

Contacts:

Stéphanie SAMMARTANO
Ingénieure certification
stephanie.sammartano@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 62 39

Jérôme FAYOL
Chargé de clientèle
jerome.fayol@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 60 63

Réf.: SSO/JFY/NF102/Clients/ BioControl Systems/
Avis BT_TRANSIA PLATE Listeria_2015-07-06_R5

Objet : Marque NF VALIDATION

BioControl Systems
Monsieur Philip FELDSINE
12822 SE 32nd Street
Bellevue, WA 98005
Etats-Unis

La Plaine Saint-Denis, le 6 juillet 2015

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 2 juillet 2015 par le Bureau Technique « Microbiologie agroalimentaire » de la marque NF VALIDATION (NF102), j'ai l'honneur de vous annoncer que le **droit d'usage de la marque NF VALIDATION est reconduit** pour la méthode d'analyse suivante :

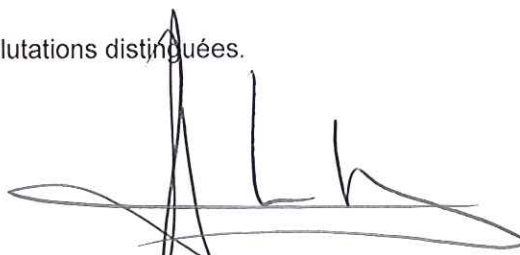
TRANSIA PLATE *Listeria*

Certifiée sous le certificat N° TRA 02/06-11/95, avec pour fin de validité le 21-nov.-2019

La méthode est validée pour la recherche de *Listeria* spp. dans tous les produits d'alimentation humaine et les échantillons de l'environnement de production, par comparaison à la méthode de référence NF EN ISO 11290-1 (1997) et son amendement A1 (2005) et selon le protocole NF EN ISO 16140 (2003).

Un courrier complet de conclusions mentionnant d'éventuelles réserves prononcées par le Bureau Technique, vous sera prochainement adressé. Le cas échéant, celles-ci devront être prises en compte sans délai.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, mes salutations distinguées.



Directeur Général
Franck LEBEUGLE



Contact :

Stéphanie SAMMARTANO
stephanie.sammartano@afnor.org
Tel : +33 (0)1 41 62 62 39
Fax : + 33 (0)1 49 17 90 86

Ref. : SSO/NF102/Clients/BioControl Systems/
Avis BT octobre 2011_reconduction TPL_R4

BioControl Systems, Inc
Monsieur Christophe BAUER
37, Gratteloup
45490 LORCY, France

Objet : NF VALIDATION

Saint-Denis, le 10 octobre 2011

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 6 octobre 2011 par le Bureau Technique "Microbiologie" de la marque NF VALIDATION, dans son application à l'agroalimentaire, j'ai l'honneur de vous annoncer que le droit d'usage de la marque NF VALIDATION est reconduit pour la méthode alternative d'analyse suivante :

Transia Plate Listeria

Certifiée sous le n° d'attestation TRA 02/06 – 11/95, avec pour fin de validité : 21-Nov.-2015

Un courrier complet de conclusions mentionnant d'éventuelles réserves prononcées par le Bureau Technique, vous sera adressé prochainement. Dans ce cas, celles-ci devront être prises en compte sans délai.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, mes salutations distinguées.



Directrice Générale
Florence MÉAUX





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

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

N° attestation : TRA 02/06 – 11/95

Date de validation :	21.11.1995
Dates de reconduction:	07.02.2000
	11.12.2003
	04.12.2007*
Fin de validité :	21.11.2011

**Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 lors de la 3^{ème} reconduction*

La Société
(siège social et
site de production)

BioControl Systems Inc.
12822 SE 32nd Street
Bellevue, WA 98005
USA

Distributeur

BioControl Systems France
Centre d'affaires DMCI
4, Quai des Etroits
69005 LYON
FRANCE

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

TRANSIA PLATE *Listeria*

Référence du protocole : 55071F.R000.022008 (10 microplaques)
55080F.R000.032008 (1 microplaque)

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et prélèvements d'environnement.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-1 incluant l'**amendement A1 (2004)** : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : Méthode de recherche - (février 1997).

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

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
certification@afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test TRANSIA PLATE *Listeria* est composé :

- d'une plaque de microtitration à barrettes sécables, sur les puits de laquelle sont greffés des anticorps spécifiques d'antigènes flagellaires de *Listeria*,
- de réactifs prêts à l'emploi permettant le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Après les étapes d'enrichissement (bouillon Fraser 1/2, puis bouillon Fraser complet), un choc thermique libère les antigènes des *Listeria* éventuellement présents dans l'échantillon à analyser. Le test TRANSIA PLATE *Listeria*, basé sur une réaction immuno-enzymatique de type sandwich, est réalisé à partir d'un aliquot de Fraser chauffé 20 minutes à 95-100°C.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir du bouillon Fraser complet non chauffé, de l'une des manières suivantes :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification)
- par isolement sur gélose chromogène *Listeria* selon Ottaviani & Agosti, suivi d'une galerie biochimique, sans purification préalable si la colonie suspecte de *Listeria* est bien isolée.
- Par isolement sur gélose ALOA[®], suivi d'une confirmation sur gélose ALOA[®] Confirmation si la colonie suspecte est caractéristique de *L. monocytogenes* (confirmation de l'espèce *monocytogenes*), ou suivi d'une confirmation à l'aide des tests Gram et catalase (confirmation du genre *Listeria*)
- En utilisant toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode TRANSIA PLATE *Listeria*. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble (Cf. notice du fabricant)

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

NOTE

L'étude de reconduction menée en 2007 et faisant l'objet de la présente attestation, a été réalisée selon la norme EN ISO 16140. La méthode alternative présente plusieurs modifications qui ont été testées pendant cette étude :

- élargissement du domaine d'application aux prélèvements d'environnement.
- possibilité de conserver le bouillon Fraser non chauffé pendant 72 heures à 2-8°C avant la réalisation du test TRANSIA PLATE *Listeria*.
- Nouvelles modalités de confirmation (Cf. principe)

Aucun résultat n'a été repris des études précédentes.

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

Des essais ont été effectués en 2007 sur 325 échantillons de produits dont 95 naturellement contaminés, 70 artificiellement contaminés et 160 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la pêche et prélèvements d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**.

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme 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⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 160 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon positif non confirmé

(3) dont un échantillon présumé positif non confirmé

Les pourcentages obtenus, par rapport à la méthode de référence, sont les suivants :

- Exactitude relative : **AC = 97,8%**
- Spécificité relative : **SP = 98,8%**
Note : une spécificité relative inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs
- Sensibilité relative : **SE = 96,9%**

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

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,0\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,8\%$$

Conclusion

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

$$PD = 2, ND = 5 \text{ donc } Y = PD + ND = 7 ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 2, M = 0 \quad \text{donc } m > M$$

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas statistiquement différentes.

Etude de la conservation des bouillons Fraser pendant 72 heures à 2-8°C

Les échantillons positifs ont tous été retestés après conservation des bouillons Fraser pendant 72 heures à 2-8°C.

Les résultats sont équivalents à ceux obtenus directement après incubation : seul un échantillon faux négatif devient positif après conservation du Fraser.

Les identifications réalisées après conservation sont identiques à celles réalisées sans conservation du Fraser.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2007, sur les cinq combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la pêche et 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 LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes artisanales	<i>L. welshimeri</i>	0,7 [0,4 – 1,2]	0,7 [0,4 – 1,2]
Lait cru	<i>L. ivanovii</i>	0,6 [0,4 – 0,8]	0,6 [0,4 – 0,8]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes 1/2a</i>	0,6 [0,3 – 1,0]	0,6 [0,3 – 1,0]
Mélange de légumes crus	<i>L. monocytogenes 4b</i>	0,8 [0,5 – 1,3]	0,8 [0,5 – 1,3]
Eau de process	<i>L. innocua</i>	0,4 [0,2 – 0,8]	0,4 [0,2 – 0,8]

(3) **LOD₅₀** : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas

"Hitchins A. Proposed Use of a 50% Limit of detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of Presence-Absence Microbial detection Methods, Draft 10th December, 2003"

Conclusion

Les niveaux de détection des méthodes alternative et de référence sont identiques et se situent entre 0,2 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* et non *monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 30 souches non *Listeria* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- L'obtention des résultats **positifs**, pour le **genre *Listeria***, se fait en 3 jours (si confirmation avec A.L.O.A.) ou 4 jours (si confirmation par tests classiques) avec la méthode alternative, contre 3 à 6 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **positifs**, pour l'espèce ***L. monocytogenes***, se fait en 4 jours (si confirmation avec A.L.O.A.) à 9 jours (si confirmation par tests classiques) avec la méthode alternative, contre 9 à 11 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative, contre 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 4 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

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

- 0 UFC/ 25ml
- 3 UFC/ 25ml
- 30 UFC/ 25ml

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	112	104	80	80	80	0	0
1	112	104	80	13	14	67	66
2	112	104	80	0	0	80	80

* Un laboratoire a reçu les échantillons endommagés. Il n'a pas réalisé les analyses.

**Deux laboratoires ont reçu les échantillons hors délai, et un autre laboratoire a reçu les échantillons avec une température à réception supérieure à 8,4°C. Leurs résultats n'ont pas été pris en compte dans l'exploitation.

Calculs

- L'exactitude relative est de **99,6 %**
- La spécificité est de **100 %**
- La sensibilité est de **91,3 %**

Interprétation

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

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

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,3\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	74%	70,8%	1,20
L2	100%	100%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	75%	72,5%	1,16
L2	100%	100%	1,00

Les pourcentages de degrés d'accord et de concordance pour le niveau 1 sont dus au fait que certains échantillons, théoriquement contaminés, se sont révélés négatifs (ces résultats étaient pour la plupart concordants entre la méthode TRANSIA PLATE Listeria et la méthode de référence).

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est équivalente 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