



**Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire
Performances analytiques certifiées**

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME NF EN ISO 16140 : 2003**

N° attestation : BKR 23/02 – 11/02

| | |
|------------------------|-------------|
| Date de validation : | 28.11.2002 |
| Dates de reconduction: | 25.05.2007* |
| | 24.09.2010 |
| Dates d'extension: | 27.09.2007 |
| | 12.05.2011 |
| | 29.03.2013 |
| Fin de validité : | 28.11.2014 |

* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 lors de la 1^{ère} reconduction

La Société
(Siège social) Solabia S.A.S
29 rue Delizy
93698 PANTIN cedex
France

Site de production Biokar Diagnostics
Rue des Quarante Mines
ZAC de Ther, Allonne
B.P. 10245 – 60002 Beauvais Cedex
France

est autorisée à faire référence à la marque NF VALIDATION pour la méthode alternative qualitative d'analyse ci-dessous :

COMPASS® Listeria Agar
Validée pour la détection des *Listeria spp* et des *Listeria monocytogenes*

Référence du protocole : BM123/FR/2007-05 : 11

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement de production.

RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-1 (Février 1997) et son amendement A1 (Février 2005) : Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : Méthode de recherche.

A blue ink signature of the name 'Florence MÉAUX' over a blue horizontal line.

Directrice Générale
Florence MÉAUX



ACCREDITATION
N° 50030
PORTÉE
DISPONIBLE SUR
WWW.COFRAK.FR

AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France

Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00

[www.afnor.org](http://WWW.AFNOR.ORG) - [www.afnor-validation.org](http://WWW.AFNOR-VALIDATION.ORG)

PRINCIPE DE LA METHODE

COMPASS® *Listeria* Agar est un milieu de culture gélosé dont la formulation correspond à celles préconisées dans l'amendement A1 de la norme EN ISO 11290 (parties 1 et 2). Il permet la détection de *Listeria monocytogenes* et des autres espèces appartenant au genre *Listeria* spp, en une seule étape préalable d'enrichissement sélectif, après 24 heures d'incubation des boîtes à 37°C (il est possible de prolonger l'incubation jusqu'à 48 heures).

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* et certaines souches de *Listeria ivanovii* apparaissent bleu à bleu-vert, entourées d'un halo opaque. Les autres espèces de *Listeria* forment des colonies bleues à bleu vert, sans halo. La confirmation est ensuite effectuée à partir des colonies caractéristiques isolées sur COMPASS® *Listeria* Agar.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

Listeria monocytogenes :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) en repartant des colonies caractéristiques isolées sur COMPASS® *Listeria* Agar ;
- En utilisant CONFIRM' *L.mono* Agar®, selon les instructions décrites dans la notice correspondante ;
- En utilisant le bouillon CONFIRM' *L.mono*®, selon les instructions décrites dans la notice correspondante. En cas de réaction « douteuse » (virage de l'indicateur plus faible), réaliser une galerie biochimique ou se reporter aux tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO.
- En mettant en œuvre une autre méthode certifiée NF VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode COMPASS® *Listeria* Agar. Le protocole de détection de la seconde méthode validée devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes. Les deux méthodes doivent donc avoir un tronc commun.

Note : Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, il n'est pas nécessaire d'effectuer la confirmation en cas de résultat positif par la méthode de détection COMPASS® *Listeria* Agar si le même échantillon a déjà été confirmé positif lors du dénombrement avec COMPASS® *Listeria* Agar (BKR 23/05 – 12/07).

Listeria spp :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO, en incluant l'étape de purification (par exemple, tests Gram et Catalase), en repartant des colonies caractéristiques isolées sur COMPASS® *Listeria* Agar ;
- Mise en œuvre de la gélose PALCAM selon les instructions décrites dans la notice correspondante ou
Mise en œuvre d'une microgalerie d'identification biochimique, à partir d'une colonie isolée ;
- En mettant en œuvre une autre méthode certifiée NF VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode COMPASS® *Listeria* Agar. Le protocole de détection validé de la seconde méthode validée devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes. Les deux méthodes doivent donc avoir un tronc commun.

En cas de résultats discordants (positif présomptif par la méthode alternative, non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

Note 1 (Historique de validation)

La méthode COMPASS® *Listeria* Agar, pour la recherche des *Listeria monocytogenes* en 24 heures, a fait l'objet des études de reconduction et d'extension de 2007. Elle a remplacé les deux méthodes alternatives COMPASS® *L. mono* Agar qui étaient certifiées NF VALIDATION sous deux références d'attestation : BKR 23/1 – 09/02 (recherche en 48h) et BKR 23/2 – 11/02 (recherche en 24h).

Pour la **reconduction** de mai 2007, le protocole de validation basé sur la norme EN ISO 16140 a été pris en compte. De plus, la formulation de COMPASS® *Listeria* Agar a changé par rapport à celle de COMPASS® *L. mono* Agar. Il s'en suit que l'étude de validation (préliminaire et interlaboratoire) a été totalement refaite.

L'**étude d'extension** de COMPASS® *Listeria* Agar présentée en septembre 2007 a permis de valider une nouvelle option de confirmation : CONFIRM' *L.mono* Agar. Des essais ont été réalisés sur des souches pures susceptibles de présenter des colonies caractéristiques sur COMPASS® *Listeria* Agar.

- 153 souches de *Listeria monocytogenes* de sérotypes et d'origines variées ont été testées
- 106 souches non cibles (48 *Listeria* autres que *monocytogenes* et 58 souches non *Listeria*) ont été testées.

Les résultats obtenus étaient satisfaisants. Ils ne sont pas disponibles dans la présente attestation.

Lors de l'étude de **reconduction** de septembre 2010, aucun essai complémentaire de validation n'a été réalisé puisque la méthode COMPASS® *Listeria* Agar n'a pas été modifiée depuis la dernière validation, et que le protocole de validation ainsi que la méthode de référence n'ont pas changé.

En mai 2011, une **étude d'extension** a permis d'étendre le champ d'application de la méthode COMPASS® *Listeria* Agar à la détection des *Listeria spp*. Des essais complémentaires ont été réalisés en exactitude/spécificité/sensibilité relatives, pour le niveau de détection relatif et l'inclusivité. Les résultats sont disponibles ci-après.

En février 2013, cette attestation a été rééditée pour mettre à jour la référence de protocole, sans impact sur le protocole validé.

En mars 2013, une nouvelle **étude d'extension** a permis de valider l'utilisation du test Bouillon CONFIRM'L.*mono* pour la confirmation des *Listeria monocytogenes* obtenues sur gélose COMPASS *Listeria* Agar.

Une étude de sélectivité a été menée en vue d'évaluer ce test et les résultats sont les suivants :

- Sur 150 souches cibles testées sur gélose COMPASS *Listeria* Agar, 145 souches ont donné un test Bouillon CONFIRM'L.*mono* après 6 heures d'incubation,
Pour les 5 autres souches, le virage de l'indicateur était plus faible à 6 heures. La poursuite de l'incubation jusqu'à 24 heures a permis d'obtenir un test positif pour 3 d'entre elles (*Listeria monocytogenes* A00C036, Ad 235 et Ad 626). Pour 2 autres, le test est resté douteux (*Listeria monocytogenes* 7711/7516 et A00C054).
- Sur 100 souches non cibles, seules les 20 souches de *Listeria ivanovii* testées ont donné des colonies typiques avec halo sur gélose COMPASS *Listeria* Agar. Toutes ces souches ont donné un test Bouillon CONFIRM'L. *mono* négatif.

NOTE 2 (format déshydraté de milieu de base)

L'attestation fut rééditée en juin 2009 pour prendre en compte les modifications de la notice technique de COMPASS® *Listeria* Agar. Les modifications portaient sur l'ajout d'un milieu de base au format déshydraté accompagné de deux suppléments. La formule du milieu complet n'avait pas changé. Les modifications n'avaient pas donné lieu à des essais complémentaires.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative
Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Réponse *Listeria monocytogenes* :

Des essais ont été effectués en 2007 sur 334 échantillons dont 74 naturellement contaminés, 89 artificiellement contaminés et 171 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits laitiers, produits carnés, produits de la pêche, produits végétaux et divers, prélèvements d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**. Les interprétations ont été réalisées après 24 h d'incubation des boîtes.

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140) :

| Réponses | Méthode de référence positive (R+) | Méthode de référence négative (R-) |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Méthode alternative positive (A+) | Accord positif A+ / R+ PA = 151 ⁽¹⁾ | Déviation positive A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾ |
| Méthode alternative négative (A-) | Déviation négative A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾ | Accord négatif A- / R- NA = 174 ⁽³⁾ |

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 3 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

NOTE : Lors de l'étude de validation, pour deux échantillons de produits laitiers, les halos sont apparus à 48 heures d'incubation.

Réponse *Listeria spp* :

Des essais ont été effectués en 2011 sur 279 échantillons dont 121 naturellement contaminés, 43 artificiellement contaminés et 115 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits laitiers, produits carnés, produits de la pêche, produits végétaux, prélèvements d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**. Les interprétations ont été réalisées après 24 heures et 48 heures d'incubation des boîtes.

Tableau de résultats « lecture à 24 heures » (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

| Réponses | Méthode de référence positive (R+) | Méthode de référence négative (R-) |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Méthode alternative positive (A+) | Accord positif A+ / R+ PA = 158 ⁽¹⁾ | Déviation positive A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾ |
| Méthode alternative négative (A-) | Déviation négative A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾ | Accord négatif A- / R- NA = 115 ⁽³⁾ |

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 7 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Tableau de résultats « lecture à 48 heures » (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

| Réponses | Méthode de référence positive (R+) | Méthode de référence négative (R-) |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Méthode alternative positive (A+) | Accord positif A+ / R+ PA = 160 ⁽¹⁾ | Déviation positive A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾ |
| Méthode alternative négative (A-) | Déviation négative A- / R+ ND = 2 ⁽²⁾ | Accord négatif A- / R- NA = 115 ⁽³⁾ |

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 2 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

(3) dont 8 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Pour les deux réponses, les pourcentages obtenus, par rapport à la méthode de référence, sont les suivants :

| | Réponse <i>L.monocytogenes</i> | Réponse <i>L. spp</i> | |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| | | A 24 heures | A 48 heures |
| Exactitude relative : AC % | 97,3 | 97,8 | 98,6 |
| Spécificité relative : SP % | 98,9 | 98,3 | 98,3 |
| Sensibilité relative : SE % | 95,6 | 97,5 | 98,8 |

Note : une spécificité relative inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs

La sensibilité a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

| Réponse | Méthode alternative (SE %) (PA + PD) / (PA + PD + ND) = | Méthode de référence (SE %) (PA + ND) / (PA + PD + ND) = |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 95,6% | 98,8% |
| <i>Listeria spp</i> (24 heures) | 97,6% | 98,8% |
| <i>Listeria spp</i> (48 heures) | 98,8% | 98,8% |

Analyse des discordants (selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140)

Réponse *Listeria monocytogenes* :

PD = 2 , ND = 7 donc Y = PD + ND = 9 ; 6 ≤ Y ≤ 22 m = 2 , M = 1 donc m > M

Réponse *Listeria spp* (24 heures) :

PD = 2 , ND = 4 donc Y = PD + ND = 6 ; 6 ≤ Y ≤ 22 m = 2 , M = 0 donc m > M

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

Réponse *Listeria spp* - Conservation des bouillons Fraser ½ pendant 72 heures à 4°C

Les résultats obtenus après conservation à 4°C pendant 72 heures des bouillons Fraser ½ préalablement incubés ont été comparés à ceux obtenus immédiatement après incubation.

Du fait du stockage à 4°C des bouillons Fraser 1/2, trois échantillons pour lesquels les résultats étaient positifs directement après incubation sont devenus négatifs après conservation au froid.

Le stockage au froid ne modifie pas les résultats de l'interprétation statistique. L'analyse statistique de ces trois discordants reste conforme à celle précédemment établie, les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

NIVEAU DE DETECTION relatif

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2007, puis en 2011, sur au total 6 combinaisons « produit alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux et divers, produits de la pêche, prélèvements d'environnement.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

| Matrice | Souche | Niveau de détection relatif LOD₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml) | |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| | | Méthode alternative | Méthode de référence |
| Rillettes | <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 | 0,4 [0,1 – 1,3] | 0,4 [0,1 – 1,3] |
| Lait cru | <i>Listeria monocytogenes</i> 4b | 0,6 [0,4 – 0,9] | 0,6 [0,4 – 1,0] |
| Saumon fumé | <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a | 0,4 [0,2 – 1,1] | 0,4 [0,2 – 1,1] |
| Haricots verts | <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 | 0,1 [0,1 – 0,4] | 0,1 [0,1 – 0,4] |
| Eau de process | <i>Listeria monocytogenes</i> | 0,7 [0,5 – 0,9] | 0,7 [0,5 – 0,9] |
| Saumon fumé | <i>Listeria innocua</i> 1 | 0,3 [0,2 – 0,4] | 0,3 [0,2 – 0,4] |
| Fromage frais de chèvre | <i>Listeria ivanovii</i> Ad 991 | 0,8 [0,5 – 1,5] | 0,8 [0,5 – 1,5] |

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas. FDA. 2006. *Final Report and Executive Summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. Appendix K. Statistics Working Group (Tholen, D. W., D. S. Paulson, B. Jarvis, D. M. Mettler, B. Lombard, K. Newton, M. A. Mozola, and A. D. Hitchins.) Report Part 4a - LOD50.*

Conclusion

Le niveau de détection relatif de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 1,3 UFC/25 g.

Le niveau de détection relatif de la méthode alternative se situe entre :

- Détection de *Listeria monocytogenes* : 0,1 et 1,3 UFC/25 g ; il est identique à celui de la méthode de référence.
- Détection de *Listeria spp* : 0,2 et 1,5 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

Listeria monocytogenes :

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- Parmi les 30 souches non *Listeria monocytogenes* testées, 8 souches de *Listeria ivanovii* ont donné des colonies bleues avec auréole d'opacification après 24 heures d'incubation. Les auréoles obtenues sont plus petites que celles obtenues avec *L. monocytogenes*.

Listeria spp :

- 52 souches de *Listeria* autres que *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 52 testées.
- L'étude de 54 souches non *Listeria* spp n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** en *Listeria monocytogenes* se fait en 3 à 4 jours selon les tests de confirmation réalisés avec la méthode alternative, contre 4 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **positifs** en *Listeria spp* se fait en 3 à 4 jours selon les tests de confirmation réalisés avec la méthode alternative, contre 4 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** (en l'absence de colonies typiques) se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 4 à 5 jours avec la méthode de référence.
 - Dans le cas de résultats présumés positifs par la méthode alternative, mais rendus négatifs après confirmation, les résultats négatifs sont obtenus en 3 à 4 jours, selon les tests réalisés.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* sérotype 4b aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25ml
- 1 à 10 UFC/25 ml
- 5 à 50 UFC/25 ml

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour chaque niveau de contamination, soient 24 analyses au total par laboratoire participant.

Résultats :

| Niveaux de contamination | Nombre total d'échantillons | Nombre d'échantillons analysés | Nombre de résultats exploités | Nombre de résultats négatifs | | Nombre de résultats positifs | |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----|------------------------------|-----|
| | | | | REF | ALT | REF | ALT |
| 0 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 0 | 0 |
| 1 | 96 | 96 | 96 | 3 | 3 | 93 | 93 |
| 2 | 96 | 96 | 96 | 0 | 0 | 96 | 96 |

Calculs

- L'exactitude relative est de 100%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 98,4%

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

Degré d'accord : % de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés par le même laboratoire dans des conditions de répétabilité. C'est la moyenne des probabilités que deux réplicats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Concordance : % de chance de trouver le résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). C'est le % de toutes les paires de réplicats donnant le même résultat.

Odds ratio (COR) : il est défini par la formule suivante :

$$\text{COR} = \text{degré d'accord} \times (100 - \text{concordance}) / (\text{concordance} \times (100 - \text{degré d'accord}))$$

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode alternative** :

| Niveau de contamination | Degré d'accord % | Concordance % | COR |
|-------------------------|------------------|---------------|------|
| L0 | 100,0 | 100,0 | 1,00 |
| L1 | 94,5 | 93,9 | 1,12 |
| L2 | 100,0 | 100,0 | 1,00 |

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode de référence** :

| Niveau de contamination | Degré d'accord % | Concordance % | COR |
|-------------------------|------------------|---------------|------|
| L0 | 100,0 | 100,0 | 1,00 |
| L1 | 94,5 | 93,9 | 1,12 |
| L2 | 100,0 | 100,0 | 1,00 |

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est identique à celle de la méthode de référence.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire sur le site www.afnor-validation.org