



Analyses microbiologiques des produits et environnement agro-alimentaires

LAB GTA 59 - Révision 02

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI





SOMMAIRE

1	OBJET	4
2	REFERENCES ET DEFINITIONS	4
2.1	Références	4
2.2	Abréviations et définitions	4
3	DOMAINE D'APPLICATION	5
4	MODALITES D'APPLICATION	6
5	MODIFICATIONS APORTEES A L'EDITION PRECEDENTE	6
6	EXPRESSION DES PORTEES	6
7	GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES NORMATIVES ET RECOMMANDATIONS	7
7.1	Personnel	7
7.2	Installations et conditions ambiantes	7
7.3	Equipements et traçabilité métrologique	8
7.3.1	Bain d'eau thermostaté	8
7.3.2	Autoclave	9
7.3.3	Enceinte thermostatée (étuve, réfrigérateur, bain d'eau, etc.)	9
7.3.4	pH-mètre	10
7.3.5	Spectrophotomètre	10
7.3.6	Thermocycleur	10
7.4	Produits et services fournis par des prestataires externes	10
7.4.1	Consommables	10
7.4.2	Milieux de culture	10
7.4.3	Services fournis par un prestataire externe	11
7.5	Revue des demandes, appels d'offres et contrats	11
7.6	Méthodes d'essai	12
7.6.1	Sélection de méthodes	12
7.6.2	Vérification de méthodes	13
7.6.3	Validation des méthodes	14
7.6.4	Précisions concernant la pratique de certaines méthodes d'essai	14
7.7	Prélèvement et transport	15
7.8	Manutention des objets d'essais	15
7.9	Evaluation de l'incertitude de mesure	16
7.10	Assurer la validité des résultats	16
7.10.1	Contrôles qualité internes	16
7.10.2	Contrôles qualité externes	17
7.11	Rapport sur les résultats	17
7.12	Précisions sur l'application du règlement d'accréditation	17
7.12.1	Méthode spirale	17
7.12.2	Méthodes validées tierce partie (« alternatives »)	17
7.12.3	Méthodes normalisées « dénombrement d'un microorganisme par NPP et recherche » (ex : NF EN ISO 6888-3, NF EN ISO 21528-1)	18



7.12.4	Confirmation par spectrométrie de masse MALDI-TOF	18
7.12.5	Prélèvement.....	18
8	BIBLIOGRAPHIE	19

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



1 OBJET

La norme NF EN ISO/IEC 17025 définit les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Au regard de certains documents internationaux (par exemple, EA-4/02, ILAC P9 etc.) le Cofrac s'attache à développer dans des guides techniques d'accréditation (GTA) qu'il publie, des recommandations spécifiques au(x) domaine(s) technique(s) considéré(s), en vue de guider les organismes dans la mise en œuvre des exigences du référentiel d'accréditation et en vue d'harmoniser les approches.

Ce document vise à établir des recommandations issues des bonnes pratiques admises dans le domaine et de la normalisation en vigueur. Il constitue un guide de lecture des exigences de ladite norme pour le domaine de la Microbiologie appliquée aux analyses des produits alimentaires destinées à la consommation humaine ou animale ainsi qu'à celles de l'environnement agro-alimentaire.

Ce guide peut aussi être un outil pour les laboratoires mettant en œuvre les normes du domaine agro-alimentaire dans un autre domaine d'application (matières fertilisantes et supports de culture notamment).

Il ne se substitue pas aux exigences réglementaires et/ou aux normes applicables au sein du laboratoire. Les recommandations qu'il contient et que le laboratoire est libre d'appliquer sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO/IEC 17025 et notamment du document LAB REF 02. Dans tous les cas, il appartient au laboratoire de démontrer que les dispositions qu'il prend permettent de satisfaire pleinement les exigences de la norme citée ci-dessus.

2 REFERENCES ET DEFINITIONS

La liste des documents ci-dessous constitue une base de données non exhaustive. Il appartient au laboratoire d'assurer la veille documentaire (normative et réglementaire).

2.1 Références

Ce document s'applique en complément des documents suivants :

- NF EN ISO/IEC 17025 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ;
- LAB REF 02 : Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/IEC 17025:2017 ;
- LAB REF 05 : Règlement d'accréditation ;
- LAB REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation ;
- LAB INF 59 : Nomenclature et expression des lignes de portée d'accréditation pour les analyses microbiologiques des produits et environnement agro-alimentaires ;
- NF EN ISO 7218 : Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations.

2.2 Abréviations et définitions

Les abréviations suivantes sont utilisées :

- AFNOR : Association Française de normalisation www.afnor.org ;
- CAc : Commission d'Accréditation ;



- CEN : Comité Européen de Normalisation ;
- COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation, www.cofrac.fr ;
- EA : European co-operation for Accreditation www.european-accreditation.org ;
- ISO : International Organization for Standardization www.iso.org ;
- (O)CIL : (Organisateurs de) Comparaison Interlaboratoires.

Des définitions supplémentaires propres au domaine sont utilisées dans ce guide :

- **Prélèvement** : dans ce guide, le prélèvement est l'acte qui consiste à prélever un échantillon dans des conditions telles que les caractéristiques de l'échantillon pour laboratoire ne soient pas altérées.
- **Collecte** : acte de prendre des prélèvements préparés par le client sans effectuer l'acte de prélèvement et de les transporter sans perte d'intégrité au laboratoire pour les soumettre aux essais. Elle ne doit pas être confondue avec le prélèvement d'échantillon.
- **Définition de l'encart** :

Pistes de réflexion

Certains paragraphes du présent document sont accompagnés de questions pratiques ou pistes de réflexion pour aider le laboratoire dans sa démarche de mise en œuvre des exigences d'accréditation, en s'appuyant notamment sur une approche basée sur l'analyse de risques.

Ces pistes ne sont pas exhaustives, elles sont données à titre informatif pour guider les laboratoires afin de se mettre en conformité vis-à-vis de l'ensemble des exigences du référentiel.

3 DOMAINE D'APPLICATION

Ce guide technique d'accréditation s'adresse aux :

- Laboratoires d'essais accrédités ou candidats à l'accréditation selon la norme NF EN ISO/IEC 17025 pour le domaine cité en objet ;
- Évaluateurs du Cofrac, pour lesquels il constitue une base d'harmonisation pour l'évaluation ;
- Membres des instances décisionnelles du Cofrac : Comité de Section Laboratoires, Commission d'Accréditation Biologie Agro Alimentaire, Structures permanentes ;
- Clients des laboratoires d'essais accrédités sur ce domaine ;
- Instances officielles concernées par ce domaine.

Les analyses des échantillons de production primaire sont rattachées au domaine de la bactériologie animale (Agroalimentaire/Santé animale/Bactériologie - LAB GTA 36). Les laboratoires accrédités pour la recherche ou le dénombrement de microorganismes dans les produits et environnement agro-alimentaires et souhaitant rendre des résultats sous couvert de l'accréditation pour les matières fécales des animaux et échantillons environnementaux au stade de la production primaire sont au préalable évalués par le Cofrac sur ce type spécifique d'échantillons. En effet, la nature des échantillons analysés nécessite la mise en place de dispositions particulières à appliquer lors de leur prise en charge par le laboratoire.

Exemple : recherche de *Salmonella* spp selon la norme NF EN ISO 6579-1 ou recherche de *Campylobacter* spp selon la norme NF EN ISO 10272-1.

Pour les analyses réalisées dans le cadre réglementaire du paiement du lait, les exigences décrites dans le document Cofrac LAB REF 15 (Exigences spécifiques pour les analyses en vue du paiement du lait en fonction de sa composition et de sa qualité hygiénique et sanitaire) s'appliquent aux laboratoires.



Ce guide ne s'applique pas aux études de vieillissement et tests de croissance ou études de validation de méthodes alternatives mais peut s'appliquer aux analyses réalisées dans le cadre de ces études (*ex : s'applique au dénombrement des Listeria spp. mais ne s'applique pas pour la détermination du taux de croissance de Listeria dans le produit*).

4 MODALITES D'APPLICATION

Ce document est applicable à compter du **15 juillet 2019**.

Ce document contient à la fois des exigences et des recommandations.

Le terme « **doit** » est utilisé pour exprimer une exigence. Les exigences correspondent à la retranscription des exigences de la norme d'accréditation, du prescripteur ou de la réglementation, ou relèvent des règles d'évaluation et d'accréditation du Cofrac. Ainsi, dès lors que le texte reprend des exigences, elles sont surlignées en gris.

5 MODIFICATIONS APORTEES A L'EDITION PRECEDENTE

Du fait de la refonte du document et par souci de lisibilité, les modifications n'y sont pas repérées.

Les principaux changements concernent :

- le retrait des exemples des expressions de portées qui ont été transférés dans le document LAB INF 59,
- l'ajout de précisions concernant les vérifications et validation de méthodes, les contrôles des milieux de cultures et les règles d'accréditation dans le cas des méthodes alternatives et des confirmations par spectrométrie de masse.

6 EXPRESSION DES PORTEES

La portée d'accréditation demandée est définie par le laboratoire suivant les principes du document LAB REF 08.

Pour établir sa portée, le laboratoire se reporte aux tableaux qui listent les différents types d'analyses/d'essais les plus couramment rencontrés et pratiqués dans le domaine de la microbiologie de la chaîne alimentaire présentés dans les documents Cofrac LAB INF 59 et LAB INF 53.

Dans le domaine de la microbiologie de la chaîne alimentaire, la flexibilité de type FLEX2 s'applique uniquement pour les méthodes alternatives validées tierce partie.



7 GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES NORMATIVES ET RECOMMANDATIONS

En microbiologie de la chaîne alimentaire, la norme NF EN ISO 7218 décrit les exigences générales et les recommandations applicables dans le domaine.

7.1 Personnel

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 6.2
LAB REF 02

Le laboratoire doit disposer de personnel ayant des connaissances générales de microbiologie et des produits analysés, notamment de l'influence des processus de fabrication sur les microorganismes.

L'autorisation délivrée à une personne peut l'être pour une étape, plusieurs étapes ou l'ensemble d'une méthode.

Pistes de réflexion

Quels sont les moyens mis en œuvre par le laboratoire pour autoriser son personnel à exécuter des tâches spécifiques ? Par exemples :

- essais en double,
- supervision,
- utilisation de matériaux de référence, d'échantillons naturels dilués ou dopés,
- formations externes, etc.

Quels sont les éléments pris en compte par le laboratoire pour démontrer la pertinence de la formation de son personnel ?

- nombre d'essais (minimum à définir, par exemple 8 à 10 essais),
- représentativité des essais choisis (positifs et négatifs),
- variations des types de matrice, adaptées en fonction de la difficulté de mise en œuvre de la méthode, de l'activité du laboratoire et de la formation ou expérience déjà acquise par la personne en formation

Cette démarche est également applicable à l'autorisation du personnel à réaliser des prélèvements.

7.2 Installations et conditions ambiantes

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 6.3

Les conditions d'environnement (température, ensoleillement, variations thermiques, etc.) et les flux dans le laboratoire ne doivent pas être susceptibles de perturber la bonne application des méthodes d'analyses/d'essais et de modifier l'intégrité intrinsèques de l'échantillon soumis à l'essai.

De plus, la norme NF EN ISO 7218 indique que « des secteurs voisins qui sont le siège d'activités incompatibles doivent être effectivement séparés. Des mesures doivent être prises pour prévenir la contamination ».

La conformation minimale des locaux attendue dans le cadre de la mise en œuvre de méthodes de biologie moléculaire (PCR) est décrite dans la norme NF EN ISO 22174.



Pistes de réflexion

Pour maîtriser les risques de contaminations croisées liés à l'organisation des flux, le laboratoire s'interroge sur les éléments suivants :

- Comment sont organisées les salles ?
 - Salle de réception et de stockage des échantillons,
 - Salle de préparation des échantillons et de réalisation des analyses/essais,
 - Salle de préparation et de stérilisation des milieux de culture et du matériel,
 - Salle de décontamination et de nettoyage des matériels (autoclave -four) et laverie.
- Est-ce que l'analyse des échantillons autres que la microbiologie alimentaire (santé animale, eaux, etc.) a été prise en compte ?
- Quelles sont les modalités de séparation des salles ?
 - séparation spatiale ou au minimum une séparation temporelle des activités (ensemencement, laverie, préparation des milieux, etc.),
 - plans de nettoyage/désinfection,
 - programme de contrôle des surfaces et aérobiocontamination (fréquence, modalités),
 - dispositions de désinfection à suivre en cas de contamination accidentelle, contrôles d'environnement renforcés.

Note : Certaines exigences ainsi que les niveaux de confinement requis en fonction de la classe des microorganismes manipulés sont décrits dans des textes réglementaires (cf. bibliographie). L'utilisation d'équipements de protection (ex : PSM) lors de la manipulation de cultures contenant potentiellement des micro-organismes pathogènes doit respecter les réglementations en vigueur. Le laboratoire doit définir les niveaux de sécurité biologique de ses locaux conformément aux réglementations en vigueur.

7.3 Equipements et traçabilité métrologique

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 6.4, 6.5 et 7.11
LAB REF 02

Tout matériel et équipement dont les automates ainsi que leurs logiciels et bases de données détenus en vue d'effectuer les analyses /essais doivent être entretenus et vérifiés selon les exigences définies dans la norme NF EN ISO 7218 en conditions usuelles d'utilisation.

Lorsque du matériel informatique est utilisé à l'intérieur des locaux d'essais, le laboratoire doit apporter la preuve qu'il maîtrise les risques de contamination induits (protection des claviers, des courants d'air dus aux ventilateurs etc.).

Les logiciels ou LIMS ou bases de données sont à considérer comme des systèmes de gestion de l'information au sens du chapitre 7.11 de la norme.

7.3.1 Bain d'eau thermostaté

Deux principaux types d'utilisation requièrent un bain d'eau thermostaté : maintien des milieux en surfusion /préparation des milieux de culture et choc thermique. Le laboratoire peut éventuellement posséder un seul bain d'eau pour ces utilisations à condition qu'elles soient bien séparées dans le temps ; que le bain soit cartographié aux différentes températures et que sa localisation le permette.



7.3.2 Autoclave

Si des contrôles qualité des milieux de culture (aspect, couleur, pH, stérilité, essais de performance) sont effectués après la stérilisation, l'étalonnage des sondes des autoclaves n'est pas indispensable. Cela n'exclut pas la vérification systématique des cycles d'autoclavage.

7.3.3 Enceinte thermostatée (étuve, réfrigérateur, bain d'eau, etc.)

Le laboratoire peut, notamment, suivre le fascicule FD V 08-601 ou la norme FD X 15-140 pour effectuer la cartographie de toute enceinte thermostatée. Il est recommandé de réaliser au moins lors de la première mise en service, une cartographie pour les congélateurs et réfrigérateurs de stockage d'échantillons, de réactifs et kits.

Pistes de réflexion

Pour toute enceinte thermostatée ayant une influence sur le résultat (ex : bain d'eau servant à l'incubation, étuve, réfrigérateurs utilisés pour la conservation d'échantillons pour analyses à DLC et dans le cadre d'une étude de vieillissement), le laboratoire s'interroge sur les éléments suivants :

- les modalités de la cartographie (en conditions réelle d'utilisation, à mi-charge ou charge pleine) ?
- la nécessité de matérialiser les zones acceptables ?
- la fréquence de cartographie et les éléments à prendre en compte pour la définir? l'influence sur les résultats (température sélective, durée d'incubation), le type d'équipements (stabilité, historique, convection d'air forcé ou autre) ; sa réparation et/ou son déplacement,
- les différentes températures de cartographie selon l'utilisation de l'enceinte? (cas par exemple des incubateurs programmables),
- la fréquence d'étalonnage des sondes de suivi ?

Afin de maîtriser les températures et délais d'incubation, un contrôle effectif de la température est nécessaire, soit par enregistrement en continu (fortement recommandé) soit par thermomètre mini-maxi. Le laboratoire prend en compte au minimum l'incertitude de mesure de température dans la définition de ses erreurs maximales tolérées (EMT).

Pistes de réflexion

Quels sont les éléments pris en compte par le laboratoire pour gérer les dépassements de température ? Par exemple :

- la définition de temporisations cohérentes au regard des conditions opératoires (durée d'incubation et sélectivité ou non de la température),
- le type de chargement (boîtes/sacs),
- les seuils d'actions et/ou d'alertes,
- les conduites à tenir en fonction de l'étendue et de la durée de dépassement selon l'impact.

En l'absence de preuves de la maîtrise de la température et de la durée de dépassement, il est nécessaire que le laboratoire se pose la question sur la validité des résultats.



7.3.4 pH-mètre

Le recours à des solutions étalons raccordées au Système International d'unités SI dépend de l'utilisation du pH-mètre :

- il n'est pas obligatoire lorsque la mesure du pH n'intervient pas directement dans le résultat d'analyse /d'essai (ex : fabrication des milieux de culture)
- il est obligatoire lorsque c'est un résultat d'analyse/d'essai (ex : stabilité des produits appertisés et assimilés).

7.3.5 Spectrophotomètre

La fidélité, la linéarité et la justesse des photomètres utilisés sont systématiquement vérifiés. Les moyens mis en œuvre sont raccordés au SI.

Le laboratoire peut utiliser une plaque (ou cuve étalon) qu'il ne maîtrise pas en permanence sous réserve notamment qu'elle soit raccordée au SI et qu'il réalise lui même la vérification du spectrophotomètre.

7.3.6 Thermocycleur

Le raccordement au SI de la température des thermocycleurs est nécessaire.

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement une procédure de contrôle de ce type d'appareils (homogénéité de la plaque, en particulier en présence d'échantillons témoins, etc.). Afin de vérifier l'homogénéité des résultats, il est fortement recommandé d'effectuer des tests sur la totalité des positions utilisées, à une fréquence appropriée et au moins après une intervention sur l'appareillage.

Le laboratoire peut se référer à la norme XP CEN ISO/TS 20836.

7.4 Produits et services fournis par des prestataires externes

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 6.6
LAB REF 02

7.4.1 Consommables

Les verreries et consommables stériles devraient être facilement identifiables. Des tests périodiques de stérilité sont entrepris (des tests ou des contrôles qualité internes comme les blancs de série par exemple).

7.4.2 Milieux de culture

La norme NF EN ISO 11133 est applicable pour la préparation et le contrôle de performance des milieux de culture, des réactifs et des milieux de confirmation au laboratoire.

• Cas des milieux de culture préparés par le laboratoire

Les milieux de culture sont contrôlés à chaque nouveau lot. Un lot correspond à une unité fabriquée dans une unité de temps (par exemple autoclavage). Le laboratoire définit la notion du lot en fonction de la maîtrise de l'homogénéité de la production, de la traçabilité de la qualité de l'eau et des moyens utilisés (processus uniforme).

Dans tous les cas, un lot ne correspond pas à un lot de poudre déshydratée.

Les Drybag sont considérés comme des milieux fabriqués par le laboratoire, ils doivent donc être contrôlés en conséquence selon la NF EN ISO 11133.



• Cas des milieux de culture achetés prêts à l'emploi

Le contrôle des milieux prêts à l'emploi selon la norme NF EN ISO 11133 (y compris ceux supplémentés) doit être réalisé à une fréquence définie et au moins à chaque changement de fournisseur.

Pistes de réflexion

Pour définir et argumenter la fréquence de contrôle de la performance des milieux prêt à l'emploi, le laboratoire peut s'appuyer sur une analyse de risque en s'interrogeant sur :

- l'historique des fournisseurs ?
- la conformité des certificats qualité à la norme NF EN ISO 11133 ?
- les dispositions relatives aux contrôles internes ?
- la garantie des conditions de transports par le fournisseur, etc ?

Les réactifs Tempo sont considérés comme des milieux prêts à l'emploi car ils sont testés par ailleurs selon les préconisations du fabricant (se référer aux fiches techniques du fournisseur).

7.4.3 Services fournis par un prestataire externe

Dans le cas où le laboratoire confie à un prestataire externe des essais demandés par le client, le laboratoire assume alors la responsabilité des travaux confiés. A ce titre, le laboratoire se substitue au client en définissant la prestation à réaliser et en vérifiant que le rapport rendu par le prestataire externe est conforme à la demande initiale de son client.

Dans la norme NF EN ISO 6579-1, l'orientation sérologique telle que décrite (i.e au moins les sérums mélange) est obligatoire. Par conséquent, un laboratoire accrédité sur cette norme doit réaliser cette orientation sérologique. Seul le sérotypage complet (selon la norme FD CEN ISO TR 6579-3 par exemple) peut être confié à un autre laboratoire. Celui-ci est considéré comme une analyse supplémentaire. Dans ce cas précis, le résultat de l'analyse selon la norme NF EN ISO 6579-1 peut être rendu au client avant retour du sérotypage complet.

En cas de résultats discordants au retour du sérotypage complet, le laboratoire doit prendre les mesures nécessaires pour en informer son client et amender son rapport d'essai.

7.5 Revue des demandes, appels d'offres et contrats

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 7.1

Le laboratoire doit disposer d'une procédure pour la revue des demandes. Cette dernière doit, au moins, assurer que les exigences implicites et explicites, y compris les méthodes, sont adéquatement définies, documentées et comprises, que la méthode de prélèvements et/ou d'essai appropriée est choisie et qu'elle est capable de répondre aux exigences des clients.

En particulier, le laboratoire doit informer son client des restrictions concernant le domaine d'application (exemple : type de produits analysés, prise d'essai supérieure à 25g,...) et le type de flore dénombrée ou détectée (exemple : seulement *Salmonella* mobiles, levures et moisissures sans distinction) ainsi que tout écart aux méthodes analytiques.

La revue de contrat doit notamment prendre en compte les conditions de prélèvement, de conservation, d'acceptation des échantillons au laboratoire dont la température et les quantités de produits à fournir.



Pistes de réflexion

Le laboratoire a-t-il défini avec son client :

- le type de produits à prélever, la quantité, les outils pour prélever (stériles ou non), le moment de prélèvement sur la chaîne de fabrication ou de remise au consommateur, le mode de transport, les critères d'acceptation concernant le délai de réception, la température à réception ?
- les critères d'acceptation des échantillons à réception tels que quantité/masse/volume/surface prélevée, température, durée de transport (échantillons de l'environnement) et intégrité, etc.) ?
- les délais de mise en analyse en accord avec les exigences normatives ou réglementaires ?
- la température (ou les températures) de conservation souhaitée ainsi que la durée (ou les durées) de conservation pour chaque température pour les analyses à DLC notamment ?

Dans le cas où le laboratoire réalise la congélation des échantillons avant analyse, l'accord du client est requis et une information client est réalisée sur le rapport d'essai par mention de la phase de congélation et son impact éventuel conformément à la norme NF EN ISO 7218.

Dans le cadre de la coopération avec son client, lorsque le prélèvement n'est pas sous la responsabilité du laboratoire, les règles de prélèvement et de transport doivent être communiquées au client.

7.6 Méthodes d'essai

*NF EN ISO/IEC 17025 chap. 7.2
LAB REF 02
LAB REF 08*

7.6.1 Sélection de méthodes

Il n'est pas nécessaire de compléter ou de réécrire sous forme de procédures internes les méthodes reconnues. Cependant, lorsque la méthode sélectionnée laisse le choix entre plusieurs options, le laboratoire décrit alors la pratique ou les pratiques retenues.

Exemples :

- tube ou boîte pour un dénombrement ;
- essais de confirmation pour une méthode de recherche ;
- domaine d'application restreint ;
- paramètres recherchés ou dénombrés (*Listeria monocytogenes* et *Listeria spp*) ;
- température d'incubation ;
- etc.

Le laboratoire doit appliquer strictement les normes techniques et la norme d'exigences générales NF EN ISO 7218 et notamment le paragraphe 10.2.2 qui précise que pour les méthodes de dénombrement, une boîte par dilution doit être ensemencée pour 2 dilutions successives ou alors 2 boîtes dans le cas où il n'ensemence qu'une dilution. Il doit également définir ses critères d'acceptation (dénombrement entre 2 dilutions successives ou entre 2 boîtes de la même dilution) et les actions à mettre en œuvre (remise en analyse, etc.).

Les dispositions de la norme NF EN ISO 7218 s'appliquent lorsqu'elles sont plus récentes que celles des normes spécifiques. (ex : la température des bains d'eau pour la surfusion des milieux est de 44 à 47 C; le seuil des petits nombres est de 10 colonies), à l'exception des seuils supérieurs indiqués dans les normes spécifiques (ex : NF EN ISO 6888-2).



7.6.2 Vérification de méthodes

La vérification de méthode consiste à s'assurer de la capacité du laboratoire à appliquer la méthode choisie avant de la mettre en œuvre.

Elle s'applique à toute mise en place de méthode reconnue dans le laboratoire et à chaque révision/évolution de méthode. La vérification de méthode doit faire l'objet d'un enregistrement conformément aux exigences décrites dans le document Cofrac LAB REF 08.

Lors de l'évolution des méthodes reconnues citées en référence dans la portée d'accréditation, à la suite de nouvelles éditions ou révisions, le laboratoire mettra en application la nouvelle version selon les modalités qu'il aura définies dans son système qualité. Pour les méthodes normatives, à défaut d'exigences réglementaires ou normatives spécifiques, il est recommandé que cette mise à jour se fasse dans un délai de 6 mois à compter de la date de publication de la nouvelle révision du document.

Si la révision de la méthode reconnue implique une nouvelle compétence (notamment des changements de technologie : biologie moléculaire, ELISA, technique d'ensemencement, spectrométrie de masse, etc.), le laboratoire doit se soumettre à une évaluation du Cofrac avant de pouvoir revendiquer l'application de la méthode révisée sous accréditation et ce conformément au document LAB REF 08.

Note : Désormais, les normes du domaine de la microbiologie de la chaîne alimentaire indiquent le caractère mineur ou majeur des modifications selon l'impact sur les performances de la méthode. Il est à noter que ces notions « mineures » ou « majeures » n'ont pas de lien direct avec la notion de « compétence » introduite dans le document LAB REF 08 dans le cadre de la gestion de la flexibilité.

Dans le cas des méthodes validées tierce partie, le laboratoire doit agir de même et tenir à jour les notices fournisseurs et les attestations de ces méthodes. De plus, il doit s'assurer que la validation (certification) des méthodes mises en œuvre est toujours en vigueur.

Le laboratoire peut s'appuyer sur les normes spécifiques en vigueur du domaine décrivant des protocoles pour la vérification de méthodes. Le nombre d'échantillons et la représentativité des catégories à tester sont à définir par le laboratoire en fonction de son activité et des évolutions des méthodes concernées.

Pistes de réflexion

Le laboratoire possède-t-il une procédure de vérification de l'implémentation d'une méthode ?

Le laboratoire a-t-il identifié les critères de performances de la méthode requis ?

Quels sont les moyens mis en œuvre pour les atteindre ?

- des essais de répétabilité / reproductibilité (comparaison par rapport aux données de la méthode),
- la justesse de la méthode (exemple CIL),
- la limite de détection,
- l'identification des facteurs ayant une influence sur les résultats,
- l'évaluation de l'incertitude de mesure (méthodes quantitatives)
- les limites de la méthode et les points sensibles.



7.6.3 Validation des méthodes

Le laboratoire doit valider les méthodes non normalisées, les méthodes qu'il développe et les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu, ou autrement modifiées.

Pour tout écart à une norme existante (ex : utilisation hors du domaine d'application défini dans celle-ci, aliquote et réfrigération de la suspension-mère, non respect de la durée d'incubation, non respect du nombre de dilution, etc.), la méthode est considérée comme interne et doit être validée.

Une expertise documentaire est requise pour que le Cofrac puisse se prononcer sur la possibilité d'évaluer la demande d'accréditation du laboratoire pour l'emploi de la méthode interne en question.

Dans le cadre de cette expertise, un dossier de validation doit être fourni.

Dans tous les cas, le dossier destiné à l'expertise de recevabilité contient au moins les éléments suivants :

- la procédure de validation utilisée ;
- la description de la ligne d'essai de portée proposée ;
- la détermination des caractéristiques de performance de la méthode ;
- la description des équipements et réactifs ;
- l'évaluation des facteurs influençant le résultat et des incertitudes de mesure ;
- la conclusion quant à l'aptitude de la méthode.

Lorsqu'il existe une méthode de référence, la norme NF EN ISO 16140-2 est une aide pour évaluer les critères de performances.

Dans le cas des méthodes de biologie moléculaire, notamment des méthodes PCR, les normes NF EN ISO 20837, NF EN ISO 20838, NF EN ISO 22174, XP CEN ISO/TS 20836, et NF EN ISO 22119 peuvent être applicables. De plus, il est recommandé de s'appuyer sur la norme NF EN ISO 22118 qui décrit les critères de performance à évaluer lors de la validation d'une nouvelle méthode développée au laboratoire.

7.6.4 Précisions concernant la pratique de certaines méthodes d'essai

Préparation des suspensions mères et des dilutions :

Les masses des prises d'essais et le facteur de dilution (ou la masse de diluant) sont tracés.

Pour le respect du temps d'ensemencement de 45 minutes conformément à la norme NF EN ISO 6887-1, l'organisation générale du laboratoire est à prendre en compte et peut suffire si elle est correctement décrite.

Attention : pour pouvoir rendre un résultat d'analyse « micro-organisme X : détecté ou non détecté dans 25g », il est nécessaire de peser au moins 25g (une prise d'essai de 23,75g ne répond pas à l'exigence « non détecté dans 25g »). Pour un dénombrement, il est nécessaire de respecter le facteur de dilution ; ce n'est pas le cas, par exemple, pour une dilution au dixième avec une prise d'essai de 23,75g (25g -5%) et une masse finale de la suspension mère de 262,5g (250g +5%).

Produits gras (> 20%)

Dans le cas des produits gras, la quantité de Tween 80 à ajouter lors du pré-enrichissement peut être la quantité maximale citée dans la norme (mais sans jamais la dépasser). Par conséquent pour les autres produits, l'ajout systématique n'est pas autorisé.



Groupement/recomposition d'échantillons

Dans tous les cas, le recours aux pratiques de groupement ou recombinaison décrites dans la NF EN ISO 6887-1 doit être validé par le laboratoire (sauf si validé dans la méthode normative ou alternative validée tierce partie) ainsi que décrit et approuvé par le client.

La pratique de remplacer un plan d'échantillonnage à 2 classes « absence de *L. monocytogenes* dans 5 prises d'essai de 25g » par « absence dans 25g correspondant au regroupement de 5 prises d'essai de 5g » est complètement proscrite sauf tolérance réglementaire en vigueur.

Pour augmenter la représentativité de l'analyse d'un échantillon constitué **d'une** unité, la note DGAL/SDSSA/N2010-8245 du 23 août 2010 (*note originelle : N2008-8009 du 14 janvier 2008*) autorise de constituer une prise d'essai de 25g à partir de plusieurs unités d'un même lot. Le résultat doit être rendu pour une seule prise d'essai de 25g.

Exemple : un échantillon de 5 fromages arrive au laboratoire. Sur chaque fromage, l'analyse doit être réalisée sur 25g pour répondre au plan d'échantillonnage réglementaire ($n=5, c=0$). 5 résultats d'analyses sont obtenus (un pour chaque fromage). Si le client demande une seule analyse (plan d'échantillonnage $n=1, c=0$), pour en augmenter la représentativité, il est possible de prélever au total 25g dans plusieurs fromages (2 à 5). Un seul résultat d'analyse est obtenu sur cet échantillon composé.

7.7 Prélèvement et transport

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 7.3 et 7.4
LAB REF 02

Lorsque le laboratoire n'est pas accrédité pour cette activité, il définit les conditions de prélèvement afin de garantir l'intégrité de l'échantillon.

Le transport des échantillons vers le laboratoire est réalisé dans des conditions évitant toute modification du nombre de microorganismes. Les produits congelés ou surgelés sont transportés, de préférence à une température négative, de façon à ce que le produit arrive congelé au laboratoire.

Si le laboratoire a recours à un transporteur, il vérifie que les exigences (suivi de la température avec son propre équipement, durée, emballage etc.) liées au transport sont bien respectées et conformes aux textes réglementaires, normatifs ou spécifications client.

7.8 Manutention des objets d'essais

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 7.4

La température de l'échantillon pour laboratoire (produit périssable ou réfrigéré) ou de l'enceinte de transport doit être mesurée et enregistrée à réception au laboratoire. Elle constitue une indication primordiale pour l'exploitation des résultats de l'analyse.

Si un échantillon congelé arrive décongelé au laboratoire, la recongélation n'est pas possible. Le laboratoire évalue la pertinence du maintien de l'analyse en fonction de la température de transport et du délai entre la date de prélèvement et la date de réception.

Les critères d'acceptation à réception sont décrits dans la procédure de réception des échantillons.



7.9 Evaluation de l'incertitude de mesure

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 7.6
LAB REF 02

Conformément au document Cofrac LAB REF 02, l'identification des facteurs d'influence est demandée (y compris ceux issus du prélèvement) que ce soit pour les méthodes qualitatives ou quantitatives.

En terme d'incertitude de mesure sur les résultats d'analyse, la norme NF EN ISO 7218 fait uniquement référence à la norme XP ISO/TS 19036 (concerne seulement les méthodes de dénombrement). Toutefois, d'autres démarches sont envisageables et peuvent être acceptées si elles sont justifiées.

La norme XP ISO/TS 19036 décrit trois méthodes d'évaluation des incertitudes sur les résultats des analyses de dénombrement. Les laboratoires sont fortement incités à utiliser l'approche expérimentale (reproductibilité intralaboratoire) pour chaque type de produit analysé et au moins pour les 4 groupes de matrices définis dans la norme XP ISO/TS 19036 (liquides et poudres, mélange de solides (produits mixés), petits solides et autres solides) pour un laboratoire multi-produits.

Il est également précisé que la norme XP ISO/TS 19036 peut être appliquée pour les méthodes de dénombrement en NPP.

L'évaluation des incertitudes est réactualisée suffisamment régulièrement pour tenir compte de l'évolution de son organisation et du type de matrices alimentaires que le laboratoire est amené à analyser. Pour se faire, il peut privilégier une évaluation de ces incertitudes sur un mode glissant plutôt qu'un mode cumulatif dans le temps.

7.10 Assurer la validité des résultats

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 7.7
LAB REF 02

Le laboratoire doit répondre à cette exigence aux moyens de la mise en œuvre :

- de contrôles « internes », lui permettant de surveiller la validité de ses résultats ;

Et

- de contrôles « externes », si existants et appropriés, lui permettant de s'assurer de la performance de ses activités de laboratoire.

7.10.1 Contrôles qualité internes

Essais à blanc :

Il est recommandé que le laboratoire réalise régulièrement des « analyses à blanc » (exemple : analyse d'un milieu de dilution pour mimer une suspension mère).

Contrôles qualitatifs et quantitatifs :

La réalisation des contrôles positifs est décrite dans la norme NF EN ISO 7218. Ces contrôles sont formalisés et réalisés à une fréquence définie, et les résultats obtenus sont exploités.

La confirmation de colonies ou cultures suspectes est vérifiée à l'aide de souches caractéristiques et de faux positifs.



7.10.2 Contrôles qualité externes

Essais d'aptitude :

Lors de l'inscription aux essais d'aptitudes, le laboratoire veille, si possible à ce que les matrices proposées par les organisateurs recouvrent les matrices analysées par le laboratoire.

En microbiologie des aliments, la participation au moins deux fois par an pour chaque méthode est recommandée.

Dans le cas où l'OCIL ne réalise pas l'exploitation de résultats obtenus par plusieurs méthodes pour le même microorganisme, il appartient au laboratoire d'exploiter les résultats en interne en s'appuyant sur le rapport fourni par l'OCIL.

S'il arrive que l'OCIL fournisse des échantillons non contaminés, le laboratoire s'assure qu'au moins une des deux participations annuelles est bien réalisée sur des échantillons positifs. Dans le cas contraire, un essai sur des échantillons dopés ou une autre CIL peut être réalisé.

7.11 Rapport sur les résultats

NF EN ISO/IEC 17025 chap. 7.8
LAB REF 02

• Déclarations de conformité, avis et interprétations

La norme NF EN ISO 7218 introduit une limite de quantification pour les méthodes de dénombrement. En effet, lorsque le nombre de colonies est inférieur à 4, le résultat doit être exprimé comme suit : « microorganismes présents mais inférieur à $4 \times 1/d$ ufc/g ou ufc/ml ». En fonction du critère à vérifier et de la dilution retenue, une déclaration de conformité peut ne pas pouvoir être émise. Dans ce cas, le laboratoire peut introduire en commentaire, par exemple, le nombre de colonies comptées à titre indicatif (entre 1 et 3).

Rappel : La déclaration de conformité ou les avis et interprétations ne peuvent pas être étendus au lot si le laboratoire n'est pas accrédité pour l'échantillonnage et le prélèvement.

7.12 Précisions sur l'application du règlement d'accréditation

7.12.1 Méthode spirale

Pour rappel, la méthode spirale peut être utilisée avec les normes spécifiques qui prévoient son utilisation. Le laboratoire est tenu toutefois d'informer le Cofrac afin de définir les modalités d'intégration dans sa portée d'accréditation.

La méthode spirale peut également être appliquée pour des méthodes avec ensemencement en surface. Cependant, une évaluation préalable sur site avec examen du dossier de validation est nécessaire avant l'extension de la portée d'accréditation.

Si un laboratoire souhaite appliquer cette méthode pour un milieu de culture normalement ensemencé dans la masse, il s'agit de l'instruction d'une méthode interne nécessitant l'examen préalable d'un dossier de validation (une expertise technique).

7.12.2 Méthodes validées tierce partie (« alternatives »)

Les méthodes « alternatives » (validées tierce partie) correspondent à des méthodes certifiées sous marque AFNOR validation ou tout autre organisme équivalent (par ex : NordVal, Microval, validation AOAC...),

Lorsqu'un laboratoire souhaite être accrédité sur des méthodes alternatives comportant une étape de confirmation, le Cofrac s'assure au préalable que le laboratoire est accrédité sur la méthode prise en référence afin de pouvoir l'appliquer sous couvert de l'accréditation.



De plus, si le protocole fournisseur prévoit la confirmation par une autre méthode alternative, le laboratoire doit être accrédité pour cette dernière (s'il utilise cette option). En cas de résultats discordants entre la méthode validée et sa confirmation, le laboratoire doit avoir des dispositions lui permettant d'émettre le résultat.

Si un laboratoire souhaite être accrédité sur des méthodes alternatives sans étape de confirmation, et qu'il ne demande pas conjointement l'accréditation pour la méthode normalisée prise en référence lors de la validation tierce partie, alors il doit avoir des dispositions en cas de résultats douteux ou incohérents.

Pour des demandes de méthodes validées par un organisme autre qu'AFNOR Certification (marque NF Validation), une expertise préalable peut être nécessaire (ex : demande d'information sur la méthode de référence utilisée lors de la validation...). Dans ce cas, l'annexe technique d'accréditation précise par quel organisme de certification/validation la validation a été prononcée.

Les méthodes alternatives complètes sont validées avec des produits consommables (ex. nom du fabricant du milieu) et des équipements bien identifiés, le laboratoire ne peut pas utiliser un milieu d'un autre fabricant. En revanche, le laboratoire peut choisir son milieu si, et seulement si, la notice cite un fournisseur à titre d'exemple et permet donc un changement.

A noter : le laboratoire ne peut pas être accrédité uniquement pour la ou les étapes de confirmation d'une méthode.

7.12.3 Méthodes normalisées « dénombrement d'un microorganisme par NPP et recherche » (ex : NF EN ISO 6888-3, NF EN ISO 21528-1)

Lorsqu'un laboratoire souhaite être accrédité sur ces normes alors qu'il ne réalise que la partie recherche, le Cofrac en est informé afin que cette précision soit apportée à la portée d'accréditation. L'ajout ultérieur du dénombrement NPP sur la portée fait l'objet d'une évaluation préalable sur site.

7.12.4 Confirmation par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'ajout de la confirmation par spectrométrie de masse MALDI-TOF (si elle est prévue dans les notices techniques ou les normes) à la portée d'accréditation fera l'objet d'une évaluation préalable sur site. Si cette compétence (spectrométrie de masse MALDI-TOF) a déjà été évaluée sur site, la portée pourra être mise à jour après information du Cofrac.

A noter : En l'absence d'évaluation préalable sur site par le Cofrac, les résultats confirmés avec le MALDI-TOF ne peuvent pas être rendus sous couvert de l'accréditation.

7.12.5 Prélèvement

L'évaluation sur site de cette activité est fixée au moins à une demi-journée supplémentaire.

Lors de l'évaluation, l'évaluateur :

- observe des prélèvements sur le terrain représentatif des denrées principalement analysées par le laboratoire et représentatif du nombre de préleveurs ;
- peut éventuellement demander une simulation au laboratoire ou dans un lieu proche dans le cas d'une visite de surveillance.



8 BIBLIOGRAPHIE

NF EN ISO 9000 : Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire.

Article : "On the compositing of samples for qualitative microbiological testing"- B. Jarvis- Letters in Applied Microbiology – volume 45 issue 6 (2007) + erratum 2008,46(1).

NF EN 12128 : Biotechnologie - Laboratoires de recherche, de développement et d'analyse - Niveaux de confinement des laboratoires de microbiologie, zones à risque, situations et exigences physiques de sécurité.

NF X15-140 : Mesure de l'humidité de l'air - Enceintes climatiques et thermostatiques - Caractérisation et vérification.

Accreditation for Microbiological Laboratories - Eurachem Guide

Normes techniques liées au domaine microbiologie :

NF EN ISO 6887-1 : Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 1 : règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

NF EN ISO 6887-2 : Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 2 : règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits à base de viande.

NF EN ISO 6887-3 : Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 3 : règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche.

NF EN ISO 6887-4 : Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 4 : règles spécifiques pour la préparation de produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche.

NF EN ISO 6887-5 : Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 5 : règles spécifiques pour la préparation des produits laitiers.

NF EN ISO 6579-1 : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.

XP ISO/TS 19036 : Microbiologie des aliments - Lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives.

XP ISO/TS 19036/A1 : Microbiologie des aliments - Lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives - Incertitude de mesure sur les faibles taux.

FDV 08-601 : Microbiologie des aliments - Enceintes thermostatiques - Caractérisation, vérification et suivi quotidien.

NF EN ISO 11133 : Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture

NF ISO 18593 : Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons.

NF EN ISO 17604 : Microbiologie de la chaîne alimentaire -- Prélèvement d'échantillons sur des carcasses en vue de leur analyse microbiologique

XP CEN ISO/TS 17728 : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Techniques de prélèvement pour l'analyse microbiologique d'échantillons d'aliments

NF EN ISO 707 : Lait et produits laitiers. — Lignes directrices pour l'échantillonnage

NF EN ISO 22174 : Microbiologie des aliments - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour



la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments - Exigences générales et définitions.

XP CEN ISO/TS 20836 : Microbiologie des aliments - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments - Essais de performance pour des thermocycleurs.

NF EN ISO 22119 : Microbiologie des aliments - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments - Exigences générales et définitions.

NF EN ISO 20837 : Microbiologie des aliments - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments - Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative.

NF EN ISO 20838 : Microbiologie des aliments - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments - Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives.

NF EN ISO 17468 Septembre 2016

Microbiologie de la chaîne alimentaire - Exigences et recommandations techniques pour le développement ou la révision d'une méthode de référence normalisée - Microbiologie des aliments

Normes de validation :

NF EN ISO 16140-2 : Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

NF V03-111 : Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole d'évaluation intra-laboratoire d'une méthode alternative d'analyse qualitative par rapport à une méthode de référence.

NF EN ISO 22118 : Microbiologie des aliments - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection et la quantification des micro-organismes pathogènes dans les aliments - Caractéristiques de performance

Textes réglementaires :

Arrêté du 16 juillet 2007, « Mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes », J.O n° 179 du 4 août 2007 page 13106 (N° 209, p. 133379), Réf. NOR: TAST9611280A.

Règlement (CE) n°2073/2005 du 15 novembre 2005 de la Commission et rectifications concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

Règlement (CE) no 1441/2007 du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n°2073/2005 et rectifications concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.