

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_TPLM_2016-03-18_R2

Objet : Marque NF VALIDATION

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

La Plaine Saint-Denis, le 18 mars 2016

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 18 mars 2016 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 monocytogenes*

Certifiée sous le certificat N° TRA 02/11-03/08, avec pour fin de validité le 27-mars-2020

La méthode alternative est validée pour la recherche des *Listeria monocytogenes* 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 de validation 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 décembre 2011 Reconduction TPLM

BIOCONTROL SYSTEMS
Monsieur Christophe BAUER
37, Gratteloup
45490 LORCY
France

Objet : NF VALIDATION

Saint-Denis, le 5 décembre 2011

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 1^{er} décembre 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 monocytogenes*

Pour la détection de *Listeria monocytogenes*
dans les produits d'alimentation humaine et les échantillons d'environnement

Certifiée sous le n° TRA 02/11 – 03/08, avec pour fin de validité : 27-Mars-2016

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 NF EN ISO 16140 : 2003**

N° attestation : TRA 02/11 – 03/08

**Date de validation : 27.03.2008
Fin de validité : 27.03.2012**

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 monocytogenes*

Référence du protocole : 55097F.R000.052008

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-1 / A1 (2004) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* – Partie 1 : méthode de recherche / amendement 1.

**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 monocytogenes* est basé sur une réaction immuno-enzymatique (test ELISA) de type sandwich en deux étapes. Il permet la détection des *Listeria monocytogenes* après les étapes d'enrichissement (plusieurs protocoles sont disponibles en fonction des matrices analysées) et un choc thermique qui libère les antigènes des *Listeria monocytogenes* éventuellement présents dans l'échantillon à analyser qui seront spécifiquement reconnus par les anticorps spécifiques de la protéine P60 de *Listeria monocytogenes*.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés:

- A partir du bouillon Fraser selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- Soit par isolement à partir du bouillon Fraser pour l'enrichissement sur gélose chromogène *Listeria* selon Ottaviani & Agosti ou sur gélose RAPID'*L.mono*.
- Soit en utilisant tout autre méthode certifiée AFNOR Validation, de principe différent de la méthode TRANSIA PLATE *Listeria monocytogenes*

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

De plus, dans cette étude, tous les échantillons positifs (artificiellement ou naturellement contaminés) ont été retestés après 72 heures de conservations du bouillon Fraser à $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pour valider la possibilité de réalisation des tests après conservation des bouillons au froid jusqu'à 72 h.

NOTE

La méthode présente plusieurs protocoles :

1. Protocole général tous produits sauf produits carnés crus et produits laitiers crus avec étapes d'incubation à 30°C communes avec la méthode TRANSIA Plate *Listeria spp* puis incubation pendant 16 à 24 heures à 37°C .
2. Protocole général tous produits sauf produits carnés crus et produits laitiers crus et une étape d'incubation pendant 20-26 heures à 30°C suivie d'une incubation 24-26 heures à 37°C .
3. Protocole produits carnés crus et produits laitiers crus (Fraser $\frac{1}{2}$).
4. Protocole produits carnés crus (L-PALCAM).

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 341 échantillons (incluant les produits carnés crus avec protocole L-PALCAM) ou 354 échantillons (incluant les produits carnés crus avec protocole Fraser $\frac{1}{2}$) dont 93 naturellement contaminés (produits carnés crus avec protocole L-PALCAM) ou 91 (produits carnés crus avec protocole Fraser $\frac{1}{2}$), 59 artificiellement contaminés et 189 non contaminés (produits carnés crus avec protocole L-PALCAM) ou 204 (produits carnés crus avec protocole Fraser $\frac{1}{2}$), 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 NF EN ISO 16140) :

4 combinaisons de protocoles d'enrichissement ont été testées. Chaque combinaison permettait de couvrir l'ensemble des catégories d'échantillons à analyser.

1) Protocole général (20h, 30°C puis 24h, 37°C) + produits laitiers crus (20h, 30°C puis 40h, 37°C) + produits carnés crus (Fraser ½ 20h, 30°C puis 40h, 37°C) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 142 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 204 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (3) dont aucun échantillon positif non confirmé

2) Protocole général (20h, 30°C puis 24h, 37°C) + produits laitiers crus (20h, 30°C puis 40h, 37°C) + produits carnés crus (L-PALCAM 23h, 37°C puis 22h, 37°C) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 131 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 9 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 12 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 189 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (3) dont aucun échantillon positif non confirmé

3) Protocole général (20h, 30°C puis 22h, 30°C, puis 16h, 37°C) + produits laitiers crus (20h, 30°C puis 40h, 37°C) + produits carnés crus (Fraser ½ 20h, 30°C puis 40h, 37°C) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 145 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 204 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon positif non confirmé

(3) dont un résultat positif non confirmé

4) Protocole général (20h, 30°C puis 22h, 30°C, puis 16h, 37°C) + produits laitiers crus (20h, 30°C puis 40h, 37°C) + produits carnés crus (L-PALCAM 23h, 37°C puis 22h, 37°C) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 134 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 9 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 9 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 189 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon positif non confirmé

(3) dont un résultat positif non confirmé

Les pourcentages obtenus, par rapport à la méthode de référence, sont les suivants pour chaque combinaison de protocoles d'enrichissement :

	1)	2)	3)	4)
Exactitude relative : AC	97,7%	93,8%	98,6%	94,7%
Spécificité relative : SP	99,5%	95,5%	99,5%	95,5%
Sensibilité relative : SE	95,3%	91,6%	97,3%	93,7%

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

Combinaison de protocoles d'enrichissement	Méthode alternative : (PA + PD) / (PA + PD + ND) =	Méthode de référence : (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
1)	95,3%	99,3%
2)	92,1%	94,1%
3)	97,3%	99,3%
4)	94,1%	94,1%

Conclusion

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

Combinaison de protocoles d'enrichissement	Y = PD + ND =	M	m
1)	8	0	1
2)	21	5	9
3)	5		
4)	18	4	9

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques quelle que soit la combinaison de protocoles d'enrichissement utilisée.

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
Viande hachée	<i>L.monocytogenes</i> 1/2c	Fraser ½ 1,9 [1,3 – 2,8] L-PALCAM 1,3 [0,7 – 2,5]	1,7 [1,3 – 2,4]
Lait cru	<i>L.monocytogenes</i> 1/2b	0,4 [0,2 – 0,5]	0,4 [0,2 – 0,5]
Produits végétaux crus	<i>L.monocytogenes</i> 4b	0,6 [0,3 – 1,0]	0,6 [0,3 – 1,0]
Filets de poisson fumé	<i>L.monocytogenes</i> 1/2a	0,8 [0,5 – 1,3]	0,8 [0,5 – 1,3]
Eau de process	<i>L.monocytogenes</i> 1/2c	0,5 [0,3 – 0,8]	0,5 [0,3 – 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 Used 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

Le niveau de détection obtenu pour la viande hachée crue, mettant en œuvre les protocoles spécifiques « produits carnés crus » est compris entre 0,7 et 2,8 UFC/25g pour la méthode alternative et 1,3 et 2,4 UFC/25g pour la méthode de référence.

Pour les autres catégories alimentaires, le niveau de détection de la méthode alternative et de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

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

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en deux à trois jours avec la méthode alternative contre trois à six jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en deux à trois jours avec la méthode alternative contre cinq 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 trois à cinq jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml
- 1-10 UFC/25 ml
- 10-100 UFC/25 ml

Durant cette étude, le protocole tous produits sauf produits carnés crus et produits laitiers crus avec un enrichissement secondaire de 24-26 heures à 37°C a été mis en œuvre.

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	104	104	88	88	88	0	0
1	104	104	88	0	0	88	88
2	104	104	88	0	0	88	88

*Un laboratoire a été exclu pour cause d'intercontamination et un laboratoire pour cause de problème de lecteur de DO.

Calculs

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

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 :

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

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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

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