour chacun des critères, et de donner un avis sur l'ensemble des résultats détaillés.

Note 2 : Acceptation des résultats externes

Il est possible d'accepter des résultats externes obtenus antérieurement dans le cadre d'un autre programme de validation. Dans la limite de sa compétence, et en l'absence de documents officiels en faisant état, il revient au Bureau Technique de juger de l'importance des différences entre les méthodes de référence et/ou les protocoles de validation utilisés.

Note 3 : Résultats bruts

Le Laboratoire expert doit être en mesure de communiquer l'ensemble des données brutes (qui ne figurent pas dans le rapport) aux rapporteurs du dossier, à AFNOR Certification ou aux membres du Bureau Technique si nécessaire.

Note 5 : Respect des présentes exigences

Le Laboratoire expert doit signaler tout au long de l'étude tous les écarts éventuels par rapport au protocole du fabricant et/ou par rapport au présent document Si aucun écart n'est mentionné, le respect du protocole du fabricant et du présent document est implicite et sous sa responsabilité.

Note 6 : Modalités de transition EN ISO 16140-2

La Commission de Validation et son Bureau Technique ont défini des modalités de transition applicables pour le passage au nouveau protocole de validation EN ISO 16140-2, publié en septembre 2016. Celles-ci sont spécifiées en annexe 1 du présent document.

METHODES QUALITATIVES (§ 5 de la norme EN ISO 16140-2)

Dans le cadre de la validation des méthodes alternatives à la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136, des Exigences supplémentaires spécifiques ont été définies par le Bureau Technique et la Commission de Validation, et sont précisées en annexe 2 du présent document.

Conditions de confirmation des résultats positifs

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, toutes les méthodes alternatives pour la **recherche de microorganismes pathogènes** (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, …), candidates à la validation, **doivent** systématiquement prévoir une étape de confirmation des résultats positifs dans leur protocole de routine. Ne sont pas concernées par cette exigence les familles incluant différents genres dont uniquement certains comprennent des souches pathogènes (ex. entérobactéries).

Dans le cadre de l'étude de validation, seuls les résultats obtenus après confirmation sont considérés comme définitifs (tableaux, calculs…). Les résultats avant confirmation sont exploités pour information. Les différences de résultats entre les différentes options de confirmation devront être documentées dans le rapport.

La Commission de Validation et son Bureau Technique ont défini les "cas" suivants de confirmation :

- Cas 1 : Mise en œuvre des **tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies (en incluant l'étape de purification)**.

  NOTE : Les étapes préalables à la confirmation doivent être explicitées.

- Cas 2 : Mise en œuvre **d'une ou plusieurs méthodes** présentant **un principe différent** de celui de la méthode validée, et **décrites par le fabricant** lors de la demande initiale de validation, dans un protocole de confirmation.

  NOTE : Dans ce cas, l'étude de validation doit porter sur cette (ces) méthode(s) et l'opportunité de la mise en œuvre de cette (ces) méthode(s) est laissée à l'appréciation du Bureau Technique qui peut refuser cette option. Ces protocoles spécifiques de confirmation doivent être documentés dans le rapport d'étude.

  Dans le cadre de ce "cas 2" de confirmation, les références de Tests Latex proposés sont à spécifier dans le rapport d'étude.

- Cas 3 : Utilisation de **toute autre méthode certifiée NF VALIDATION**, de **principe différent** de celui de la méthode validée dont on cherche à confirmer le résultat. Le protocole de détection de la seconde méthode validée devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

  NOTE : Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun (exemple : enrichissement commun avec un même milieu).

- Cas 4 : Par l'utilisation de **sondes nucléiques** différentes de celles de la méthode de détection dont on cherche à confirmer le résultat et **tel que prévu dans la norme NF EN ISO 7218** à partir de colonies isolées (avec ou sans purification).

Le "cas 1" doit obligatoirement faire partie du protocole de la méthode alternative à valider. Les "**cas 2, 3 et 4"** peuvent la compléter.

En cas de résultats discordants (positif présomptif par la méthode alternative, non confirmé par les tests classiques ou par la(es) méthode(s) décrite(s) par le fabricant, en particulier *(si applicable)* par le(s) test(s) Latex*, ou par une autre méthode certifiée NF VALIDATION), **le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.**

***** *Précision supplémentaire à ajouter dans le cas où des tests Latex sont proposés en confirmation.*

Précisions complémentaires dans le cas des *Listeria* :

Confirmation des *Listeria monocytogenes* : Sous réserve des résultats de validation satisfaisants sur au moins deux géloses chromogéniques, le "cas 2" de confirmation suivant peut être proposé : « Par isolement sur gélose chromogène conforme à la définition de la norme NF EN ISO 11290 (type formulation OAA) ou faisant partie d'une méthode certifiée NF VALIDATION. La présence de colonies caractéristiques suffit à confirmer la présence de *Listeria monocytogenes*. »

Confirmation du genre *Listeria* spp : Sous réserve d'avis préalable du Bureau Technique, le "cas 2" de confirmation suivant peut être proposé : « Par isolement sur gélose PALCAM ou sur gélose chromogène faisant partie d'une méthode certifiée NF Validation pour la détection du genre *Listeria*. La présence de colonies caractéristiques suffit à confirmer la présence de *Listeria* spp. ».

Pour les méthodes alternatives, validées à la fois pour la détection et le dénombrement des *Listeria monocytogenes* (ou) bien des *Listeria* spp, et utilisant une même gélose pour la détection et le dénombrement (même référence commerciale de milieu), il est possible de proposer les modalités suivantes :

- Partie détection : « Si on obtient un résultat positif en <*Listeria monocytogenes* (ou bien) *Listeria* spp> lors de l'étape de détection avec la méthode [nom de la méthode validée en détection], il n'est pas nécessaire de confirmer ce résultat s'il a déjà été confirmé à l'issue du dénombrement de la méthode [nom de la méthode validée en dénombrement]. »
- Partie dénombrement : « Si on obtient un résultat positif en <*Listeria monocytogenes* (ou bien) *Listeria* spp> lors de l'étape de dénombrement avec la méthode [nom de la méthode validée en détection], il n'est pas nécessaire de confirmer ce résultat s'il a déjà été confirmé à l'issue de l'étape de détection avec la méthode [nom de la méthode validée en dénombrement]. Le fait de ne pas confirmer 5 colonies en dénombrement implique un risque de rendre un résultat surestimé du fait de la présence éventuelle de colonies caractéristiques qui ne seraient pas des <*Listeria monocytogenes* (ou bien) *Listeria* spp>. »

Etude comparative des méthodes (§ 5.1)

Considérations générales (§ 5.1.1)

L'objectif de cette étude est de comparer les performances de la méthode alternative et de la méthode de référence, pour les paramètres suivants :

- Etude de sensibilité
- Niveau de détection relatif

Et de déterminer les paramètres suivants pour la méthode alternative :

- Etude d'inclusivité et d'exclusivité
- Praticabilité

Des **mêmes prises d'essai** sont à tester pour la méthode alternative et la méthode de référence (excepté pour *Cronobacter*).

- Des essais avec des prises d'essai de 25g permettent d'inclure des pesées de 1g à 25g.
- Pour les protocoles avec dilution 1/ 4 : Des essais réalisés avec des prises d'essai supérieures à 50g (ex. 375g) permettent d'inclure des pesées de 50g à celle testée dans l'étude (ex. 375g). Pour ce cas, il y a un vide entre 25g et 50g, mais l'intérêt des utilisateurs est moindre dans cet intervalle.
- Pour les protocoles avec dilution au 1/10 : Des essais réalisés avec des prises d'essai supérieures à 25g (ex. 375g) permettent d'inclure des pesées, comprises entre 1g et celle testée dans l'étude (ex. 375g).

Pour ***Cronobacter***, une prise d'essai de 30g devra être appliquée pour la méthode de référence, quelle que soit la prise d'essai prévue par la méthode alternative (ex. 30g pour la méthode de référence vs. 375g pour la méthode alternative).

Etude de sensibilité (§ 5.1.3)

Sélection des catégories à utiliser (§ 5.1.3.1)

Les analyses porteront sur des échantillons naturellement ou artificiellement contaminés par le microorganisme cible et non contaminés, appartenant à différentes catégories alimentaires, représentatives des produits habituellement soumis à ce type d'analyse (cf. annexe A de la norme EN ISO 16140-2). L'origine des échantillons doit être la plus variée possible afin de limiter les biais liés aux spécialités alimentaires.

Les types et catégories listés dans l'annexe 3 du présent document ne sont donnés qu'à titre d'exemple et pourront être définis différemment en fonction du besoin du fabricant.

Dans le cas où des **catégories « mixtes »** sont proposées à la validation, celles-ci seront acceptées sous réserve de proposer au moins un total de 5 catégories de produits alimentaires.

Les différentes **options de contamination**, à appliquer par ordre de priorité, sont (cf. annexe B de la norme EN ISO 16140-2) :

- ➔ 1ère option : Echantillons naturellement contaminés
- ➔ 2ème option : Contamination par mélange
- ➔ 3ème option : Contamination artificielle (« seeding » ou « spiking »)
- ➔ 4ème option : Matériau de référence

S'il n'est pas possible d'obtenir un nombre suffisant d'aliments naturellement contaminés dans chacune des catégories, il sera possible de recourir à des contaminations artificielles. Le Laboratoire expert devra **justifier** de la difficulté à mettre en œuvre des échantillons naturellement contaminés.

Pour ***Listeria*** et ***Salmonella***, le Bureau Technique a fixé un seuil à ne pas dépasser, pour les échantillons artificiellement contaminés :

- *Listeria* (spp. et *monocytogenes*): 50% toutes catégories de produits confondues
- *Salmonella* : Echantillons alimentaires (couvert par la norme EN ISO 6579) : 90% toutes catégories confondues (soit 10% minimum d'échantillons positifs naturellement contaminés) ;

  Echantillons d'environnement de production primaire (couvert par la norme NF EN ISO 6579) : 75% toutes catégories de produits confondues (soit 25% minimum d'échantillons naturellement contaminés, avec au maximum 4 échantillons naturellement contaminés issus du même élevage).

NOTE : Si la demande de validation est faite pour une catégorie ou une matrice seulement, le Bureau Technique examine au cas par cas, lors de la présentation du projet d'étude comparative, les exigences concernant les taux de contamination naturelle. Il en est de même pour les méthodes de détection d'autres microorganismes que les Listeria et les Salmonella.

Les protocoles de contamination croisée et de contamination artificielle (« spiking » et « seeding ») sont précisés ci-après (cf. annexe C de la norme EN ISO 16140-2) :

– **C.1 Contamination croisée**

Applicable aux matrices homogénéisables.

Plan expérimental :
- Produit naturellement contaminé dilué au min. au 1/5 si le produit est de même nature (viande de bœuf crue dans viande de bœuf crue)
- Produit naturellement contaminé dilué au min. au 1/10 si le produit est de même type (viande de porc crue dans viande de bœuf crue)
- Produit de même type (avec cohérence dans le type)
- Un produit naturellement contaminé ne doit pas servir plus de 6 fois dans la même étude
- Mélange à faire pour permettre une bonne homogénéisation (sans broyage)

Conserver l'échantillon cross-contaminé au minimum 1 journée à la température de conservation habituelle.

– **C.2 Contamination artificielle par « seeding »**

A privilégier hors cas de stress précisés pour le spiking (cf. C3 ci-après).

La contamination doit être si possible **≤ 3 UFC/prise d'essai**, avec 20% maximum d'échantillons contaminés entre 3 et 10 UFC/prise d'essai. Ce taux de contamination pourra cependant être ajusté pour des matrices et ou germes difficiles pour permettre l'obtention de résultats positifs. Le Laboratoire expert devra documenter ces cas dans le rapport d'étude.

– **C.3 Contamination artificielle par « spiking »**

A maintenir en particulier dans le cas des produits transformés (stress par Traitements Thermiques (TT) ou pH), et dans le cas des échantillons de l'environnement de production.

La contamination doit être **≤ 5 UFC/prise d'essai**, avec 20% maximum d'échantillons contaminés entre 5 et 10 UCF/prise d'essai (au-dessus non accepté). Ce taux de contamination pourra cependant être ajusté pour des matrices et ou germes difficiles pour permettre l'obtention de résultats positifs. Le Laboratoire expert devra documenter ces cas dans le rapport d'étude.

Le Laboratoire expert doit décrire puis démontrer le stress de la souche au moment de l'ensemencement (par comparaison des dénombrements obtenus sur milieux sélectifs et non sélectifs : une différence de 0,5 log minimum est attendue. Le Laboratoire expert devra préciser le(s) milieu(x) utilisé(s).

De manière générale, le Bureau Technique recommande que les sources de contamination artificielle des échantillons soient variées. La même souche et le même stress ne pourront pas être utilisés pour tous les produits d'une même catégorie. Une même souche ne peut pas être utilisée plus de 6 fois au total. Les souches doivent majoritairement être d'origine alimentaire. L'origine des souches doit être connue et renseignée. Les souches doivent être représentatives de celles les plus couramment présentes dans les catégories testées et leur origine doit être adaptée au type de produit contaminé.

La **méthode** de contamination et les **niveaux** de contamination devront permettre d'obtenir des échantillons dont le comportement est identique à celui d'échantillons naturellement contaminés.

Dans le cas des **études « non appariées »** (bouillons séparés) quand les temps d'incubation sont différents entre les 2 méthodes, le démarrage simultané des études devra être privilégié dans la mesure du possible.

Les **durées d'incubation** des bouillons retenues pour la réalisation des essais pour la méthode alternative sont les durées minimales spécifiées dans le protocole. La durée minimum d'incubation sera également utilisée pour la méthode de référence dans la mesure du possible. Si les limites sont étendues, les essais à la limite supérieure pourront être discutés. Les évolutions de résultats entre temps minimum et temps maximum devront être documentées pour les plages d'incubation large.
Pour les protocoles avec une durée d'incubation du bouillon inférieure à 24 heures :

- Cas des méthodes boites : les 2 limites inférieure et supérieure seront à tester au-dessus de 6 heures d'écart.
- Méthodes basées sur un autre principe : les 2 limites inférieure et supérieure seront à tester au-delà de 8 heures d'écart.

Si le protocole de la méthode alternative prévoit une étape de **conservation au froid** (durée définie par le fabricant), l'étude de sensibilité devra être refaite après passage au froid. Dans le cas de la conservation des bouillons, tous les échantillons positifs (artificiellement et naturellement contaminés), ainsi que les échantillons présentant des résultats douteux, devront être retestés. Dans le cas de la conservation des boites, tous les échantillons positifs et négatifs devront être retestés.

NOTE : Les cas suivants de conservation ne requièrent pas d'essais de validation pour être validés :

- *Possibilité de conserver les plaques avec extraits d'ADN à 4°C pendant 24 heures maximum avant de procéder au test ;*
- *Possibilité de conserver les extraits d'ADN à -20°C pendant plusieurs mois ;*
- *Pour les méthodes L. monocytogenes, possibilité d'initier une confirmation après conservation 48 heures du bouillon Fraser 1/2 (cas où le test a déjà été effectué et conservation du bouillon en parallèle en vue de la confirmation).*

L'utilisation d'un neutralisant et le mode de préparation des échantillons d'environnement doivent être précisés autant que possible par le Laboratoire expert dans le rapport d'étude (type de support de prélèvement, de surface prélevée, mode et taux de dilution du support …).

Nombre d'échantillons (§ 5.1.3.2)

Pour chaque **catégorie**, un minimum de 60 échantillons (positifs et négatifs) sont à tester. Chaque catégorie doit être composée de 3 types, avec au moins 20 échantillons (positifs et négatifs) pour chaque type. Pour chaque type, un minimum de 7 échantillons positifs est à tester.

Pour chaque **protocole d'enrichissement spécifique** de la méthode alternative, le même nombre d'échantillons que pour une catégorie sera à tester.

Pour les **études *Listeria* genre**, il est demandé de respecter par catégorie une proportion d'au moins 15 à 25 échantillons contaminés en *Listeria* spp. (seule ou en mélange avec *Listeria monocytogenes*). Dans le cas de méthode validée à la fois sur les paramètres *Listeria* genre et *Listeria monocytogenes*, cette proportion peut être abaissée.

Résultat de la méthode alternative et confirmation (§ 5.1.3.3)

Le Laboratoire expert devra **systématiquement réaliser les étapes suivantes de confirmation pour** la méthode alternative :

- ➔ En 1ère confirmation : Pour tous les échantillons **positifs et négatifs** (excepté cas des méthodes boites), en appliquant les tests de confirmation de la méthode de référence et ceux proposés par le fabricant. Dans le cas de la validation d'étape de conservation au froid, on appliquera un des tests spécifiques proposés par le fabricant.

- ➔ En 2ème confirmation : Pour les échantillons **négatifs** uniquement (y compris les méthodes boites) :
  - Si la méthode alternative n'a pas de bouillon d'enrichissement secondaire, il faudra procéder à une sub-culture du bouillon de la méthode alternative dans le bouillon secondaire de la méthode de référence (exemple : *Listeria*). Cas particulier des études salmonelles : le bouillon secondaire utilisé sera uniquement le RVS.
  - Si la méthode alternative a un bouillon d'enrichissement secondaire, sa durée d'incubation devra être prolongée, si nécessaire, pour atteindre celle du bouillon secondaire de la méthode de référence.
  - Si les 2 méthodes ont une seule étape d'enrichissement, et que le temps d'incubation de la méthode alternative est plus court, il faudra prolonger l'incubation jusqu'au temps minimum de la méthode de référence.

Calculs et interprétation pour la sensibilité (§ 5.1.3.4)

Pour la validation de méthodes basées sur le principe de croissance sur milieu gélosé, les éléments suivants doivent être renseignés dans les résultats bruts :

- niveau de flore annexe : absence / bas / élevé
- aspect des colonies cibles si atypiques : micro-colonie, taille, couleur, forme, halo, etc.
- nécessité de ré-isolement ou pas
- présence de moins de 5 colonies caractéristiques (renseigner le nombre)

Pour les autres principes de méthodes, il est recommandé d'apporter des précisions si possible sur le niveau de signal du germe cible (Ct, Tm et les inhibitions pour les méthodes PCR, agglutination pour les tests Latex, intensité des colorations pour les tests immuno-chromatographiques sur bandelettes - « lateral flow » -, etc.).

Des critères d'acceptabilité sont fixés par la norme EN ISO 16140-2. Si les critères ne sont pas remplis pour l'ensemble des catégories testées, il est possible de retester une catégorie ou un type. Les 2 séries de résultats devront être présentées dans le dossier, pour discussion en Bureau Technique (données à ne pas consolider).

Etude du niveau de détection relatif (§ 5.1.4)

L'objectif est de déterminer la contamination minimale détectable dans un aliment.

Sélection des catégories, nombre d'échantillons et réplicats testés (§ 5.1.4.1)

Se référer à l'annexe A de la norme EN ISO 16140-2 pour le choix des catégories et types de produits recommandés par germe cible. L'annexe 3 du présent document n'est donnée qu'à titre d'exemple. D'autres types/catégories pourront être définis en fonction du besoin du fabricant.

Les échantillons doivent être artificiellement contaminés. Les procédures de préparation des échantillons sont précisées en annexe C de la norme EN ISO 16140-2. En particulier, il est recommandé de privilégier des inoculations dans la masse (« Bulk inoculation » **en cas d'étude combinée AOAC**). Il est également possible de réaliser des contaminations en sac (« Individual Bag »). Le niveau de flore associée de la matrice sera déterminé.

Il est recommandé d'appliquer les **stress** suivants (définis en fonction des procédés industriels appliqués lors de la fabrication des produits) :

- Produits crus : Inoculation en « seeding » minimum 48 heures à 4°C (ne pas laisser trop longtemps)
- Surgelés : Inoculation en « seeding » pendant 2 semaines à -20°C
- Produits cuits (coules d'œuf pasteurisés, terrines) : Soit inoculation en « seeding » avec stockage à 4°C, soit en « spiking » avec traitement thermique de la souche et évaluation du stress (**si étude commune AOAC**)
- Poudres / produits déshydratés en lyophilisés : Réaliser de préférence des inoculations en « seeding » avec une souche lyophilisée ou dessiquée avec stockage 2 semaines minimum (en fonction du produit testé) à température de conservation du produit (généralement température ambiante). Possibilité également de réaliser du « spiking » avec traitement thermique de la souche et évaluation du stress.
- Production primaire : Inoculation dans la matrice et stockage 24 heures à température ambiante.
- Eau de process ou surface : Inoculation en « seeding » pendant 48 heures à 4°C.

Le milieu utilisé pour l'étalonnage, ainsi que l'ensemble des protocoles de contaminations, doivent être soumis à l'avis du Bureau Technique, lors de la présentation du projet d'étude comparative. Ils devront aussi être précisés dans le rapport d'étude et dans le rapport de synthèse de l'étude de validation.

Trois niveaux de contamination sont à tester. Le taux fort doit correspondre à 3 à 5 fois le taux faible.

Calculs et interprétation de la RLOD (§ 5.1.4.2)

Se référer à la norme EN ISO 16140-2.

Etude d'inclusivité et d'exclusivité (§ 5.1.5)

NOTE : Les données publiées sur la méthode alternative, obtenues selon les exigences de la norme EN ISO 16140-2, peuvent être utilisées par le Laboratoire expert pour renseigner ce critère.

Dans le cas d'une demande d'extension portant sur l'ajout de tests de confirmation, seul ce paramètre se verra renseigner, sous réserve d'avis préalable du Bureau Technique.

Sélection et nombre de souches (§ 5.1.5.1)

Se référer à l'annexe E de la norme EN ISO 16140-2 pour les critères de choix des microorganismes.

Pour les études Salmonelles, le Bureau Technique a établi une liste minimum de souches cibles et non cibles à tester cf. annexe 4). La liste devra être complétée par le Laboratoire expert pour atteindre les exigences requises et soumise à avis du Bureau Technique. Un même sérovar de *Salmonella* ne devra pas être testé plus de 2 fois, sauf sur avis particulier du Bureau Technique.

Inoculation des souches cibles (inclusivité) (§ 5.1.5.2)

Pour les essais, le protocole le plus sélectif de la méthode alternative devra être mis en œuvre.

Dans le cas des méthodes alternatives basées sur un test ELISA, proposant un test Latex en confirmation, le Laboratoire expert devra tester 150 souches cibles. Le Bureau Technique se réserve le droit de demander des compléments d'essai dans d'autres cas, en fonction des principes proposés.

Inoculation des souches non cibles (exclusivité) (§ 5.1.5.3)

Pour les essais, un bouillon d'enrichissement non sélectif sera utilisé.
Dans le cas des méthodes alternatives basées sur un test ELISA, proposant un test Latex en confirmation, le Laboratoire expert devra tester 100 souches non cibles. Le Bureau Technique se

réserve le droit de demander des compléments d'essai dans d'autres cas, en fonction des principes proposés.

Tester des salmonelles du groupe N en exclusivité pour les méthodes *E. coli* O157.

Expression et interprétation des résultats (§ 5.1.5.4)

Se référer à l'EN ISO 16140-2.

Les résultats obtenus, pour chacun des tests de confirmation prévus dans le protocole de routine de la méthode alternative, seront à renseigner dans le rapport d'étude.

Pour la validation de méthodes basées sur le principe de croissance sur milieu gélosé, les éléments suivants doivent être renseignés dans les résultats bruts :
- aspect des colonies non cibles
- aspect des colonies cibles si atypiques : micro-colonie, taille, couleur, forme, halo, etc.
- présence de moins de 5 colonies caractéristiques (nombre)

Pour les autres principes de méthodes, il est recommandé d'apporter si possible des précisions sur le niveau de signal du germe cible (Ct, Tm et inhibitions pour les méthodes PCR, agglutination pour les tests Latex, intensités des colorations pour les tests immuno-chromatographiques sur bandelettes - « lateral flow », etc.).

Etude de praticabilité de la méthode alternative (exigence spécifique)

Il s'agit d'une exigence particulière du Bureau Technique, non demandée par la norme EN ISO 16140-2.

Une étude de praticabilité / adaptabilité, comportant 4 critères, sera réalisée.
Pour chacun de ces critères, ont été définis le mode de communication de ce critère auprès de l'utilisateur et le mode de contrôle de ce critère.
En effet certains critères nécessitent une communication sur l'emballage ou la notice technique alors que d'autres nécessitent une communication dans le rapport de synthèse.

Les données résultant de cette étude de praticabilité seront intégrées dans le rapport d'étude comparative.

	Critères à contrôler	Mode de communication du critère auprès des utilisateurs	Mode de contrôle du critère par le Laboratoire expert
1	Conditions de stockage des éléments (+ péremption des produits non ouverts)	Emballage ou notice	Vérification que les conditions existent
2	Modalités d'utilisation après première utilisation (en particulier existence de dates limites)	Emballage ou notice	Vérification que les modalités existent
3	Délai d'obtention des résultats	Rapport d'étude et de synthèse	Etablissement de 2 cycles décrivant chaque étape de la méthode uniquement en termes de temps : -1er cycle: échantillons négatifs - 2ème cycle: échantillons positifs
4	Etapes communes avec la méthode de référence	Rapport d'étude et de synthèse	Identification des étapes

Etude interlaboratoires (§ 5.2)

Considérations générales (§ 5.2.1)

L'objectif de l'étude interlaboratoires est de déterminer l'écart de sensibilité entre les deux méthodes dans des conditions de reproductibilité interlaboratoires.

Protocole de mesure (§ 5.2.2)

Les laboratoires devront être en nombre suffisant pour présenter 10 jeux de données indépendants exploitables.

Deux études interlaboratoires menées sur un même produit peuvent être compilées uniquement après avis du Bureau Technique, et dans les conditions suivantes :

- qu'il existe 10 collaborateurs différents (dans certains cas particuliers à justifier, et sur avis préalable du Bureau Technique, il pourra être autorisé que le Laboratoire expert mette ses locaux à disposition de collaborateurs proches géographiquement pour la réalisation des essais. Il pourra être accepté de faire participer une équipe indépendante faisant partie du Laboratoire expert, sous réserve qu'elle n'ait pas participé à l'étude de validation)
- que les protocoles d'analyse soient exactement les mêmes entre les études,
- que toutes les études prévues dans le projet aient été réalisées,
- que les séries de résultats obtenus par chaque laboratoire collaborateur soient complètes.
- Que le nombre de séries de résultats issues de chacune des études soient statistiquement acceptables.

Se référer à l'annexe 5 du présent document pour les modalités générales d'organisation de l'étude interlaboratoires.
Les précisions ci-après sont apportées au protocole de mesure décrit dans la norme EN ISO 16140-2:

– Il est recommandé de sélectionner une matrice alimentaire pertinente par rapport au protocole d'analyse testé pour la méthode alternative et au microorganisme cible.
NOTE : Les produits liquides sont à éviter dans la mesure du possible car source d'intercontaminations (risque de fuites et transfert de bouteille à sac).

Dans le cas d'une étude menée sur une « large variété d'aliments », il est recommandé de tester l'une des matrices suivantes :

- *Salmonella* et *E. coli* O157 :H7 : Steak haché
- *Cronobacter* : Poudre de lait avec probiotiques ou lait liquide reconstitué à partir de poudre de lait avec probiotiques
- *Listeria* : Fromage frais (chèvre, brebis…)
- *Campylobacter* : Viande hachée de volaille ou porc.
NOTE : Pour limiter les problèmes de contamination naturelle dans le cas de la viande de volaille, il est recommandé de congeler la viande avant utilisation.

Il convient que l'échantillon contienne une microflore de fond représentative, qui doit également rester stable pendant le transport. Le laboratoire devra déterminer et indiquer les niveaux de flore associée dans la matrice.

Le niveau de flore annexe doit être d'au moins 10^3 UFC par mL ou par g, excepté avis particulier du Bureau Technique.

Dans le cas particulier d'essai sur échantillon de lait, la flore devra être naturellement d'origine laitière. Dans la pratique, le Laboratoire expert devra trouver un lait naturellement contaminé au taux requis ci-avant. Si le niveau de contamination est inférieur au niveau requis, soit il devra faire évoluer l'échantillon pour qu'il atteigne ce niveau de contamination, soit il devra y ajouter du lait cru (dans des proportions raisonnables).

– Trois niveaux de contamination sont à tester :
  - Un **niveau 0** (L_0) qui correspond au contrôle négatif : 0 UFC/prise d'essai.
  - Un **niveau intermédiaire** (L_1) qui doit être au niveau de détection relatif de manière à obtenir de préférence un recouvrement fractionnel. Il est recommandé des taux de contamination inférieur à < 3 UFC/ prise d'essai. Le Bureau Technique statuera en cas d'écart.
  - Un **niveau supérieur** (L_2) pour lequel il est recommandé d'inoculer entre 3 < x <10 UFC/ prise d'essai.

Un exemple de protocole de contamination et de dénombrement pour les faibles taux est présenté en annexe 6 du présent document.

Calculs et synthèse des données (§ 5.2.3)

Se référer à la norme EN ISO 16140-2.

Les résultats des collaborateurs pour lesquels des cas d'intercontamination sont avérés au niveau L_0 sont à exclure de l'interprétation, sur la base du critère suivant : 1 positif (1 positif confirmé ou 1 faux positif) maximum acceptable au L_0, par laboratoire et par méthode.

Interprétation des données (§ 5.2.4)

Se référer à la norme EN ISO 16140-2.

METHODES QUANTITATIVES (§ 6 de la norme EN ISO 16140-2)

Etude comparative des méthodes (§ 6.1)

Considérations générales (§ 6.1.1)

L'objectif de cette étude est de comparer les performances de la méthode alternative et de la méthode de référence, pour les paramètres suivants :

- Etude de justesse relative
- Profil d'exactitude

Et de déterminer les paramètres suivants pour la méthode alternative :

- Limites de quantification
- Inclusivité / Exclusivité
- Praticabilité

De manière générale, le Bureau Technique recommande que les sources de contamination artificielle des échantillons soient variées. La même souche et le même stress ne pourront pas être utilisés pour tous les produits d'une même catégorie. Les souches doivent majoritairement être d'origine alimentaire. L'origine des souches doit être connue et renseignée. Les souches doivent être représentatives de celles les plus couramment présentes dans les catégories testées et leur origine doit être adaptée au type de produit contaminé.

La **méthode** de contamination et les **niveaux** de contamination devront permettre d'obtenir des échantillons dont le comportement est identique à celui d'échantillons naturellement contaminés.

Etude de justesse relative (§ 6.1.2)

Sélection des catégories à utiliser (§ 6.1.2.1)

Pour le choix des catégories et des matrices, se référer à l'annexe A de la norme EN ISO 16104-2. Les types et catégories listés dans l'annexe 3 du présent document ne sont donnés qu'à titre d'exemple et pourront être définis différemment en fonction du besoin du fabricant.

Nombre d'échantillons (§ 6.1.2.2)

Les échantillons doivent permettre de couvrir le domaine de mesure habituel, toutes catégories confondues.

Calculs et interprétation (§ 6.1.2.3)

Toutes les données non interprétables (par l'une ou l'autre des méthodes) doivent figurer dans un tableau indépendant.

L'utilisation d'un neutralisant et le mode de préparation des échantillons d'environnement doivent être précisés par le Laboratoire expert dans le rapport d'étude.

Etude du profil d'exactitude (§ 6.1.3)

Sélection des catégories à utiliser (§ 6.1.3.1)

Pour le choix des catégories et des matrices, se référer à l'annexe A de la norme EN ISO 16104-2. Les types et catégories listés dans l'annexe 3 du présent document ne sont donnés qu'à titre d'exemple et pourront être définis différemment en fonction du besoin du fabricant.
Il n'y a pas de nécessité de stresser les souches pour les contaminations.

Nombre d'échantillons (§ 6.1.3.2)

A minima, tester 2 lots d'une même matrice inoculés par une même souche à 3 taux d'inoculation (bas, moyen, haut).

Pour des questions de dispersion des résultats et d'interprétation statistique (loi de poisson) aux faibles dénombrements, il est recommandé de débuter le taux bas d'inoculation à partir de 100 UFC/g pour les pathogènes et 300 UFC/g pour les autres germes.

Autant que possible, le taux haut doit refléter les taux de contamination des critères réglementaires ou avoir une valeur haute de :

- *E. coli* / Staphylocoques / *B. cereus* / Coliformes et Entérocoques : taux supérieur de 10^5 UFC/g
- Flore totale : 10^6 UFC/g
- *Listeria monocytogenes* : 3000 UFC/g
- *Listeria* spp. : 30000 UFC/g
- *Pseudomonas* : 10^6 UFC/g
- *Campylobacter* : 10^4 UFC/g
- Levures et moisissures : 10^5 UFC/g

Calculs et interprétation de l'étude du profil d'exactitude (§ 6.1.3.3)

Se référer à la norme EN ISO 16140-2.

Etude de la limite de quantification (§ 6.1.4)

Considérations générales (§ 6.1.4.1)

L'étude est uniquement applicable dans le cas des méthodes instrumentales (c'est-à-dire les méthodes non basées sur le comptage des colonies).

Sélection des catégories à utiliser (§ 6.1.4.2)

Pour le choix des catégories et des matrices, se référer à l'annexe 1 du présent document (catégories et type de produits alimentaires recommandés par germe cible).

Nombre d'échantillons (§ 6.1.4.3)

Se référer à la norme EN ISO 16140-2.

Calculs et Interprétation de l'étude de la limite de quantification (§ 6.1.4.4)

Se référer à la norme EN ISO 16140-2.

Etude d'inclusivité et d'exclusivité (§ 6.1.5)

Suivre les modalités décrites dans la norme EN ISO 16140-2.

Etude de praticabilité de la méthode alternative (exigence spécifique)

Il s'agit d'une exigence particulière du Bureau Technique non requise par la norme EN ISO 16140-2.
Une étude de **praticabilité / adaptabilité**, comportant 4 critères, sera réalisée **par le Laboratoire expert**.
Pour chacun de ces critères, ont été définis le mode de communication de ce critère auprès de l'utilisateur et le mode de contrôle de ce critère.
En effet certains critères nécessitent une communication sur l'emballage ou la notice technique alors que d'autres nécessitent une communication dans le rapport de synthèse.

Les données résultant de cette étude de praticabilité seront intégrées dans le rapport d'étude comparative.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère par le Laboratoire expert
1	Conditions de stockage des éléments (+ péremption des produits non ouverts)	emballage ou notice	vérification par le Laboratoire expert que les conditions existent
2	Modalités d'utilisation après première utilisation (en particulier existence de dates limites)	emballage ou notice	vérification par le Laboratoire expert que les modalités existent
3	Délai d'obtention des résultats	rapport et attestation	établissement de 2 cycles décrivant chaque étape de la méthode uniquement en termes de temps : - 1er cycle: échantillons négatifs - 2ème cycle: échantillons positifs
4	Etapes communes avec la méthode de référence	rapport	vérification par le Laboratoire expert

Etude interlaboratoires (§ 6.2)

Considérations générales (§ 6.2.1)

L'objectif de l'étude interlaboratoires est de déterminer l'écart de sensibilité entre les deux méthodes dans des conditions de reproductibilité interlaboratoires.

Protocole de mesure (§ 6.2.2)

Les laboratoires devront être en nombre suffisant pour présenter 8 jeux de données indépendants exploitables.

Se référer à l'annexe 5 du présent document pour les modalités générales d'organisation de l'étude interlaboratoires.

Les précisions ci-après sont apportées au protocole décrit dans la norme EN ISO 16140-2 :

– Il est recommandé de sélectionner une matrice alimentaire pertinente par rapport au protocole d'analyse testé pour la méthode alternative et au microorganisme cible.

  Dans le cas d'une étude sur une « large variété d'aliments », il est recommandé de tester les matrices suivantes :

  - *Pseudomonas* : fromage blanc
  - Staphylocoques : terrine de poisson, lait
  - Entérocoques / Coliformes : pâté ou jambon cuit ou lait pasteurisé avec flore annexe
  - *E. coli* : poêlées
  - *B. cereus* : purée ou soupe (pour bébé à reconstituer / ou pour adulte)

  Il convient que l'échantillon contienne une microflore de fond représentative, qui doit également rester stable pendant le transport. Le laboratoire devra déterminer et indiquer les niveaux de flore associée dans la matrice.
  Le niveau de flore annexe doit être d'au moins 10^3 UFC par mL ou par g, excepté avis particulier du Bureau Technique.

Dans le cas particulier d'essai sur échantillon de lait, la flore devra être naturellement d'origine laitière. Dans la pratique, le Laboratoire expert devra trouver un lait naturellement contaminé au taux requis ci-avant. Si la « non-contamination » est avérée, soit il devra faire évoluer l'échantillon pour qu'il atteigne ce niveau de contamination, soit il devra y ajouter du lait cru (dans des proportions raisonnables).

– Trois niveaux de contamination sont à tester :
  - Un **niveau 0** (L_0) qui correspond au contrôle négatif : 0 UFC/prise d'essai.
  - Un **taux minimum** pour lequel il est recommandé de débuter le à 500 UFC/ prise d'essai (excepté pour *Listeria* : débuter à 300 UFC/ prise d'essai), pour des questions de dispersion des résultats et d'interprétation statistique (loi de poisson) aux faibles dénombrements.
  - Un **niveau intermédiaire.**
  - Un **niveau supérieur** où le taux haut doit refléter autant que possible les taux de contamination des critères réglementaires ou avoir une valeur haute de :
    - *E. coli* / Staphylocoques / *B. cereus* / Coliformes et Entérocoques : taux supérieur de 10^5 UFC/g
    - Flore totale : 10^6 UFC/g
    - *Listeria monocytogenes* : 3000 UFC/g
    - *Listeria* spp : 30000 UFC/g
    - *Pseudomonas* : 10^6 UFC/g
    - *Campylobacter* : 10^4 UFC/g
    - Levures et moisissures : 10^5 UFC/g

Calculs, synthèse et interprétation des données (§ 6.2.3)

Se référer à la norme EN ISO 16140-2.

MODALITES D'INSTRUCTION PAR LE BUREAU TECHNIQUE DES ETUDES MENEES PAR LE LABORATOIRE EXPERT

Le Laboratoire expert est choisi par le demandeur parmi la liste des laboratoires qualifiés. Il doit l'informer à chaque étape de la réalisation des études et en cas de modifications par rapport au protocole préalablement fixé.
Il doit être qualifié par AFNOR Certification (ACE), après avis du Bureau Technique. Les modalités de qualification des laboratoires experts figurent dans les règles de certification NF102 (§ 2.4.1).

Notes générales

- Le Laboratoire expert doit présenter des études **finalisées** et ne pas hésiter à retarder la présentation de résultats d'études, si tel n'est pas le cas.

- ACE ne pourra inscrire à l'ordre du jour de chaque réunion que les dossiers (projets ou résultats) dont les rapports complets écrits sont disponibles à la date fixée au préalable. Ceci implique en particulier que seules les études terminées -dont les résultats sont connus à la date de rédaction de l'ordre du jour- pourront être présentées à la réunion correspondante. Toute étude non terminée à la date de rédaction de l'ordre du jour ne pourra être présentée à la session suivante et verra sa présentation reportée à une session ultérieure.

1 Présentation d'un projet d'étude comparative

Le Laboratoire expert doit établir un projet d'étude comparative. Celui-ci est adressé à AFNOR Certification par le Laboratoire expert, avant la date limite fixée par ACE (en général 3 à 4 semaines avant la réunion).

Le Laboratoire expert est convoqué avec le demandeur à la réunion du Bureau Technique par AFNOR Certification. Il doit présenter, avec un support visuel, le projet d'étude comparative qu'il a établi.

Lors de cette première étape, le Bureau Technique donne son avis sur :

- la possibilité d'appliquer la marque NF VALIDATION à la méthode alternative proposée,
- la méthode prise en référence,
- le projet d'étude comparative.

Deux **rapporteurs** sont nommés : ils sont choisis parmi les membres du Bureau Technique et étudieront plus particulièrement les dossiers dont ils ont été chargés.

Après la réunion, AFNOR Certification communique l'avis du Bureau Technique par courrier au demandeur, avec copie au Laboratoire expert et aux rapporteurs.

Le cas échéant, toutes les modifications relatives au projet d'étude comparative doivent être prises en compte par le Laboratoire expert, qui adresse à AFNOR Certification un projet modifié, si le Bureau Technique le demande.

2 Réalisation de l'étude comparative et présentation des résultats

Important : le délai compris entre la présentation du projet d'étude comparative et la présentation des résultats d'étude comparative ne doit pas excéder **1 an**.
Le Laboratoire expert doit prévenir AFNOR Certification à la date convenue (en général 4 semaines avant la date de la réunion du Bureau Technique), s'il est prêt à présenter les résultats de l'étude comparative.

Le rapport d'étude comparative doit être établi conformément au modèle disponible auprès d'AFNOR Certification, le cas échéant.

Le Laboratoire expert doit envoyer le **rapport d'étude comparative** (et ses éventuels compléments), ainsi que des **documents annexes** (projets de notices techniques…) à AFNOR Certification avant la date limite fixée par ACE (en général 3 à 4 semaines avant la réunion afin qu'elle puisse en assurer la diffusion auprès des membres du Bureau Technique).

AFNOR Certification convoque le Laboratoire expert avec le demandeur au Bureau Technique. Le Laboratoire expert doit présenter, avec un support visuel, le rapport d'étude comparative qu'il a établi.

Lors de cette 2ème étape, le Bureau Technique donne son avis sur les résultats obtenus lors de l'étude comparative.
Pour se faire, à l'issue de la présentation, une discussion a lieu en l'absence du demandeur et en présence du Laboratoire expert. Puis **un vote est réalisé** en l'absence du demandeur et du Laboratoire expert en tenant compte de l'ensemble des résultats de l'étude comparative.
Ce vote donne l'avis du Bureau Technique. Le résultat de ce vote détermine si les résultats de l'étude comparative sont acceptés.
Les résultats du vote sont communiqués au demandeur et au Laboratoire expert lors de la réunion.

Note : Les résultats sont acceptés à la majorité relative (le Président ayant voix prépondérante en cas de partage des voix). Sont comptabilisés les votes « Pour », « Contre » et « Abstentions ». Les votes « Contre » et « Abstentions » doivent être systématiquement motivés à l'occasion d'un tour de table.
Le nombre d'abstentions ne doit pas dépasser 50% des présents votants. Dans le cas contraire, un deuxième tour sera réalisé, au cours duquel seuls les votes « Pour » sont exprimés. Le second tour est départagé à la majorité relative.

Le Bureau Technique peut demander des compléments d'étude comparative sur un ou plusieurs des critères. Ceci peut éventuellement retarder le démarrage de l'étude interlaboratoires en fonction de l'importance de ces compléments.

Si les résultats complets de l'étude comparative (incluant des compléments le cas échéant) sont acceptés, l'étude interlaboratoires peut être réalisée.

Dans ce cas, le Laboratoire expert doit donc également présenter, lors de cette réunion, un projet d'étude interlaboratoires. Le Bureau Technique donne son avis sur le projet d'étude interlaboratoires. La liste des laboratoires collaborateurs est incluse dans le projet ou est diffusée à AFNOR Certification après la réunion pour la soumettre à avis du Bureau Technique avant le démarrage de l'étude.

Toutes les modifications relatives au projet d'étude interlaboratoires doivent être prises en compte par le Laboratoire expert qui adresse ultérieurement à AFNOR Certification un projet modifié, si le Bureau Technique le demande.

Après la réunion, AFNOR Certification communique l'ensemble des avis pris en réunion, par courrier, au demandeur, avec copie au Laboratoire expert et aux rapporteurs.

3 Réalisation de l'étude interlaboratoires et présentation des résultats

Important : Le délai compris entre la présentation du projet d'étude interlaboratoires et la présentation des résultats d'étude interlaboratoires ne doit pas excéder **1 an**.

Le Laboratoire expert doit prévenir AFNOR Certification à la date convenue (en général 4 semaines avant la date de la réunion du Bureau Technique), s'il est prêt à présenter les résultats de l'étude interlaboratoires.

Le rapport d'étude interlaboratoires doit être établi conformément au modèle disponible auprès d'AFNOR Certification.

Le Laboratoire expert doit envoyer le **rapport d'étude interlaboratoires** (et ses éventuels compléments), ainsi que des **documents annexes** (projets de notices techniques…) à AFNOR Certification avant la date limite fixée par ACE (en général 3 à 4 semaines avant la réunion afin qu'elle puisse en assurer la diffusion auprès des membres du Bureau Technique).

AFNOR Certification convoque le Laboratoire expert avec le demandeur au Bureau Technique.

Le Laboratoire expert présente, avec support visuel, le rapport d'étude interlaboratoires qu'il a établi.

Lors de cette 3ème étape, le Bureau Technique donne son avis sur les résultats de l'étude interlaboratoires.

Pour se faire, à l'issue de la présentation, une discussion a lieu en l'absence du demandeur et en présence du Laboratoire expert. Puis **un vote est réalisé** en l'absence du demandeur et du Laboratoire expert en tenant compte de l'ensemble des résultats de l'étude (préliminaire et interlaboratoires).

Ce vote donne l'avis final du Bureau Technique et tient compte de l'ensemble des résultats présentés (étude comparative et interlaboratoires). Le résultat de ce vote détermine si la méthode peut être validée ou non.

Les résultats du vote sont communiqués au demandeur lors de la réunion.

Note : Les résultats sont acceptés à la majorité relative (le Président ayant voix prépondérante en cas de partage des voix). Sont comptabilisés les votes « Pour », « Contre » et « Abstentions ». Les votes « Contre » et « Absentions » doivent être systématiquement motivés à l'occasion d'un tour de table.

Le nombre d'abstentions ne doit pas dépasser 50% des présents votants. Dans le cas contraire, un deuxième tour sera réalisé, au cours duquel seuls les votes « Pour » sont exprimés. Le second tour est départagé à la majorité relative.

Après la réunion, AFNOR Certification communique l'ensemble des avis pris en réunion, par courrier, au demandeur, avec copie au Laboratoire expert et aux rapporteurs.

4 Elaboration du certificat NF VALIDATION

AFNOR Certification prend la décision de certifier la méthode alternative, sur avis final émis par le Bureau Technique.

Un courrier d'avis de décision est émis par AFNOR Certification suite à la réunion correspondante, attestant officiellement de la certification de la méthode. Ce courrier est émis, sous réserve de compléments éventuels qui seraient demandés par le Bureau Technique dans les délais spécifiés par ACE.

Puis, AFNOR Certification rédige le certificat sur la base du modèle défini par le Bureau Technique, le cas échéant. Les différentes rubriques sont complétées selon les recommandations que ce dernier a pu émettre, au cours des différentes étapes de présentation du dossier (champ d'application, restriction(s) éventuelles…). Eventuellement, AFNOR Certification peut consulter le Bureau Technique pour assurer que les éléments reportés conviennent.

Les références de notices techniques nécessaires à la mise en œuvre de la méthode alternative sont reportées sur le certificat NF VALIDATION (à l'exception des références de notices des tests de confirmation). Les instruments spécifiques et logiciels de calculs associés sont également référencés sur le certificat NF VALIDATION.

Le certificat est édité en français et en anglais. Chaque certificat est signé par le Responsable légal d'AFNOR Certification. La version française du certificat fait foi.

Le titulaire reçoit l'original du certificat. Une copie est mise à disposition du public sur le site http://nf-validation.afnor.org.

5 Rapport de synthèse des études

Comme suite à la décision de certification de validation initiale, de reconduction ou d'extension d'une méthode alternative, le Laboratoire expert doit établir un rapport de synthèse de l'étude (comparative et interlaboratoires).

Ce document reprend les éléments importants de ces études. Le Laboratoire expert doit tenir compte, pour la rédaction du rapport de synthèse, des commentaires émis lors des réunions du Bureau Technique sur les rapports d'étude intermédiaires (comparative et interlaboratoires).

Il a pour objectif de pouvoir être diffusé à toute personne en faisant la demande. Un modèle est disponible auprès d'AFNOR Certification, le cas échéant. Tous les rapports de synthèse publiés sont mis à disposition du public sur le site http://nf-validation.afnor.org. Aussi le titulaire doit en valider le contenu, quant à la confidentialité des éléments qui y figurent.

Ce document doit être adressé par le Laboratoire expert à AFNOR Certification au plus tard dans les **2 mois suivant** l'avis final du Bureau Technique.

6 Durée de la certification

La durée de certification sous marque NF VALIDATION est de 4 ans, sauf en cas de sanction prise à son encontre.

Si des modifications sont apportées à la méthode alternative et nécessitent des essais, il s'agira d'une étude d'extension.

En cas de modification de la méthode de référence ou du protocole de validation pendant la période de certification, la décision reste valable jusqu'à la date d'expiration prévue initialement. Le dossier devra être mis à jour au plus tard à la prochaine reconduction.

7 Cas d'une extension/modification

Dans le cas où une étude complémentaire doit être réalisée, deux rapporteurs sont nommés lors d'une réunion du Bureau Technique suite à la présentation du projet d'étude correspondant.

Le rapport de synthèse initial devra être complété par la synthèse des compléments d'étude effectués.

8 Cas de la reconduction

Les modalités de l'étude de reconduction et le contenu du dossier de reconduction sont précisés dans les règles de certification (§ 5.3.2).

Dans le cas où aucun complément d'étude n'est nécessaire, les deux rapporteurs sont idéalement nommés avant la réunion correspondante, lors d'une session précédente ou via consultation électronique.

Dans le cas où une étude complémentaire doit être réalisée, les deux rapporteurs sont nommés au plus tard lors de la réunion du Bureau Technique où le projet d'étude correspondant aura été présenté.

Le rapport de synthèse devra inclure un rappel des principaux résultats obtenus lors des précédentes études de validation, et de la synthèse des compléments d'étude effectués le cas échéant.

Annexe 1

Modalités de transition pour le passage à la norme EN ISO 16140-2 (2016)

Délai de transition applicable

Pour tous les dossiers (validation / extension / reconduction) :

- Au lancement du vote ISO/FDIS (19 mars 2015) :
  - Possibilité de démarrer les instructions selon le protocole ISO/FDIS 16140-2 :2015 ou de maintenir des études de validation selon la norme EN ISO 16140 :2003
  - En fonction de la version de protocole appliqué, édition des certificats selon la norme EN ISO 16140 :2003 ou ISO/FDIS 16140-2 :2015
- Après publication de la nouvelle norme au niveau français (septembre 2016) :
  - Application obligatoire du nouveau protocole pour tous les dossiers
  - Edition des certificats selon la norme NF EN ISO 16140-2 :2016

Compléments d'essais requis pour la mise à jour selon EN ISO 16140-2 des dossiers antérieurement validés *(Attendus au plus tard à la prochaine reconduction de validation de la méthode alternative, la mise à jour anticipée du dossier étant également possible)*

METHODES QUALITATIVES

- **Etude de sensibilité**

Il est possible soit de conserver les catégories déjà testées, et de refaire l'interprétation selon la nouvelle norme EN ISO 16140-2, soit de reclassifier les produits selon les nouvelles catégories recommandées dans la norme EN ISO 16140-2.

Dans les 2 cas :

- Pour maintenir comme revendication une validation pour « **tous produits d'alimentation humaine** » (vaste gamme d'aliments selon les termes de la norme EN ISO 16140-2), au moins 5 catégories d'alimentation humaine devront avoir été testées.
- Les **catégories mixtes** d'aliments seront autorisées uniquement pour un champ « tous produits d'alimentation humaine », c'est-à-dire à la condition de disposer de 5 catégories de produits d'alimentation humaine.
- Les catégories testées, autres que destinées à l'alimentation humaine (alimentation animale, environnement), seront comptées comme des catégories additionnelles.

Rappel : La précédente version de norme EN ISO 16140 : 2003 permettait de revendiquer une validation pour « tous produits d'alimentation » en ne testant que 4 catégories d'alimentation humaine + la catégorie « échantillons de l'environnement ». Ce qui n'est plus possible dans la nouvelle norme EN ISO 16140-2.

Dans le cas où une nouvelle classification serait proposée, le Laboratoire expert devra optimiser autant que possible la répartition des échantillons pour limiter le nombre d'essais à répéter.

Parmi les données antérieures de validation, le Laboratoire expert ne pourra retenir que les échantillons avec des taux de contamination conformes à ceux spécifiés au chapitre Sélection des catégories à utiliser (§ 5.1.3.1) du présent document. S'il manque des échantillons pour une catégorie, il faudra compléter les essais pour atteindre le nombre d'échantillons requis (cf. chapitre Nombre d'échantillons (§ 5.1.3.2) du présent document). Pour chaque protocole d'enrichissement spécifique de la méthode alternative, le même nombre d'échantillons que pour une catégorie est à atteindre.

Pour la catégorie "échantillons de l'environnement", si le nombre d'échantillons issus des précédentes études de validation est excédentaire par rapport au nombre d'échantillons testés pour les autres catégories ou protocoles, il est possible pour rétablir l'équilibre d'éliminer des échantillons de l'environnement. Dans ce cas, retenir arbitrairement pour l'interprétation les 30 premiers échantillons

positifs et négatifs (ensemble des données brutes à conserver dans le rapport, en identifiant celles exploitées de celles éliminées).

Les dossiers seront traités au cas par cas par le Bureau Technique. Le Laboratoire expert devra présenter la répartition proposée des catégories et types de produits (avec exemples de matrices) dès le projet d'étude de reconduction.

- **Etude de la RLOD**

Conserver les données de LOD relative (même si le protocole de la norme EN ISO 16140 :2003 prévoit des essais sans stress), et refaire l'interprétation selon la nouvelle norme EN ISO 16140-2.
Pour pouvoir revendiquer une validation pour « tous produits d'alimentation humaine », il faudra avoir testé au moins 5 catégories d'alimentation humaine.

NOTE : Possibilité de récupérer ces données issues d'autres validations si obtenues avec la même méthode de référence, et conformément aux règles techniques en vigueur.

- **Etude d'inclusivité et d'exclusivité**

Pour les études salmonelles, il faudra en plus compléter l'étude d'inclusivité à 100 souches. Il serait envisageable d'exploiter des données provenant d'études AOAC, si obtenues conformément aux règles techniques du Bureau Technique.

NOTE : Le protocole le plus sélectif de la méthode alternative devra avoir été testé.

- **Etude interlaboratoires**

Conserver les données antérieures et les retraiter selon l'interprétation de la nouvelle norme.

NOTE :
- *Dans le cas où l'étude a été réalisée sur des échantillons de lait avec des niveaux de contamination inférieurs à 10^3 UFC/ml, les essais ne sont pas à refaire.*
- *Le critère sur le nombre maximum de faux positif au L0 précisé au § 5.2.3 du présent document n'est pas à appliquer dans ce cas.*

METHODES QUANTITATIVES

- **Justesse relative**

Compléter pour avoir 15 échantillons / catégories, et le cas échéant rajouter une catégorie pour pouvoir revendiquer une validation pour « tous produits d'alimentation humaine ». La première donnée des deux répétitions sera conservée pour les données existantes.

- **Profil d'exactitude**

A refaire dans sa globalité.

- **Inclusivité / Exclusivité**

Compléter pour atteindre 50 souches positives et 30 souches négatives (100 souches positives dans le cas de *Salmonella*).

- **Limite de quantification**

A faire pour les méthodes instrumentales.

- **Etude interlaboratoires**

Conserver les données antérieures et les retraiter selon l'interprétation de la nouvelle norme.

NOTE : Dans le cas où l'étude a été réalisée sur des échantillons de lait avec des niveaux de contamination inférieurs à 10^3 UFC/ml, les essais ne sont pas à refaire.

Annexe 2

Dispositions spécifiques pour la validation de méthodes alternatives pour la détection des STEC en comparaison à la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136

Confirmation des échantillons positifs (cas 2)

Les tests classiques de la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136 ne peuvent pas être appliqués pour la confirmation des échantillons PCR positifs par la méthode alternative. Le fabricant doit donc proposer a minima un "cas 2" de confirmation (cf. définition au § Conditions de confirmation des résultats positifs) et préciser dans la fiche technique la référence des réactifs utilisés pour l'étape de confirmation (à fournir dès la présentation du projet d'étude comparative).

Le texte à insérer dans la fiche technique est le suivant :

> « Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les échantillons rendus positifs à l'issue de l'étape de détection doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :
> - "Cas 2" (protocole(s) fourni(s) par le fabricant à décrire)
>
> En cas de résultat discordant (positif présomptif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits ci-avant), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu. En particulier, le protocole suivant (si applicable) a été testé lors de l'étude NF VALIDATION : *<protocole appliqué par le Laboratoire expert>* (et/ou) Le protocole suivant est recommandé : *<protocole du fabricant>* ».

Etude comparative (§ 5.1)

➢ **Etude de sensibilité (§ 5.1.3)**

Sélection des catégories à utiliser (§ 5.1.3.1) :

Privilégier les associations suivantes de « matrice/sérogroupe » :
- O103, O26 dans les produits laitiers
- O157, O145 dans les produits carnés
- O111 dans le cas des végétaux

Les essais sont à réaliser autant que possible sur des échantillons naturellement contaminés. Pour les STEC, le Bureau Technique n'a pas fixé de seuil minimal pour les échantillons naturellement contaminés. Le Laboratoire expert devra justifier de la difficulté à mettre en œuvre des échantillons naturellement contaminés. Il est donc possible de procéder à des contaminations artificielles. Les différentes options de contamination à appliquer sont précisées au § Sélection des catégories à utiliser (§ 5.1.3.1) du présent document.

Calculs et interprétation (§ 5.1.3.4) :

Pour la méthode de référence, ajouter dans les tableaux de résultats une colonne intermédiaire avec les résultats des cibles « *stx*/eae », afin de fournir une interprétation telle que décrite dans la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136 à son chapitre 10 (un exemple de tableau est fourni dans le modèle de rapport d'étude disponible sur demande auprès d'AFNOR Certification).

➢ **Etude de la RLOD (§ 5.1.4)**

Sélection des catégories, nombre d'échantillons et réplicats testés (§ 5.1.4.1) :

Il est nécessaire de tester 1 couple « matrice/souche » par catégorie et sérogroupe, avec les 5 sérogroupes représentés, en privilégiant les associations suivantes :
- O103, O26 dans les produits laitiers
- O157, O145 dans les produits carnés
- O111 dans le cas des végétaux

NOTE : Les 5 sérogroupes doivent être étudiés dans le cas d'une validation initiale, même si la demande ne porte que sur une matrice alimentaire. Dans le cas d'une extension du domaine d'application, retenir pour les essais le sérogroupe le plus pertinent par rapport à la matrice alimentaire testée.

- **Etude d'inclusivité et d'exclusivité (§ 5.1.5)**

Le Bureau Technique a établi une liste minimum de souches cibles et non cibles à tester présentée ci-après. La liste devra être complétée par le Laboratoire expert pour atteindre les exigences requises et soumise à avis du Bureau Technique.

Tableau de liste de souches cibles et non cibles.

[A insérer, en attente approbation liste LNR STEC]

Inclusivité :
Parmi les 50 souches à tester au total (tel que requis par la norme EN ISO 16140-2), tester :
- Au moins 5 souches pour les sérogroupes mineurs : O111 et O145
- Au moins 10 souches pour les sérogroupes majeurs : O26, O157 et O103

Sur l'ensemble des souches positives :
- Cibler les 2 gènes *stx*1 et *stx*2 et au moins les 3 variants les plus rencontrés (*stx*2a, *stx*2b, *stx*2c)
- Varier les origines de souches

Exclusivité
Parmi les 30 souches à tester, tester :
- Un panachage de souches *stx*$^+$/eae$^-$, *stx*$^-$/eae$^+$ (souches non pathogènes mais possédant un des gènes de virulence)
- *Citrobacter rodentium*

Etude interlaboratoires (§ 5.2)

Couple « matrice / souche » à tester : Steak haché (minimum 15% MG) contaminé en *E. coli* O26.

Concernant le transport des échantillons, il doit être adapté à ce pathogène et effectué dans le respect de la réglementation en vigueur sur le territoire concerné.

NOTE : Les échantillons contenant un E. coli producteur de vérotoxines confirmé sont à considérer comme des échantillons classifiés "UN2814 - Matière infectieuse pour l'homme", tandis que ceux pour lesquels la présence n'est pas confirmée (non testé ou positif présomptif non confirmé) sont à classer en "UN3373 - Echantillons de diagnostic".

Pour le choix des laboratoires collaborateurs, il est possible pour faciliter la mise en œuvre de l'étude de se baser sur la liste des "laboratoires agréés pour les analyses d'*E. coli* STEC dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle" par le Ministère français de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt pour les analyses officielles *E. coli* STEC (disponible sur le site http://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-et-reconnus-methodes-officielles-en-alimentation).

Déroulement de l'étude :

- Laboratoire expert : Envoi aux collaborateurs des échantillons contaminés.
- Collaborateurs :
  - Méthode de référence adaptée de l'XP CEN ISO/TS 13136 du Laboratoire expert :
    - Réalisation des enrichissements
    - Réalisation étape extraction + Mise en œuvre des confirmations par réalisation d'une IMS (O26) suivie d'un isolement sur gélose sélective et d'un test latex sur colonie après étape de purification sur gélose non sélective
    - Envoi au Laboratoire expert des extraits d'ADN obtenus + résultats de confirmation
  - Méthode alternative :
    - Protocole à appliquer dans son intégralité
    - Résultats PCR + Résultats de Confirmation à retourner au Laboratoire expert.

- Laboratoire expert :
  - Mise en œuvre des 2 méthodes (protocoles complets à appliquer)
  - Réalisation du test PCR sur les extraits retournés par les collaborateurs
  - Exploitation des résultats des 2 méthodes (avant/après confirmation)

Annexe 3

Catégories de produits et types de produits par germe cible, stress et modes de contamination associés (liste informative)

Se reporter au fichier Excel correspondant, disponible sur demande auprès d'AFNOR Certification.

Les types et catégories listés dans la présente annexe ne sont donnés qu'à titre d'exemple et pourront être définis différemment en fonction du besoin du Fabricant.

Annexe 4

Etude de sélectivité *Salmonella* - Listes de souches obligatoires

Souches cibles et non cibles à inclure obligatoirement dans la liste de souches à tester pour la validation de méthodes alternatives de détection des salmonelles. Les listes doivent être complétées pour atteindre les exigences spécifiques du présent document (cf. partie Etude d'inclusivité et d'exclusivité (§ 5.1.5)).

1 Inclusivité

Souches *Salmonella*

	GROUPE « O »	ESPECE	SOUS-ESPECE	SEROVAR	FORMULE
1	**2 (A)**	S. enterica	*enterica (I)*	Paratyphi A	1,2,12 : a : 1,5
2	**4 (B)**	S. enterica	*enterica (I)*	Paratyphi B	1,4,[5],12 : b : 1,2
3		S. enterica	*enterica (I)*	Typhimurium	1,4,[5],12 : i : 1,2
4		S. enterica	*enterica (I)*	Bredeney	1,4,12,27 : l,v : 1,7
5		S. enterica	*enterica (I)*	Heidelberg	1,4,[5],12 : r : 1,2
6		S. enterica	*enterica (I)*	Indiana	1,4,12 : z : 1,7
7		S. enterica	*enterica (I)*	Saintpaul	1,4,[5],12 : e,h : 1,2
8		S. enterica	*enterica (I)*	Derby	1,4,[5],12 : f,g : [1,2]
9	**6,7 (C)**	S. enterica	*enterica (I)*	Paratyphi C	6,7,[Vi] : c : 1,5
10		S. enterica	*enterica (I)*	Livingstone	6,7,14 : d : l,w
11		S. enterica	*enterica (I)*	Mbandaka	6,7,14 : z10 : e,n,z15
12		S. enterica	*enterica (I)*	Virchow	6,7,14 : r : 1,2
13		S. enterica	*enterica (I)*	Infantis	6,7,14 : r : 1,5
14		S. enterica	*enterica (I)*	Rissen	6,7,14 : f,g : -
15		S. enterica	*enterica (I)*	Montevideo	6,7,14 : g,m,[p],s : [1,2,7]
16	**8 (C)**	S. enterica	*enterica (I)*	Manhattan	6,8 : d : 1,5
17		S. enterica	*enterica (I)*	Hadar	6,8 : z10 : e,n,x
18		S. enterica	*enterica (I)*	Blockley	6,8 : k : 1,5
19		S. enterica	*enterica (I)*	Kottbus	6,8 : e,h : 1,5
20	**9 (D)**	S. enterica	*enterica (I)*	Typhi	9,12,[Vi] : d : -
21		S. enterica	*enterica (I)*	Napoli	1,9,12 : l,z13: e,n,x
22		S. enterica	*enterica (I)*	Enteritidis	1,9,12 : [f],g,m,[p] : [1,7]
23		S. enterica	*enterica (I)*	Dublin	1,9,12,[Vi] : g,p : -
24		S. enterica	*enterica (I)*	Gallinarum	1,9,12 : - : -
25	**3,10 (E)**	S. enterica	*enterica (I)*	London	3,10[15] : l,v : 1,6
26		S. enterica	*enterica (I)*	Anatum	3,10[15][15,34] : e,h : 1,6
27		S. enterica	*enterica (I)*	Regent	3,10 : f,g,[s] : [1,6]
28	**1,3,19 (E)**	S. enterica	*enterica (I)*	Senftenberg	1,3,19 : g,[s],t : -
29	**13 (G)**	S. enterica	*enterica (I)*	Kedougou	1,13,23 : i : l,w
30		S. enterica	*enterica (I)*	Havana	1,13,23 : f,g,[s] : -
31	**18 (K)**	S. enterica	*enterica (I)*	Cerro	6,14,18 : z4,z23 : [1,5]
32	**48 (Y)**	S. enterica	*arizonae (IIIa)*	S.III a	48 : z4,z23 : -
33	**51**	S. enterica	*arizonae (IIIa)*	S.III a	51 : z4,z23 : -
34	**38**	S. enterica	*diarizonae (IIIb)*	S.III b	38 : l,v : z53
35	**61**	S. enterica	*diarizonae (IIIb)*	S.III b	61 : k : 1,5,7

	GROUPE « O »	ESPECE	SOUS-ESPECE	SEROVAR	FORMULE
36	**Variants de *Salmonella* Typhimurium**	S. enterica	*enterica (I)*	S.I	1,4,[5],12 : i : -
37		S. enterica	*enterica (I)*	S.I	1,4,[5],12 : - : 1,2
38		S. enterica	*enterica (I)*	S.I	1,4,[5],12 : - : -
39	**4 (B)**	S. enterica	*enterica (I)*	Agona	1,4,[5],12 : f,g,s : [1,2]
40		S. enterica	*enterica (I)*	Chester	1,4,[5],12 : e,h : e,n,x
41		S. enterica	*enterica (I)*	Stanley	1,4,[5],12,[27] : d : 1,2
42		S. enterica	*enterica (I)*	Schwarzengrund	1,4,12,27 : d : 1,7
43		S. enterica	*enterica (I)*	Abortusequi	4,12 : - : e,n,x
44		S. enterica	*enterica (I)*	Abortusovis	4,12 : c : 1,6
45	**7 (C_1)**	S. enterica	*enterica (I)*	Braenderup	6,7,14 : e,h : e,n,z_{15}
46		S. enterica	*enterica (I)*	Bareilly	6,7,14 : y : e,n,x
47		S. enterica	*enterica (I)*	Lille	6,7,14 : z_{38} : -
48		S. enterica	*enterica (I)*	Oranienburg	6,7,14 : m,t : [z_{57}]
49		S. enterica	*enterica (I)*	Thompson	6,7,14 : k : 1,5
50		S. enterica	*enterica (I)*	Tennessee	6,7,14 : z_{29} : [1,2,7]
51	**8 (C_2-C_3)**	S. enterica	*enterica (I)*	Muenchen	6,8: d : 1,2
52		S. enterica	*enterica (I)*	Newport	6,8,20 : e,h : 1,2
53		S. enterica	*enterica (I)*	Kentucky	8,20 : i : z_6
54	**9 (D_1)**	S. enterica	*enterica (I)*	Panama	1,9,12 : l,v : 1,5
55		S. enterica	*enterica (I)*	Javiana	1,9,12 : l,z_{28} : 1,5
56	**3,10 (E_1)**	S. enterica	*enterica (I)*	Give	3,{10}{15}{15,34} : l,v : 1,7
57		S. enterica	*enterica (I)*	Weltevreden	3,{10}{15} : r : z_6
58		S. enterica	*enterica (I)*	Meleagridis	3,{10}{15}{15,34} : e,h : l,w
59	**11 (F)**	S. enterica	*enterica (I)*	Abaetetuba	11 : k : 1,5
60		S. enterica	*enterica (I)*	Veneziana	11 : i : e,n,x
61		S. enterica	*enterica (I)*	Rubislaw	11 : r : e,n,x
62		S. enterica	*enterica (I)*	Aberdeen	11 : i : 1,2
63	**13 (O)**	S. enterica	*enterica (I)*	Poona	1,13,22 : z : 1,6
64		S. enterica	*enterica (I)*	Cubana	1,13,23 : z_{29} : -
65		S. enterica	*enterica (I)*	Mississipi	1,13,23 : b : 1,5
66		S. enterica	*enterica (I)*	Putten	13,23 : d : l,w
67	**6,14 (H)**	S. enterica	*enterica (I)*	Caracas	[1],6,14,[25] : g,m,s : -
68	**16 (I)**	S. enterica	*enterica (I)*	Hvittingfoss	16 : b : e,n,x
69		S. enterica	*enterica (I)*	Gaminara	16 : d : 1,7
70	**17 (J)**	S. enterica	*enterica (I)*	Michigan	17 : l,v : 1,2
71	**21 (L)**	S. enterica	*enterica (I)*	Minnesota	21 : b : e,n,x
72	**30 (N)**	S. enterica	*enterica (I)*	Urbana	30 : b : e,n,x
73	**35 (O)**	S. enterica	*enterica (I)*	Adelaide	35 : f,g : -
74	**39 (Q)**	S. enterica	*enterica (I)*	Wandsworth	39 : b : 1,2
75	**42 (T)**	S. enterica	*salamae (II)*	S. II	42 : b : e,n,x,z_{15}
76	**40 (R)**	S. enterica	*houtenae (IV)*	S. IV	1,40 : z_4,z_{23} : -
77	**6,14 (H)**	S. enterica	*indica (VI)*	S. VI	[1],6,14,[25] : a : e,n,x
78	**48 (Y)**	S. bongori	*(V)*	S. V	48 : z_{35} : -

2 Exclusivité

Souches non *Salmonella*

N°	GENRE	ESPECE
1	***Citrobacter*** *	*freundii, diversus, youngae, koseri, braaki,*
2	***Escherichia***	*coli, hermanii*
3	***Proteus***	*mirabilis, vulgaris*
4	***Klebsiella***	*pneumoniae, oxytoca*
5	***Enterobacter***	*cloacae, sakazakii, agglomerans (ou Pantoea agglomerans)*
6	***Serratia***	*marcescens*
7	***Hafnia***	*alvei*
8	***Shigella***	*flexneri*

* Choisir trois espèces parmi les cinq.

Annexe 5

Modalités générales d'organisation de l'étude interlaboratoires

Choix des laboratoires collaborateurs:

Le Laboratoire expert doit proposer au Bureau Technique, lors de la présentation du projet d'étude interlaboratoires si possible, et dans tous les cas avant le démarrage de l'étude interlaboratoires, une liste de laboratoires compétents, publics ou privés, issus de préférence de plusieurs pays européens.
Ces laboratoires sont au minimum au nombre requis par la norme EN ISO 16140-2, de façon à obtenir au minimum autant de séries de résultats interprétables. Le Laboratoire expert et le laboratoire du fabricant ne sont pas comptés parmi ces laboratoires.
Le choix des laboratoires collaborateurs est fait de façon concertée entre le fabricant et le Laboratoire expert. Néanmoins, le choix définitif et le suivi des laboratoires collaborateurs sont de la responsabilité du Laboratoire expert, qui doit s'assurer que ceux-ci ont mis en place une démarche d'assurance qualité dans le domaine concerné.

Tâches incombant au Laboratoire expert:

Le Laboratoire expert prépare les échantillons pour les laboratoires collaborateurs et leur transmet le protocole d'analyse à effectuer pour la méthode alternative.
Le Laboratoire expert doit veiller à mettre en œuvre les moyens adaptés à la logistique importante due à cette étude. Il doit impérativement disposer d'un enregistrement de la température pendant le transport.

Concernant la préparation des échantillons pour les méthodes qualitatives, le Bureau Technique estime que les tests d'homogénéité et de stabilité ne sont pas nécessaires. Le laboratoire devra vérifier que le mélange est suffisamment stable sur plusieurs jours dans les conditions de transport et de conservation.

Concernant le transport des échantillons, le Bureau Technique estime que les laboratoires experts doivent privilégier la réfrigération plutôt que la congélation des échantillons. En effet, la congélation entraîne un risque de perte des bactéries cibles pour les échantillons de faible taux de contamination. C'est donc le Bureau Technique qui statuera pour chaque étude sur la possibilité de congeler ou non les échantillons pendant le transport. Concernant la réfrigération, les conditions suivantes (définies par le Bureau Technique) s'appliquent : la température minimum et maximum des échantillons, pendant le transport et à l'arrivée au laboratoire, doit être comprise entre 0°C et 8°C.

Concernant l'organisation de l'étude interlaboratoires, le dénombrement de la flore bactérienne totale doit se faire sur un échantillon supplémentaire spécifique préparé par le Laboratoire expert.

Le fait d'utiliser des milieux de marque et de lot différents introduit une variabilité supplémentaire.

Instructions aux laboratoires collaborateurs:

Il est possible de laisser la possibilité aux collaborateurs d'analyser les échantillons à J1 ou J2, sous réserve de passer un même échantillon le même jour pour la méthode alternative et la méthode de référence. Le cas échéant, les instructions devront être claires et précises.

Il est conseillé au Laboratoire expert de faire signer à chaque laboratoire collaborateur une attestation de prise de connaissance des instructions relatives à l'étude interlaboratoires.
Le Laboratoire expert doit en particulier fixer de façon très claire pour les laboratoires collaborateurs, les conditions d'élimination des résultats d'un laboratoire (au minimum jour d'analyse et température maximale de réception des échantillons). Ceci permet d'avoir des règles claires et non discutables d'élimination des résultats, et de plus permet d'éviter à un laboratoire collaborateur de faire des essais inutiles.

Le Laboratoire expert devra notamment recommander aux laboratoires collaborateurs de prévoir un thermomètre vérifié métrologiquement pour la vérification de la température des échantillons à l'arrivée.

Conservation des bouillons d'enrichissement:

Pour les études interlaboratoires, chaque laboratoire doit garder les bouillons d'enrichissement des différents échantillons analysés, dans les conditions fixées par le Laboratoire expert. Si le Laboratoire expert, après analyse des résultats, met en évidence des discordants, il pourra demander aux laboratoires collaborateurs de réaliser des tests complémentaires afin d'expliquer la discordance.

Annexe 6

Exemple de protocole de contamination et de dénombrement pour les faibles taux

1 Etalonnage des suspensions mères de microorganismes

L'étalonnage est réalisé à partir de la formule : N = K x DO

La DO est mesurée à la longueur d'onde indicative de 660 nm, à reconfirmer par un spectre de la souche afin de sélectionner la longueur d'onde la plus appropriée.

N : nombre d'UFC/ml
K : coefficient d'étalonnage de la souche

K est déterminé de la façon suivante :

a) Au minimum 5 courbes d'étalonnage doivent être réalisées pour chaque souche après détermination en parallèle de la D.O. et de N (par dénombrement) sur plusieurs expériences, réalisées dans les mêmes conditions de culture. Le facteur k est déterminé pour chaque partie linéaire de chaque courbe d'étalonnage, de la façon suivante: k = N/DO.

b) Le facteur K est la moyenne des facteurs k obtenus pour chaque courbe d'étalonnage.

2 Préparation de la suspension mère

a) Mettre en culture la souche à inoculer à partir d'une culture conservée selon les bonnes pratiques de laboratoire ;

b) Incuber 24 h à la température optimale de la souche ;

c) Repiquer en bouillon, incubation 16 - 17 h (overnight) ;

d) Effectuer une dilution dans le bouillon de manière à ce que les valeurs obtenues soient sur la partie linéaire de la courbe d'étalonnage ;

e) Mesurer la D.O. de la dilution

f) Le calcul de N (nombre d'UFC/ml) est effectué d'après la formule N = K x D.O.

3 Préparation des suspensions de l'inoculum

Des dilutions dans du "peptone-sel" sont réalisées de façon à obtenir une suspension à 125 bactéries/ml, une suspension à 25 bactéries/ml et une suspension à 5 bactéries/ml

Cette proposition est à moduler en fonction du taux de contamination final souhaité.

4 Estimation des précisions

L'hypothèse de base est que la distribution des contaminants suit une loi de Poisson.

Exemple : estimation de l'intervalle de confiance sur le dénombrement de la suspension à 125 bactéries/ml :

- Inoculer 2 boîtes de Petri PCA avec 1 ml de suspension dans chacune d'elles.
- Compter après incubation, le nombre total de bactéries dans les 2 boîtes : m
- Si m est supérieur à 200, l'intervalle de confiance sur le dénombrement de la suspension sera au plus compris entre :

m X 0.434 et m X 0.575 bactéries/ml

Exemple : estimation de l'intervalle de confiance sur le dénombrement de la suspension à 25 bactéries/ml :

- Inoculer 10 boîtes de milieu PCA avec chacune 1 ml de suspension à énumérer
- Compter après incubation, le nombre total de bactéries dans les 10 boîtes : n
- Si la suspension est contaminée de façon homogène, on ne doit pas trouver plus d'une boîte sur 10 en dehors de l'intervalle de confiance donné par la loi de Poisson

  Exemple : pour 20 bactéries, pas plus d'une boîte avec moins de 12 ou plus de 30 bactéries.

- Si n est supérieur à 200, l'intervalle de confiance sur le dénombrement de la suspension sera au plus compris entre :

n X 0.0868 et n X 0.115 bactéries / ml

Taux théorique ciblé (bactéries/25 ml)	Taux visé (bactéries /25 ml)	Concentration de la solution d'inoculum	Volume d'inoculum (ml) par échantillon de 25 g	Estimation de la limite inférieure de la contamination par 25 g d'échantillon	Estimation de la limite supérieure de la contamination par 25 g d'échantillon
10 à 100	50	125 b / ml	0.4	m X 0.173	m X 0.23
5 à 50	25	125 b / ml	0.2	m X 0.0868	m X 0.115
2 à 20	10	25 b / ml	0.4	n X 0.035	n X 0.046
1 à 10	5	25 b / ml	0.2	n X 0.0173	n X 0.023

b = bactérie

Exemple : estimation de l'intervalle de confiance sur le dénombrement de la suspension à 5 bactéries/ml :

Se référer à la table de calcul ci-jointe.

Table de calcul

Factors for 95 Percent Confidence Limits for Mean of a Poisson-distributed Variable

Observed number on which the estimation is based	Lower limit factor	Upper limit factor	Observed number on which the estimation is based	Lower limit factor	Upper limit factor
1	0.0253	5.57	35	0.697	1.39
2	0.121	3.61	40	0.714	1.36
3	0.206	2.92	45	0.729	1.34
4	0.272	2.56	50	0.742	1.32
5	0.324	2.33			
6	0.367	2.18	60	0.770	1.30
7	0.401	2.06	70	0.785	1.27
8	0.431	1.97	80	0.798	1.25
9	0.458	1.90	90	0.809	1.24
10	0.480	1.84	100	0.818	1.22
11	0.499	1.79	120	0.833	1.200
12	0.517	1.75	140	0.844	1.184
13	0.532	1.71	160	0.854	1.171
14	0.546	1.68	180	0.862	1.160
15	0.560	1.65	200	0.868	1.151
16	0.572	1.62	250	0.882	1.134
17	0.583	1.60	300	0.892	1.121
18	0.593	1.58	350	0.899	1.112
19	0.602	1.56	400	0.906	1.104
20	0.611	1.54	450	0.911	1.098
			500	0.915	1.093
21	0.619	1.53			
22	0.627	1.51	600	0.922	1.084
23	0.634	1.50			
24	0.641	1.49	700	0.928	1.078
25	0.647	1.48			
			800	0.932	1.072
26	0.653	1.47			
27	0.659	1.46	900	0.936	1.068
28	0.665	1.45			
29	0.670	1.44	1000	0.939	1.064
30	0.675	1.43			

Annexe 7

Modèles de rapport d'étude et de synthèse pour les études conduites selon la norme EN ISO 16140-2

Se reporter aux éventuels modèles correspondants définis par le Bureau Technique, disponibles sur demande auprès d'AFNOR Certification.