

Validation des méthodes alternatives d'analyse

Application à la microbiologie alimentaire



**Exigences relatives aux études
(préliminaire et interlaboratoire)
menées par un laboratoire expert**

SOMMAIRE

AVANT PROPOS.....	3
<i>Objet.....</i>	<i>3</i>
<i>Mise à jour/Diffusion.....</i>	<i>3</i>
<i>Note 1 : Critères d'acceptabilité des résultats.....</i>	<i>3</i>
<i>Note 2 : Acceptation des résultats externes.....</i>	<i>3</i>
<i>Note 3 : Résultats bruts.....</i>	<i>3</i>
<i>Note 4 : Modalités générales concernant l'étude interlaboratoire.....</i>	<i>3</i>
<i>Note 5 : Respect des présentes exigences.....</i>	<i>4</i>

METHODES QUALITATIVES : Etude comparative des méthodes (§ 5.1 de la norme NF EN ISO 16140).....	5
<i>IMPORTANT : Conditions de confirmation des résultats positifs.....</i>	<i>6</i>
<i>Exactitude relative, spécificité relative, sensibilité relative (§ 5.1.1).....</i>	<i>7</i>
<i>Niveau de détection relatif (§ 5.1.2).....</i>	<i>10</i>
<i>Inclusivité et exclusivité (sélectivité) de la méthode alternative (§ 5.1.3).....</i>	<i>12</i>
<i>Praticabilité de la méthode alternative.....</i>	<i>14</i>
METHODES QUALITATIVES : Etude interlaboratoire (§ 5.2 de la norme NF EN ISO 16140).....	16

METHODES QUANTITATIVES : Etude comparative des méthodes (§ 6.2 de la norme NF EN ISO 16140).....	19
<i>Linéarité et exactitude (§ 6.2.1).....</i>	<i>20</i>
<i>Limites de détection et de quantification (§ 6.2.2).....</i>	<i>21</i>
<i>Sensibilité relative (§ 6.2.3).....</i>	<i>22</i>
<i>Spécificité et sélectivité (§ 6.2.4).....</i>	<i>22</i>
<i>Autres caractéristiques de la méthode alternative (§ 6.2.5).....</i>	<i>22</i>
METHODES QUANTITATIVES : Etude interlaboratoire (§ 6.3 du projet NF EN ISO 16140:2003/prA1:2009).....	24

MODALITES D'INSTRUCTION DES ETUDES PAR LE LABORATOIRE EXPERT.....	27
1 <i>Présentation d'un projet d'étude préliminaire.....</i>	<i>27</i>
2 <i>Réalisation de l'étude préliminaire et présentation des résultats.....</i>	<i>28</i>
3 <i>Réalisation de l'étude interlaboratoire et présentation des résultats.....</i>	<i>29</i>
4 <i>Elaboration de l'attestation de validation.....</i>	<i>29</i>
5 <i>Rapport de synthèse des études.....</i>	<i>30</i>
6 <i>Durée de la validation.....</i>	<i>30</i>
7 <i>Cas d'une extension/modification.....</i>	<i>30</i>
8 <i>Cas de la reconduction.....</i>	<i>30</i>

ANNEXE 1 : Protocole de mesure pour le calcul du niveau de détection relatif.....	31
ANNEXE 2 : Exemple de protocole de contamination et de dénombrement pour les faibles taux.....	33
ANNEXE 3 : Etude de sélectivité Salmonella - Listes de souches obligatoires.....	36

AVANT PROPOS

OBJET

Ce document s'applique en complément de la norme NF EN ISO 16140 (version 2003) 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 A JOUR/DIFFUSION

Ce document est mis à jour par AFNOR Certification à chaque modification apportée par le Bureau Technique Microbiologie 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 NF EN ISO 16140 ne fixe pas de seuil d'acceptabilité des résultats pour les différents critères testés. Il revient au Bureau Technique microbiologie d'examiner et d'évaluer les résultats pour chacun de ces critères, et de donner un avis sur leur acceptabilité.

NOTE 2 : Acceptation des résultats externes

La norme NF EN ISO 16140 prévoit des règles d'acceptation de résultats externes obtenus antérieurement dans le cadre d'un autre programme de validation (Cf. annexe A normative). Dans la limite de sa compétence, et en l'absence de documents officiels en faisant état, il revient au Bureau Technique microbiologie de juger de l'importance des différences entre les méthodes de référence ou les protocoles de validation utilisés.

NOTE 3 : Résultats bruts

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

NOTE 4 : Modalités générales concernant l'étude interlaboratoire

Choix des laboratoires collaborateurs:

Le laboratoire expert doit proposer au Bureau Technique, lors de la présentation du projet d'étude interlaboratoire si possible, et dans tous les cas avant le démarrage de l'étude

interlaboratoire, 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 NF EN ISO 16140, 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

Instructions aux laboratoires collaborateurs:

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 interlaboratoire.

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.

NOTE 5 : Respect des présentes exigences

Le laboratoire expert doit présenter dans ses projets d'études tous les écarts éventuels par rapport au protocole du fabricant et/ou par rapport aux "Exigences pour les études". Si aucun écart n'est mentionné, le respect du protocole du fabricant et des "Exigences pour les études" est implicite et sous sa responsabilité.

METHODES QUALITATIVES :

ETUDE COMPARATIVE DES METHODES

(§ 5.1 de la norme NF EN ISO 16140)

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

- Exactitude relative, spécificité relative, sensibilité relative
- Niveau de détection relatif

Et de déterminer les paramètres suivants pour la méthode alternative :

- Inclusivité et exclusivité
- Praticabilité

IMPORTANT : Conditions de confirmation des résultats positifs

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, et pour toutes les méthodes de **recherche de microorganismes pathogènes** (*Salmonella*, *Listeria*, ...), tous les résultats positifs obtenus par la méthode alternative **doivent être** systématiquement confirmés.

Seuls les résultats obtenus après confirmation sont considérés comme positifs (tableaux, calculs,...). Les résultats avant confirmation sont exploités pour information.

La Commission de Validation et son Bureau Technique microbiologie ont défini les modalités suivantes de confirmation, qui se présentent sous forme de trois options :

1. a/ 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)**.

Pour effectuer la confirmation, il faut repartir du bouillon d'enrichissement, ou bien des colonies isolées dans le cas des milieux chromogéniques.

b/ Par l'utilisation de sondes nucléiques tel que prévu dans la norme EN ISO 7218 à partir de colonies isolées (avec ou sans purification)

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.

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.

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 validé de la seconde méthode (**sans inclure ses étapes de confirmation**) 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 (exemple : enrichissement commun avec un même milieu).

Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun.

L'option n°1a doit obligatoirement faire partie du protocole de la méthode alternative à valider. Les **options n°1b, 2 et 3** peuvent la compléter.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests classiques ou par la méthode décrite par le fabricant, **et en particulier 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.**

* Mention supplémentaire si des tests Latex sont proposés en confirmation.

Exactitude relative, spécificité relative, sensibilité relative (§ 5.1.1)

PROTOCOLE DE MESURE : INTERPRETATION DU § 5.1.1.2 DE LA NORME

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 B informative de la norme NF EN ISO 16140 : catégories recommandées).

L'origine des échantillons doit être la plus variée possible afin de limiter les biais liés aux spécialités alimentaires.

Exigences particulières fixées par le Bureau Technique :

Les durées d'incubation retenues pour la réalisation des essais sont les durées minimales spécifiées dans le protocole.

Interprétation du § 5.1.1.2.2 (Nombre d'échantillons)

Les aliments à analyser sont subdivisés en **cinq catégories**, dont au minimum **4 catégories d'alimentation humaine**. Les catégories sont subdivisées en **types**. Dans chaque catégorie, on doit sélectionner au moins trois types d'aliments, un même type regroupant plusieurs **matrices** alimentaires. Se référer aux exigences ci-dessous pour les études *Salmonella* et *Listeria*.

Par exemple : dans la catégorie « *viandes* », on pourra trouver le type « *traitées à chaud* », et dans ce type les matrices « *plats cuisinés, boudins, pâtés,...* ».

Exigences particulières fixées par le Bureau Technique :

Ci-dessous les types d'aliments qui doivent figurer au minimum dans une étude ***Salmonella*** :

Volailles crues (état brut ou congelé)	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)
Fromages au lait cru (type produits laitiers fermentés de l'annexe B)	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)
Œufs et dérivés, y compris la mayonnaise	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)

Ci-dessous les types d'aliments qui doivent figurer au minimum dans une étude ***Listeria*** :

Poissons fumés	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)
Fromages au lait cru (= produits laitiers fermentés)	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)
Viandes	3 types de produits

Si la méthode étudiée comprend un **protocole spécifique à un type ou à une catégorie d'aliments**, ce type ou cette catégorie doivent obligatoirement être testé(e).

Si le domaine de validation concerne un seul type de produit alimentaire au sein d'une catégorie, ce type est considéré comme une catégorie à part entière.

Si la validation de la méthode alternative est demandée pour **l'alimentation animale**, les échantillons d'aliments pour animaux doivent être considérés comme une catégorie et doivent être testés en conséquence.

Si la validation de la méthode alternative est également demandée pour les **échantillons d'environnement**, ceux-ci peuvent être considérés comme une catégorie et au moins trois types de produits d'environnement doivent être testés parmi les suivants :

- prélèvements de surface (ceux-ci pourront être réalisés à l'aide d'éponges),
- poussières, balayures, résidus (sur les lignes de fabrication, par exemple cutters, aspirateurs),
- écouillons de siphons, égouts,
- eaux diverses (lavage, rinçage, ...)

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.

Les **échantillons vétérinaires** cités à l'annexe B.2 de la norme sont à considérer à part et ne doivent pas être inclus dans les 5 catégories définies ci-dessus. Il s'agit des échantillons pour la recherche de *Salmonella*. Si la demande de validation les inclue, les mêmes critères que pour les autres échantillons seront appliqués, mais avec la méthode de référence correspondante.

Exigences particulières fixées par le Bureau Technique :

Cas des études *Salmonella* : si la validation est demandée pour les **échantillons d'environnement de production primaire**, ceux-ci doivent être considérés comme une catégorie supplémentaire et les 4 types de produits suivants sont à tester :

Fèces de volaille	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)
Non fèces de volaille*	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)
Fèces de porc	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)
Non fèces de porc*	20 échantillons minimum (positifs et négatifs)

* *Exemple* : *organes internes, œufs béchés, eaux d'abreuvoir, chiffonnettes, ...*

Si la validation de la méthode alternative est limitée à certaines catégories, à la demande du fabricant, il est possible de n'étudier que 1, 2, 3 ou 4 catégories

Les analyses seront réalisées en simple **par les deux méthodes**. 60 produits au minimum par catégorie seront analysés, avec un minimum de 30 produits positifs.

Si le protocole de la méthode alternative prévoit une étape de conservation au froid (durée définie par le fabricant), l'étude d'exactitude devra être refaite après passage au froid sur tous les échantillons positifs (artificiellement et naturellement contaminés) qui ont été testés en étude préliminaire et sur les échantillons pour lesquels des résultats discordants avaient été obtenus.

Le laboratoire expert devra **systématiquement confirmer** les échantillons **positifs** de la méthode alternative, ainsi que tous les échantillons **discordants**, et également tous les échantillons de la méthode de référence, y compris dans le cas de la validation d'étape de conservation au froid

CONTAMINATION ARTIFICIELLE (§. 5.1.1.2.3) :

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.

Exigences particulières du Bureau Technique :

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

- ***Listeria*** (spp et mono): 50% toutes catégories de produits confondues
- ***Salmonella*** :

Echantillons alimentaires (couvert par la norme EN ISO 6579 :2002) : **85%** toutes catégories confondues (soit **15%** minimum d'échantillons naturellement contaminés)

Echantillons d'environnement de production primaire (couvert par la norme NF EN ISO 6579/Annexe D : 2007) : 75% toutes catégories de produits confondues (soit 25% minimum d'échantillons naturellement contaminés, avec au maximum 4 échantillons naturellement contaminés issus du même élevage)

Si la demande de validation est faite pour une matrice seulement, le Bureau Technique examine au cas par cas, lors de la présentation du projet d'étude préliminaire, les exigences concernant la

contamination naturelle. Il en est de même pour les méthodes de détection d'autres microorganismes que les *Listeria* et les *Salmonella*.

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.

Pour *Listeria* et *Salmonella*, le taux devra être au maximum de 30 bactéries/25g, déterminé après l'application du stress, sur milieu non sélectif.

Pour *E.coli* O157, le taux devra être au maximum de 15 bactéries/25g, avec au moins 1/3 des échantillons présentant des contaminations inférieures à 5 bactéries/25g.

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.

Les 3 options de contamination sont les suivantes :

1. La contamination par mélange avec des échantillons naturellement contaminés de même type
2. La contamination avec des souches isolées du même type de produit. Ces contaminations artificielles doivent comprendre au moins un traitement physique ou chimique représentatif des conditions naturelles. 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 doit être observée pour au moins 90% des résultats positifs des échantillons artificiellement contaminés). Le laboratoire devra préciser le(s) milieu(x) utilisé(s).

Mise en garde et exigences particulières du Bureau Technique :

- Pour certaines souches de *Listeria monocytogenes* et *Listeria spp*, le passage au froid positif peut ne pas constituer un stress.
 - Dans le cas d'étude *Salmonella* lorsque la validation est demandée pour la catégorie « échantillons d'environnement de production primaire », les échantillons devront être contaminés et laissés 24 heures minimum à température ambiante (stress chimique et/ou physique non recommandé) afin d'atteindre un état de stabilité des matrices et de mimer des conditions naturelles de contamination. Les taux de contamination devront être adaptés pour rester dans les seuils de référence.
3. L'utilisation de matériaux de référence

Exigences particulières du Bureau Technique

Le Bureau Technique précise la méthodologie décrite dans la norme (Cf. annexe D) comme suit :

- Si au moins 1 étape est commune (Cf. D1), réaliser l'inoculation de la contamination artificielle dans la première suspension commune.
- S'il n'existe pas d'étape commune:
 - Dans le cas d'échantillons solides :
 - homogénéiser au maximum l'échantillon et inoculer individuellement chaque prise d'essai, ou
 - si la concentration du bouillon d'enrichissement peut être ajustée, effectuer une première suspension au demi avant inoculation. Ensemencer avant la séparation (Cf. D2)

- Dans le cas d'échantillons liquides ou facilement homogénéisables : inoculer dans l'échantillon directement, sans dilution préalable.

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-isolément 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.).

CALCUL ET INTERPRETATION (§ 5.1.1.3)

Les résultats devront être exploités de manière à définir :

- l'exactitude relative
- la spécificité relative (avant et après confirmation)
- la sensibilité relative

Pour le calcul et l'interprétation, se référer aux tableaux 1 et 2 de la norme NF EN ISO 16140.

Exigences particulières du Bureau Technique

Construire un 3ème tableau mentionnant les résultats par type d'aliments (Cf. tableau 2 avec autant de lignes supplémentaires que de produits testés, en ne gardant que les 5 premières colonnes : PA, NA, ND, PD, Somme)

Pour les échantillons artificiellement contaminés, le laboratoire expert devra fournir en annexe de son rapport tous les résultats bruts positifs et négatifs, en indiquant l'origine des souches et le type de contamination, le type de stress appliqué et le résultat du stress, ainsi que le niveau de contamination théorique.

Le laboratoire expert devra présenter dans un même tableau les résultats obtenus avant et après confirmation.

Afin d'interpréter la différence de sensibilité entre la méthode alternative et la méthode de référence, le laboratoire devra également présenter les calculs suivants :

$$\frac{(PA+PD)}{(PA+ND+PD)} \text{ pour la méthode alternative}$$
$$\frac{(PA+ND)}{(PA+ND+PD)} \text{ pour la méthode de référence}$$

Dans la présentation des résultats, le laboratoire expert devra préciser si les déviations positives sont considérées comme de vrais positifs supplémentaires, ou bien si ce sont de faux positifs.

Niveau de détection relatif (§ 5.1.2)

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

PROTOCOLE DE MESURE (§ 5.1.2.2)

Différentes **combinaisons 'produit alimentaire - souche'** doivent être étudiées en parallèle avec la méthode de référence et la méthode alternative, pour **cinq catégories** de produits alimentaires.

Si la validation est également demandée pour les échantillons d'**environnement**, ceux-ci peuvent être considérés comme une catégorie.

Exigences particulières du Bureau Technique

Le Bureau Technique souhaite voir figurer au minimum les **types** de produits suivants :

- dans une étude **Salmonella** :
 - Catégorie produits laitiers : « lait cru »
 - Catégorie échantillons d'environnement de production primaire : « fèces (origine volaille ou porc) ». **Note** : Les niveaux de contamination seront déterminés comme pour les produits de type alimentaire et seront proposés par le laboratoire expert. Le laboratoire expert devra choisir les souches à tester en fonction de la documentation publique disponibles (enquêtes européennes, avis AFSSA, ...), source d'information sur la prévalence de souches par type d'échantillons. Le choix de souches sera établi en fonction de l'échantillon choisi et de son origine.
- dans une étude **Listeria** : lait cru, poisson fumé

Pour chaque combinaison « produit alimentaire - souche », au minimum **4 niveaux de contamination**, y compris le contrôle négatif, doivent être réalisés.

- Le premier niveau sera le niveau zéro.
- Le second niveau sera celui où moins de 50% des réplicats pour au moins une méthode seront positifs
- Le troisième niveau sera celui où plus de 50% et moins de 100% des réplicats pour au moins une méthode seront positifs
- Le quatrième niveau sera tel que 100% des échantillons seront positifs

Remarque : il est possible que le laboratoire soit amené à ensemercer l'inoculum à un niveau inférieur à 1 cellule / 25g

Le niveau de flore associée de la matrice sera déterminé.

INTERPRETATION DU § 5.1.2.2 DE LA NORME (PROTOCOLE DE MESURE, 4EME ALINEA)

Répliquer **indépendamment 6 fois** chaque combinaison (aliment, niveau de contamination). **Réaliser la division de chaque réplification** au niveau de séparation des deux méthodes (Cf. annexe D) **et analyser chacune d'entre elle avec la méthode alternative et la méthode de référence**.

Si la première étape de chaque méthode est identique (par exemple, même bouillon de préenrichissement), effectuer la **division** à la deuxième étape (annexe D, cas 1).

Se reporter au schéma en annexe 1 de ce document.

Si les deux méthodes n'ont pas d'étape commune (si les premiers milieux de culture, la méthodologie ou les dilutions sont différents), ensemercer individuellement chaque prise d'essai.

Se reporter au schéma en annexe 1 de ce document.

Au 5.1.2.3 (préparation de l'échantillon pour essai) et à l'annexe D : remplacer dans le texte et les schémas « *réplication* » par « **division** », et remplacer dans le titre de l'annexe « duplication » par « **division** ». C'est bien le terme « *division* » qui est utilisé dans la version anglaise de la norme qui sert de référence. Il semble que le terme « *réplication* » provienne d'une traduction incorrecte en français. Il s'agit de l'étape où l'on sépare en deux parties égales l'échantillon, afin d'analyser l'une par la méthode de référence et l'autre par la méthode alternative.

La maîtrise des faibles contaminations passe par un étalonnage précis et une expérience acquise sur les souches étudiées.

Exigences particulières du Bureau Technique

Le milieu utilisé pour l'étalonnage, ainsi que l'ensemble des protocoles de contaminations, doivent être soumis à l'avis du Bureau Technique par le laboratoire expert, lors du projet d'étude préliminaire. Ils devront aussi être précisés dans le rapport de synthèse des études.

Exemple proposé par le Bureau Technique

Un exemple de **protocole de contamination et de dénombrement pour les faibles taux** est donné en annexe de document.

INTERPRETATION DES RESULTATS (Cf. § 5.1.2.4)

L'interprétation sera faite en comparant chaque niveau de contamination pour chaque combinaison 'produit alimentaire - souche'.

Le niveau de détection relatif sera estimé par le calcul du **point limite à 50% (LOD₅₀)**, avec intervalle de confiance associé, suivant la méthode de calcul de Spearman-Kärber* (Un logiciel Excel est disponible). Ce point limite donne l'estimation du niveau de contamination qui correspondrait à 50% de récupération

Remarque : si 100% des échantillons sont détectés au niveau 1 cellule / 25g, il faut poursuivre l'étude en repartant du niveau 1 dilué progressivement.

* Il s'agit d'une méthode proposée et mise en pratique par le Dr T. Hitchins (US/FDA)

Inclusivité et exclusivité (sélectivité) de la méthode alternative (§ 5.1.3)

PROTOCOLE DE MESURE (§5.1.3.2)

Elle doit être définie par l'analyse d'au moins :

- 50 souches pures positives (microorganismes cibles)
- 30 souches pures négatives (microorganismes non cibles) connues pour être interférentes avec les souches positives

Exigences particulières du Bureau Technique

Pour *Salmonella*, la norme NF EN ISO 16140 limite à 30 le nombre de souches pures positives mais le Bureau Technique estime que ce nombre est insuffisant en cas de problème d'interprétation. Il maintient l'exigence de 50 souches pures positives. En complément, le Bureau Technique a établi une liste minimum de souches cibles et non cibles à tester pour *Salmonella* (cf. annexe 3).

En revanche, pour certaines flores, il peut être difficile voire impossible de trouver 50 souches pures positives et le Bureau Technique statuera au cas par cas sur le nombre de souches à tester.

Etude *Salmonella* : validation de la catégorie « échantillons d'environnement de production primaire »

- Si le protocole de la méthode alternative est le même que pour d'autres matrices, aucun essai spécifique n'est demandé.
- Si le protocole de la méthode alternative est spécifique aux échantillons d'environnement de production primaire : tester 50 souches pures positives en inclusivité (comprenant au moins les souches listées en annexe 3) et 30 souches pures négatives (liste à proposer par le laboratoire expert et soumise à avis du Bureau Technique)

L'annexe G de la norme ISO 16140 définit les critères de choix des microorganismes :

- Les souches doivent majoritairement être d'origine alimentaire (ou d'origine fèces pour la catégorie « échantillons d'environnement de production primaire »). L'origine des souches doit être connue et renseignée.
- Les souches doivent être représentatives de celles les plus couramment présentes, en tenant compte de leur distribution géographique et de leur incidence.
- Les souches doivent être caractérisées biochimiquement et sérologiquement, voire génétiquement.

Le laboratoire doit s'assurer de la cohérence entre la liste des souches proposées (cibles et non cibles) et les caractères phénotypiques et/ou génétiques attendus de ces souches.

Le laboratoire devra assurer une diversité des souches testées (sérovar et origine alimentaire). Un même sérovar de *Salmonella* ne devra pas être testé plus de 2 fois, sauf sur demande du Bureau Technique.

INTERPRETATION CHAPITRE § 5.1.2.4 (ENSEMENCEMENT)

Effectuer chaque essai avec la méthode alternative seulement.

Pour les souches positives (microorganismes cibles) :

Le niveau d'inoculum doit être compris entre 10 et 100 fois le niveau de détection relatif minimal de la méthode alternative.

Le Bureau Technique recommande d'inoculer des volumes du même ordre de grandeur que ceux utilisés dans la pratique courante de la méthode.

Le protocole complet de la méthode alternative doit être mis en œuvre, y compris le pré-enrichissement s'il existe.

Lorsque de faux négatifs ou des résultats douteux sont obtenus, la souche doit être soumise à des essais avec les deux méthodes (alternative et référence)

Exigences particulières du Bureau Technique : La méthode de confirmation doit aussi être mise en œuvre s'il s'agit d'une méthode originale.

Pour les souches négatives (microorganismes non cibles) :

Le milieu final d'enrichissement de la méthode alternative doit être inoculé et incubé. Si ce milieu est un bouillon sélectif, il pourra être remplacé par un bouillon non sélectif approprié.

Exigences particulières du Bureau Technique : Le niveau d'inoculum doit être de l'ordre du niveau de contamination le plus élevé retrouvé dans les catégories alimentaires testées, et doit être au minimum de 10⁵ cellules/ml.

Lorsque la méthode alternative donne des résultats positifs ou douteux avec les microorganismes non-cibles, l'essai doit être répété en suivant le protocole complet, avec la méthode alternative et la méthode de référence.

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.).

EXPRESSION DES RESULTATS (§ 5.1.3.3)

Tableau 4 - Présentation des résultats de sélectivité : les résultats concernant la méthode de référence sont à indiquer « le cas échéant », puisque la méthode de référence n'est mise en œuvre que lors d'essais complémentaires, en cas de résultats positifs ou douteux, et pas systématiquement.

Le laboratoire expert devra dénombrer les suspensions de microorganismes cibles et non cibles utilisées pour réaliser les essais, afin de s'assurer que le niveau de détection relatif est atteint.

Si des résultats sont douteux, ou non conformes à ceux attendus, l'essai devra être répété en parallèle avec la méthode de référence.

Les données publiées, obtenues selon les exigences de la norme NF EN ISO 16140 peuvent être utilisées par le laboratoire expert pour renseigner ce critère.

Praticabilité de la méthode alternative

Il s'agit d'exigences particulières du Bureau Technique, non demandées par la norme NF EN ISO 16140.

Une étude de praticabilité / adaptabilité, comportant 13 critères, sera réalisée.

Pour chacun de ces critères a été défini 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 alors que d'autres nécessitent une communication sur l'attestation de validation.

Les données résultant de cette étude de praticabilité seront intégrées :

- dans le rapport d'étude préliminaire pour les critères 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13,
- dans le rapport d'étude interlaboratoire pour les critères 7 et 10.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
1	Mode de conditionnement des éléments de la méthode	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert
2	Volume des réactifs	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert
3	Conditions de stockage des éléments (+ péremption des produits non ouverts)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert que les conditions existent
4	Modalités d'utilisation après première utilisation (en particulier existence de dates limites)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert que les modalités existent
5	Equipements ou locaux spécifiques nécessaires	notice	vérification par le laboratoire expert de la véracité des écrits
6	Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (dans ce cas existence d'un mode opératoire)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert de la véracité des écrits
7	Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode	rapport	mesurée par le laboratoire expert (possibilité de se servir des durées mises en œuvre par les laboratoires collaborateurs) et réparti dans une des 3 catégories suivantes: moins de 1 jour, entre 1 jour et une semaine, plus d'une semaine.
8	Temps réel de manipulation / Flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser, leur charge en bactéries ...	rapport	temps de manipulation mesuré en comparaison avec la méthode de référence: inférieur, égal ou supérieur au temps de manipulation de la méthode de référence

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
9	Délai d'obtention des résultats	rapport et attestation	établissement de 2 cycles décrivant chaque étape de la méthode uniquement en terme de temps : - 1er cycle: échantillons négatifs - 2ème cycle: échantillons positifs
10	Type de qualification de l'opérateur	rapport	précisé par le laboratoire expert par rapport au niveau requis pour la méthode de référence : niveau identique ou différent de celui nécessaire pour la méthode de référence (le laboratoire expert peut se servir des données des laboratoires collaborateurs)
11	Etapes communes avec la méthode de référence	rapport	vérification par le laboratoire expert
12	S'il y en a une, traçabilité des résultats d'analyse	notice	vérification par le laboratoire expert
13	Maintenance par le laboratoire	rapport	durée et fréquence

METHODES QUALITATIVES :

ETUDE INTERLABORATOIRE

(§ 5.2 de la norme NF EN ISO 16140)

L'objectif de l'étude interlaboratoire est de déterminer la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires utilisant des échantillons identiques.

NOTE : Compilation des résultats d'études interlaboratoires

Pour les méthodes qualitatives, 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 laboratoires différents,
- 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.

Les laboratoires devront être en nombre suffisant pour présenter les résultats **d'au minimum dix laboratoires dont les résultats sont exploitables.**

Un produit alimentaire sera contaminé **artificiellement** par le microorganisme cible. L'utilisation de matériaux de référence est possible.

Il est recommandé de sélectionner une matrice alimentaire pertinente par rapport au microorganisme cible. Le niveau de flore annexe doit être d'au moins 10^3 UFC par mL ou par g, excepté avis particulier du Bureau technique.

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

Exigences particulières du Bureau Technique : Dans le cas particulier où l'étude interlaboratoire serait réalisée sur un échantillon de lait, il est demandé d'atteindre un niveau de flore annexe dans la matrice d'au moins 10^3 UFC/mL. La flore devra être naturellement d'origine laitière. Dans la pratique, le laboratoire expert devra trouver un lait naturellement contaminé à ce taux, et 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). Note : Les études interlaboratoires déjà validées, mais réalisées avec des échantillons de lait pour lesquels les niveaux de contamination des échantillons étaient inférieurs 10^3 UFC/ml, ne sont pas à refaire.

Chaque échantillon sera contaminé individuellement, à un minimum de 3 niveaux de contamination :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent

Soit par exemple : 0 ; 3 ; 30 cellules/25g

Au minimum, 8 échantillons par niveau seront préparés, soit 24 échantillons au total pour chaque laboratoire.

Les laboratoires devront analyser chaque échantillon par la méthode **alternative et** par la méthode de **référence**. Si la première étape de culture est différente pour chacune des méthodes, il conviendra de doubler le nombre d'échantillons. Au total, 240 résultats par méthode devront être obtenus.

L'interprétation des résultats sera faite selon la norme NF EN ISO 16140 (cf. tableaux §5.2.2.1 et calcul des pourcentages de spécificité, de sensibilité et d'exactitude relative).

Exigences particulières du Bureau Technique : pour le pourcentage de sensibilité, un calcul supplémentaire sera effectué en combinant les niveaux L1 et L2.

Les calculs d'interprétation statistique décrits dans l'annexe L de la norme seront réalisés systématiquement. Si la valeur du Odds ratio est supérieure à 1 (ce qui signifie que la concordance est inférieure au degré d'accord), réaliser un test statistique exact tel que décrit au chapitre L.4.2.

Dans le cas où la méthode alternative présente plusieurs protocoles, l'étude interlaboratoire ne sera pas systématiquement réalisée pour chacun de ces protocoles. C'est le Bureau Technique qui proposera le ou les protocoles à tester, en fonction des matrices correspondantes. En effet, la norme NF EN ISO 16140 permet de verrouiller la variabilité de la méthode au moyen de l'étude d'exactitude sur les échantillons naturellement contaminés.

Interprétation de l'annexe H – Lignes directrices relatives à l'organisation et à la gestion des études interlaboratoires :

Concernant la préparation des échantillons (H.1), le Bureau Technique estime que les tests d'homogénéité et de stabilité ne sont pas nécessaires pour les méthodes qualitatives. 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 (H.2), le Bureau Technique est d'avis que l'essai des méthodes de distribution et de postage, préconisé dans la norme, est difficilement réalisable par le laboratoire expert. En outre, 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 pathogènes 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 des échantillons pendant le transport doit être inférieure ou égale à 8°C et, à l'arrivée au laboratoire, comprise entre 0°C et 8°C.

Concernant l'organisation de l'étude interlaboratoire (H.3), au 2^{ème} alinéa (confirmation de la qualité de l'échantillon), 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.

METHODES QUANTITATIVES :

ETUDE COMPARATIVE DES METHODES

(§ 6.2 de la norme NF EN ISO 16140)

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

- Linéarité et exactitude relative
- Sensibilité relative

Et de déterminer les paramètres suivants pour la méthode alternative :

- Limites de détection et de quantification
- Spécificité et sélectivité
- Praticabilité

NOTE : la partie « méthodes quantitatives » de la norme NF EN ISO 16140 a été proposée par un biostatisticien. Elle comprend de nombreuses formules statistiques et a été conçue comme un outil complet pour les laboratoires voulant effectuer eux-mêmes les calculs. Il est possible de s'affranchir de certaines des formules de la norme en utilisant les logiciels de calcul disponibles sur le marché. Le laboratoire expert devra néanmoins posséder des compétences en statistiques afin de mener à bien les calculs et interprétations.

Linéarité et exactitude (§ 6.2.1)

On valide le résultat obtenu après la conversion du signal en nombre de germes. Les modalités de la conversion n'entrent pas en compte dans la validation, elles dépendent de l'appareil utilisé. C'est la courbe finale qui doit être linéaire et non pas le signal.

PROTOCOLE DE MESURE (§ 6.2.1.2)

Exigences particulières du Bureau Technique

Le nombre d'échantillons prévu par la norme est faible au regard des exigences de la marque NF VALIDATION en vigueur avant l'application de la norme NF EN ISO 16140. C'est pourquoi le Bureau Technique préconise les modalités suivantes, basées sur la séparation des deux protocoles (linéarité et exactitude)

Pour ces deux protocoles, parmi les **cinq** catégories demandées, il faut au minimum **4 catégories d'alimentation humaine**. L'origine des échantillons doit être la plus variée possible afin de limiter les erreurs liées aux spécialités alimentaires.

Si la méthode étudiée comprend un **protocole spécifique à un type ou à une catégorie d'aliments**, ce type ou cette catégorie doivent obligatoirement être testés.

Si le domaine de validation concerne un seul type de produit alimentaire au sein d'une catégorie, ce type est considéré comme une catégorie à part entière.

Si la validation de la méthode alternative est demandée pour **l'alimentation animale**, les échantillons d'aliments pour animaux doivent être considérés comme une catégorie et doivent être testés en conséquence.

Si la validation de la méthode alternative est également demandée pour les **échantillons d'environnement**, ceux-ci peuvent être considérés comme une catégorie et trois types de produits d'environnement doivent être testés parmi les suivants :

- prélèvements de surface (ceux-ci pourront être réalisés à l'aide d'éponges), *réflexion à mener sur les prélèvements par boîte contact qui sont hors cadre de la marque NF VALIDATION*
- poussières, balayures, résidus (sur les lignes de fabrication, par exemple cutters, aspirateurs),
- écouvillons de siphons, égouts, eaux diverses (lavage, rinçage, ...)

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.

Le Bureau Technique statuera lors de la présentation du projet d'étude sur les matrices retenues et les catégories retenues en fonction du microorganisme recherché.

LINEARITE :

Choisir **5 catégories** d'aliments de manière à prendre **une matrice par catégorie** (la linéarité est définie comme « *l'aptitude de la méthode (...) pour une matrice donnée* »).

Prendre **une souche par matrice**. Il est nécessaire de mettre en œuvre des échantillons artificiellement contaminés

Pour chaque matrice, on obtiendra **5 niveaux** par dilutions successives de la suspension de microorganismes (que l'on met dans la matrice - Cf. § 6.2.1.2) S'il s'agit d'un produit liquide, on diluera l'échantillon. Effectuer **2 répétitions au minimum par niveau** à partir de la suspension mère (interprétation de l'annexe M).

Dans le cas général, il est préférable de ne pas utiliser de niveau correspondant au dénombrement des petits nombres (au sens de la norme NF ISO 7218).

L'analyse sera réalisée par la **méthode alternative** et également par la **méthode de référence**, afin de permettre le calcul de la sensibilité relative. Si l'on n'utilise pas de matériaux de référence, la mise en œuvre de la méthode de référence sur la suspension initiale permet d'avoir une valeur de détermination initiale.

Au total, 100 analyses au moins seront donc réalisées (5 catégories x 5 niveaux x 2 répétitions (au moins) x 2 méthodes)

EXACTITUDE :

Choisir **5 catégories d'aliments**. Pour chaque catégorie, **10 échantillons positifs** – si possible naturellement contaminés – doivent présenter des résultats exploitables statistiquement. Les échantillons dont les résultats ne sont pas exploités statistiquement doivent également figurer dans le rapport.

Les aliments à analyser sont subdivisés en **catégories**, elles-mêmes subdivisées en **types** (Cf. annexe B). Dans chaque catégorie, on doit avoir trois types d'aliments, un même type regroupant plusieurs **matrices** alimentaires. Par exemple : dans la catégorie « viandes », on pourra trouver le type « traitées à chaud », et dans ce type les matrices « plats cuisinés, boudins, pâtés,... »

Les échantillons doivent être les plus variés possibles au sein d'une même catégorie. Sauf en cas d'impossibilité, les produits devront être choisis dans au moins **3 types différents**.

On effectuera **deux répétitions** par échantillon et l'analyse sera réalisée **par les deux méthodes**.

Au total, 200 analyses seront donc réalisées (5 catégories x 10 échantillons x 2 répétitions x 2 méthodes)

CALCULS (§ 6.2.1.3)

Exigences particulières du Bureau Technique :

Il est possible d'utiliser les résultats de l'étude de linéarité à raison de 1 niveau par matrice et à condition que la souche ait été stressée.

A côté des calculs demandés par la norme NF EN ISO 16140, effectuer le calcul de la répétabilité pour les deux méthodes et du biais entre les deux méthodes, selon le mode de calcul utilisé pour l'étude interlaboratoire (Cf. §6.3.5 et §6.3.6 de la norme). Ces résultats apporteront une information complémentaire pour le critère exactitude.

Limites de détection et de quantification (§ 6.2.2)

PROTOCOLE DE MESURE ET ECHANTILLONS (§ 6.2.2.3)

Le document principal de la norme concerne les méthodes instrumentales et ne pose pas de problème particulier d'interprétation. Les notes concernent les méthodes de comptage (dénombrements)

Exigences particulières du Bureau Technique, concernant les dénombrements :

Prendre **3 niveaux** et réaliser **6 réplicats** par niveau à partir d'une suspension de microorganismes, ce qui permettra d'avoir une information minimale. La détermination sera réalisée avec la **méthode alternative** seulement.

Compte tenu des faibles niveaux recherchés, le Bureau Technique recommande de vérifier la contamination des suspensions utilisées pour l'inoculation des échantillons, en effectuant le dénombrement sur 10 boîtes au minimum.

Sensibilité relative (§ 6.2.3)

Le protocole est commun à celui de la linéarité (Voir interprétation du § 6.2.1.2).
Pour les calculs, se référer à la norme NF EN ISO 16140.

Spécificité et sélectivité (§ 6.2.4)

Il s'agit bien de l'inclusivité/exclusivité, comme pour les méthodes qualitatives.

Concernant la **flore totale**, l'étude de sélectivité n'est pas nécessaire car il n'existe pas de souches « non cible ».

Concernant les autres déterminations, suivre le protocole de mesure décrit au § 6.2.4.2.

Il n'est pas nécessaire de réaliser l'étude de sélectivité s'il existe des données publiées conformes aux exigences NF EN ISO 16140.

Autres caractéristiques de la méthode alternative (§ 6.2.5)

La norme demande de préciser dans ce chapitre d'autres caractéristiques de la méthode alternative (stabilité, fiabilité, robustesse,...) qui sont hors cadre de la validation tierce partie.

Exigences particulières du Bureau Technique

Une étude de **praticabilité / adaptabilité**, comportant 13 critères, sera réalisée **par le laboratoire expert**.

Pour chacun de ces critères a été défini 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 alors que d'autres nécessitent une communication sur l'attestation de validation.

Les données résultant de cette étude de praticabilité seront intégrées :

- dans le rapport d'étude préliminaire pour les critères 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13,
- dans le rapport d'étude interlaboratoire pour les critères 7 et 10.

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
1	Mode de conditionnement des éléments de la méthode	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert
2	Volume des réactifs	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert
3	Conditions de stockage des éléments (+ péremption des produits non ouverts)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert que les conditions existent
4	Modalités d'utilisation après première utilisation (en particulier existence de dates limites)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert que les modalités existent
5	Equipements ou locaux spécifiques nécessaires	notice	vérification par le laboratoire expert de la véracité des écrits

	Critères à contrôler	Communication sur le critère	Méthode de contrôle du critère
6	Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (dans ce cas existence d'un mode opératoire)	emballage ou notice	vérification par le laboratoire expert de la véracité des écrits
7	Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode	rapport	mesurée par le laboratoire expert (possibilité de se servir des durées mises en œuvre par les laboratoires collaborateurs) et réparti dans une des 3 catégories suivantes: moins de 1 jour, entre 1 jour et une semaine, plus d'une semaine.
8	Temps réel de manipulation / Flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser, leur charge en bactéries ...	rapport	temps de manipulation mesuré en comparaison avec la méthode de référence: inférieur, égal ou supérieur au temps de manipulation de la méthode de référence
9	Délai d'obtention des résultats	rapport et attestation	établissement de 2 cycles décrivant chaque étape de la méthode uniquement en terme de temps: - 1er cycle: échantillons négatifs - 2ème cycle: échantillons positifs
10	Type de qualification de l'opérateur	rapport	précisé par le laboratoire expert par rapport au niveau requis pour la méthode de référence : niveau identique ou différent de celui nécessaire pour la méthode de référence (le laboratoire expert peut se servir des données des laboratoires collaborateurs)
11	Etapas communes avec la méthode de référence	rapport	vérification par le laboratoire expert
12	S'il y en a une, traçabilité des résultats d'analyse	notice	vérification par le laboratoire expert
13	Maintenance par le laboratoire	rapport	durée et fréquence

METHODES QUANTITATIVES :

ETUDE INTERLABORATOIRE

(§ 6.3 de la norme NF EN ISO 16140/A1)

L'objectif de l'étude interlaboratoire est de déterminer la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires utilisant des échantillons identiques.

Les laboratoires devront être en nombre suffisant pour présenter les résultats d'**au minimum huit laboratoires dont les résultats sont exploitables**.

Un produit alimentaire sera contaminé **artificiellement** par le microorganisme cible. L'utilisation de matériaux de référence est possible.

Il est recommandé de sélectionner une matrice alimentaire pertinente par rapport au microorganisme cible. Le niveau de flore annexe doit être d'au moins 10^3 UFC par mL ou par g excepté avis particulier du Bureau technique.

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

Exigences particulières du Bureau Technique : Dans le cas particulier où l'étude interlaboratoire serait réalisée sur un échantillon de lait, il est demandé d'atteindre un niveau de flore annexe dans la matrice d'au moins 10^3 UFC/mL. La flore devra être naturellement d'origine laitière. Dans la pratique, le laboratoire expert devra trouver un lait naturellement contaminé à ce taux, et 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). Note : Les études interlaboratoires déjà validées, mais réalisées avec des échantillons de lait pour lesquels les niveaux de contamination des échantillons étaient inférieurs 10^3 UFC/ml, ne sont pas à refaire.

Chaque échantillon sera contaminé individuellement, à un minimum de 4 niveaux de contamination :

- niveau 0
- 3 niveaux couvrant la gamme d'utilisation (inférieur / moyen / supérieur)

Au minimum, **2 échantillons par niveau** seront préparés, soit 8 échantillons au total pour chaque laboratoire.

Les laboratoires devront analyser chaque échantillon par la méthode **alternative** et par la méthode de **référence**.

Si la première étape de culture est différente pour chacune des méthodes, il conviendra de doubler le nombre d'échantillons.

Au total, 54 résultats par méthode devront être obtenus, soit 128 résultats pour l'ensemble de l'étude.

L'interprétation des résultats sera faite selon la norme NF EN ISO 16140/A1.

Dans le cas où la méthode alternative présente plusieurs protocoles, l'étude interlaboratoire ne sera pas systématiquement réalisée pour chacun de ces protocoles. C'est le Bureau Technique qui proposera le ou les protocoles à tester, en fonction des matrices correspondantes. En effet, la norme NF EN ISO 16140 permet de verrouiller la variabilité de la méthode au moyen de l'étude d'exactitude sur les échantillons naturellement contaminés.

INTERPRETATION DE L'ANNEXE H – LIGNES DIRECTRICES RELATIVES A L'ORGANISATION ET A LA GESTION DES ETUDES INTERLABORATOIRES :

Concernant le transport des échantillons (H.2), le Bureau Technique est d'avis que l'essai des méthodes de distribution et de postage, préconisé dans la norme, est difficilement réalisable par le laboratoire expert. En outre, 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 des échantillons, pendant le transport, doit être inférieure ou égale à 8°C et, à l'arrivée au laboratoire, comprise entre 0°C et 8°C.

Concernant l'organisation de l'étude interlaboratoire (H.3), au 2ème alinéa (confirmation de la qualité de l'échantillon), 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.

MODALITES D'INSTRUCTION DES ETUDES PAR LE LABORATOIRE EXPERT

Le laboratoire expert est choisi par le fabricant 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 en annexe 7 des règles de certification.

Notes générales

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

Le laboratoire expert doit établir un projet d'étude préliminaire. 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 fabricant/demandeur à la réunion du Bureau Technique par AFNOR Certification. Il doit présenter, avec un support visuel, le projet d'étude préliminaire 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 préliminaire.

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 fabricant/demandeur, au laboratoire expert et aux rapporteurs.

Le cas échéant, toutes les modifications relatives au projet d'étude préliminaire 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 préliminaire et présentation des résultats

Important: le délai compris entre la présentation du projet d'étude préliminaire et la présentation des résultats d'étude préliminaire 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 préliminaire.

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

Le laboratoire expert doit envoyer le **rapport d'étude préliminaire** (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.

Afin de gagner une semaine de délai, le laboratoire expert peut en assurer la diffusion lui-même auprès des membres du Bureau Technique et ceci à 2 conditions :

- le diffuser **2 à 3 semaines avant** la date de la réunion,
- demander à AFNOR Certification la liste à jour du Bureau Technique. Il devra être vigilant sur les exclusions éventuelles d'un ou plusieurs des représentants des fabricants.

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

Lors de cette 2ème étape, le Bureau Technique donne son avis sur les résultats obtenus lors de l'étude préliminaire.

Pour ce faire, à l'issue de la présentation, une discussion a lieu en l'absence du fabricant/demandeur et en présence du laboratoire expert. Puis **un vote est réalisé** en l'absence du fabricant/demandeur et du laboratoire expert en tenant compte de l'ensemble des résultats de l'étude préliminaire.

Ce vote donne l'avis du Bureau Technique. Le résultat de ce vote détermine si les résultats de l'étude préliminaire sont acceptés.

Les résultats du vote sont communiqués au fabricant et au laboratoire expert lors de la réunion.

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

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

Dans ce cas, le laboratoire expert doit donc également présenter, lors de cette réunion, un projet d'étude interlaboratoire. Le Bureau Technique donne son avis sur le projet d'étude interlaboratoire. La liste des laboratoires collaborateurs est incluse dans le projet ou est diffusée avant le démarrage de l'étude.

Toutes les modifications relatives au projet d'étude interlaboratoire 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 fabricant/demandeur, au laboratoire expert et aux rapporteurs.

3 Réalisation de l'étude interlaboratoire et présentation des résultats

Important: le délai compris entre la présentation du projet d'étude interlaboratoire et la présentation des résultats d'étude interlaboratoire 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 interlaboratoire.

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

Le laboratoire expert doit envoyer le **rapport d'étude interlaboratoire** (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).

Afin de gagner une semaine de délai, le laboratoire expert peut en assurer la diffusion lui-même auprès des membres du Bureau Technique et ceci à 2 conditions :

- le diffuser **2 à 3 semaines avant** la date de la réunion,
- demander à AFNOR Certification la liste à jour du Bureau Technique. Il devra être vigilant sur les exclusions éventuelles d'un ou plusieurs des représentants des fabricants.

AFNOR Certification convoque le laboratoire expert avec le fabricant demandeur au Bureau Technique.

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

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

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

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

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

4 Elaboration de l'attestation de validation

AFNOR Certification élabore un projet d'attestation qu'elle soumet pour avis au laboratoire expert (avec une copie au fabricant), avant consultation écrite auprès du Bureau Technique.

Lorsque cette attestation est approuvée par le Bureau Technique (y compris les fabricants n'ayant éventuellement pas participé à la présentation des études), elle est signée par le Directeur général d'AFNOR Certification.

Le fabricant reçoit l'original de cette attestation. Une copie est mise à disposition du public sur le site www.afnor-validation.org.

5 Rapport de synthèse des études

Comme suite à la décision de validation, de reconduction ou d'extension de validation d'une méthode, le laboratoire expert doit établir un document de synthèse des études (préliminaire et interlaboratoire)

Ce document reprend les éléments importants de ces études. Il a pour objectif de pouvoir être diffusé à toute personne en faisant la demande. Un modèle est disponible auprès d'ACE. Tous les rapports de synthèse publiés sont mis à disposition du public sur le site www.afnor-validation.org.

Aussi le fabricant 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 **2 mois après** le vote positif du Bureau Technique.

6 Durée de la validation

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

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

En cas de modification de la méthode de référence pendant la période de certification, la décision reste valable jusqu'à la date d'expiration prévue initialement.

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 demande de reconduction de la part du fabricant.

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

8 Cas de la reconduction

Les modalités de l'étude de reconduction sont définies à l'annexe 5 des règles de certification. Dans le cas où une étude complémentaire doit être réalisée, deux rapporteurs sont nommés lors d'une réunion du Bureau Technique suite à la demande de reconduction de la part du fabricant.

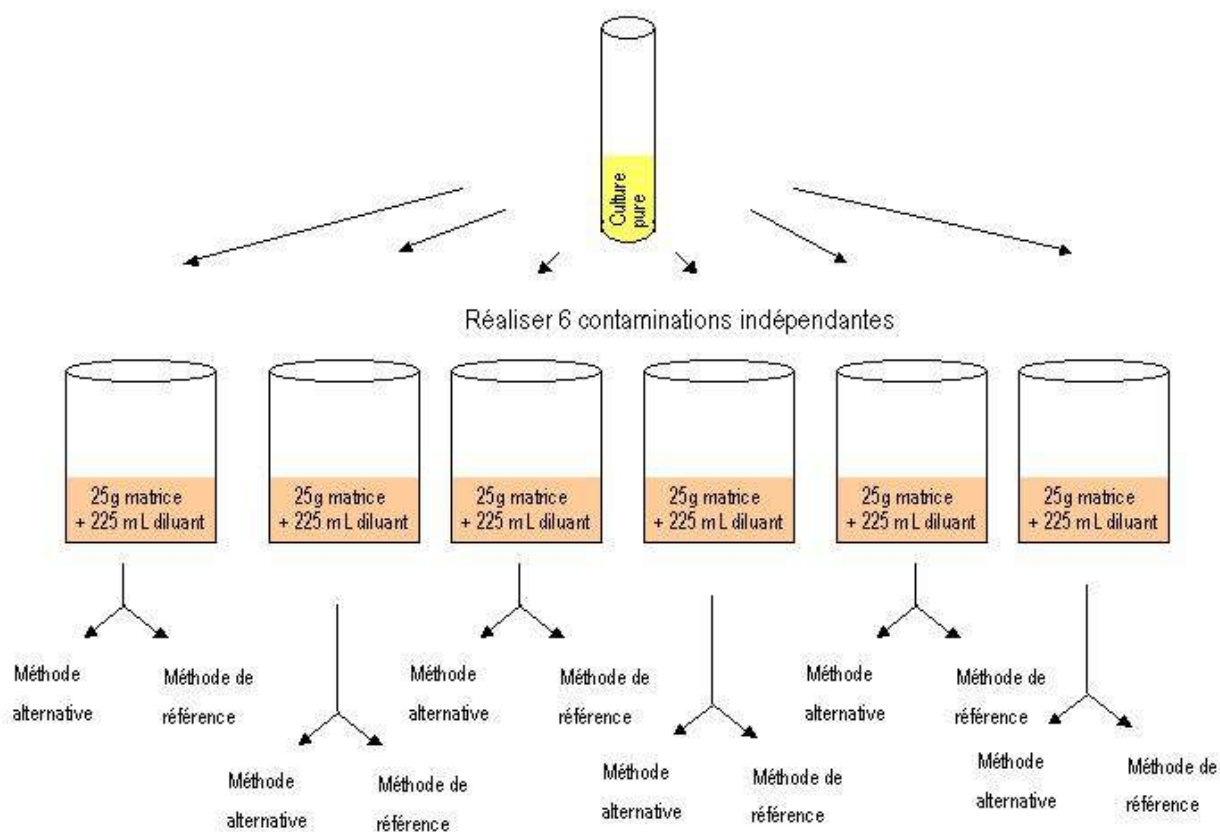
Le rapport de synthèse sera constitué d'un rappel des principaux résultats obtenus lors de la première étude de validation, et de la synthèse des compléments d'étude effectués.

Annexe 1

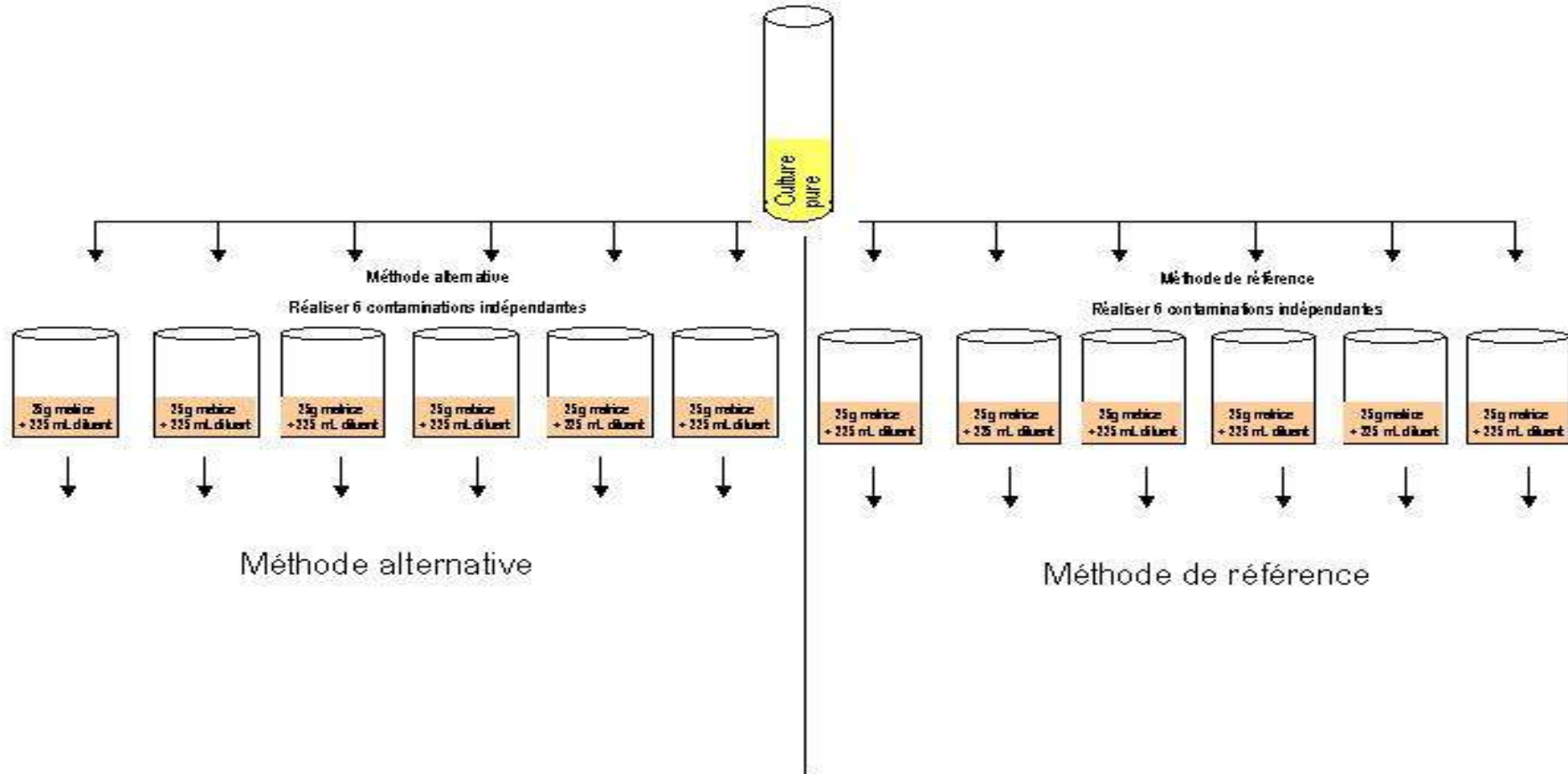
Protocole de mesure pour le calcul du niveau de détection relatif Méthodes qualitatives (§5.1.2 de la norme)

Voir les deux schémas suivants

Si les premières étapes sont communes entre la méthode alternative et la méthode de référence, réaliser pour chaque combinaison (niveau/matrice/souche) :



Si absence d'étape commune entre la méthode alternative et la méthode de référence, réaliser pour chaque combinaison (niveau/matrice/souche) :



Annexe 2

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 : $N = K \times DO$

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 $N = K \times D.O.$

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 :

$$\underline{m \times 0.434 \text{ et } m \times 0.575 \text{ bactéries/ml}}$$

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 :

$$\underline{n \times 0.0868 \text{ et } n \times 0.115 \text{ bactéries / ml}}$$

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 3

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 kits de détection de salmonelles. Les listes doivent être complétées pour atteindre les exigences spécifiques du présent document (cf. partie « Inclusivité et exclusivité de la méthode alternative (§ 5.1.3).

1 InclusivitéSouches de *Salmonella*

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

2 Exclusivité**Souches non *Salmonella***

GENRE	ESPECE
Citrobacter *	<i>freundii, diversus, youngae, koseri, braaki,</i>
Escherichia	<i>coli, hermanii</i>
Proteus	<i>mirabilis, vulgaris</i>
Klebsiella	<i>pneumoniae, oxytoca</i>
Enterobacter	<i>cloacae, sakazakii, agglomerans (ou Pantoea agglomerans)</i>
Serratia	<i>marcescens</i>
Hafnia	<i>alvei</i>
Shigella	<i>flexneri</i>

* Choisir trois espèces parmi les cinq.