



**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 : BRD 07/05 – 09/01

Date de validation :	28.09.2001
Date de reconduction*:	09.12.2005
	02.07.2009
Dates d'extension :	28.09.2006
	25.09.2008
Fin de validité :	28.09.2013

** Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la reconduction en 2005*

La Société **BIO-RAD**
(siège social) 3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE
FRANCE

Site de **BIO-RAD**
production Route de Cassel
59114 STEENVOORDE
FRANCE

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

RAPID'L.MONO
Méthode de dénombrement

Référence du protocole : **RAPID'L.Mono (356-3694 et 355-5294) – V11**
Test Rhamnose (355-3669) – **V0**

DOMAINE D'APPLICATION


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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-2 (1997) incluant l'**amendement A1 (2005)** – Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 2 : Méthode de dénombrement.


Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode permet d'effectuer le dénombrement sur un seul milieu (le RAPID'*L.Mono*), après préparation des échantillons (revivification) conformément à la méthode de référence ISO 11290-2.

Rapid'*L.Mono* est un milieu de culture gélosé chromogénique, permettant une identification spécifique de *Listeria monocytogenes*, sur la base de la détection spécifique de l'activité PIPLC (Phosphatidyl Inositol Phospholipase C) chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*, qui forment des colonies bleues. La fermentation du xylose permet de différencier *L. ivanovii* (xylose + : présentant un halo jaune autour de la colonie) de *Listeria monocytogenes* (xylose - : ne présentant pas de halo jaune autour de la colonie)

En cas de résultat positif par la méthode de dénombrement, la confirmation n'est pas nécessaire dans la mesure où la présence de *Listeria monocytogenes* a été confirmée lors de la recherche.

Dans les autres cas, la confirmation des échantillons positifs doit être réalisée à partir d'une seule colonie isolée par RAPID'*L.Mono* de l'une des manières suivantes :

- par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) ;
- par utilisation de sondes nucléiques tel que prévu dans la norme NF EN ISO 7218 (avec ou sans l'étape de purification) ;
- par repiquage par spot sur une gélose 'Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti' directement à partir de RAPID'*L. Mono* ;
- par mise en œuvre du test Rhamnose ;
- par utilisation de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode RAPID'*L.Mono*. Le protocole validé de la seconde méthode 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..

NOTE (HISTORIQUE DE VALIDATION)

1/ Reconduction en 2005 avec extension du domaine d'application

L'étude de reconduction menée en 2005 a permis d'étendre le domaine d'application de la méthode RAPID'*L.Mono* à tous les produits alimentaires et prélèvements d'environnement.

Pour prendre en compte le nouveau protocole de validation EN ISO 16140, la quasi intégralité de l'étude de validation a été refaite, sauf pour les chapitres inclusivité/exclusivité et praticabilité, pour lesquels les résultats antérieurs avaient été repris.

2/ Extension en 2006 pour la lecture à 24 heures

Un activateur de croissance a été ajouté dans la formule du milieu RAPID'*L.Mono* afin de proposer une lecture finale des *Listeria monocytogenes* après 24 heures \pm 2 heures d'incubation (au lieu de 24 et 48 heures précédemment).

L'étude de validation/reconduction effectuée en 2005 a été complétée pour la partie exactitude relative, sur 29 échantillons positifs interprétables couvrant l'ensemble du domaine d'application. Le protocole EN ISO 16140 a été mis en oeuvre pour l'analyse de ces échantillons.

Les résultats pour toutes les catégories testées ont montré l'équivalence entre la lecture des géloses incubées à 24 heures à 37°C ou incubées 48h à 37°C. Ces résultats complémentaires ne figurent pas dans la présente attestation.

3/ Extension en 2008 pour l'utilisation d'un nouveau test de confirmation

L'étude d'extension conduite en septembre 2008 a permis de valider un nouveau test de confirmation : le Test Rhamnose.

Des essais ont été réalisés à partir de souches pures sur :

- 150 souches cibles de *Listeria monocytogenes* de sérotypes et d'origine variés
- 105 souches non cibles

Les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus.

4/ Dans le cadre de la reconduction de 2009, aucun essai complémentaire n'a été réalisé, la méthode RAPID'L. Mono n'ayant pas été modifiée depuis la dernière validation, et le protocole de validation ainsi que la méthode de référence restant inchangés.

LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

Etude de linéarité :

Des essais ont été effectués en 2005 sur les 5 combinaisons produit alimentaire/souche et dans les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés en double par chacune des deux méthodes, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants : 10 à 50, 50 à 100, 100 à 500, 500 à 1 000, 1 000 à 10 000 UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 b	$y = 0,950 x + 0,031$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 b	$y = 0,998 x - 0,030$
Produits végétaux	Chou / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$y = 0,965 x + 0,078$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	$y = 1,001 x - 0,047$
Environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 c	$y = 1,014 x - 0,148$

$y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$x = \log(N \text{ méthode de référence})$

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2005. L'exploitation statistique a porté sur 54 résultats interprétables provenant de 30 échantillons naturellement contaminés et 24 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits végétaux, produits de la pêche, environnement.

Les échantillons ont été analysés en double par chacune des deux méthodes.

A titre indicatif, les domaines de contamination (concentration) étaient les suivants :

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log UFC/g)
Produits carnés	1,1 à 6,5
Produits laitiers	1,0 à 5,1
Produits végétaux	2,1 à 5,5
Produits de la pêche	2,9 à 6,6
Environnement	2,0 à 5,3

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, est la suivante :

$$\text{Equation de la droite : } y = 1,019 x - 0,170$$

$y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$x = \log(N \text{ méthode de référence})$

La répétabilité pour les deux méthodes et le biais entre les deux méthodes ont été déterminés selon le mode de calcul utilisé pour l'étude collaborative (Cf. § 6.3.5 et § 6.3.6 de la norme NF EN ISO 16140). Ces résultats apportent une information complémentaire pour le critère exactitude

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode alternative est de 0,21.
La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,16.

Le biais entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant : $D = -0,09 \log \text{ UFC/g}$

Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE) 1998 et 2008

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

En 1998, les études ont été réalisées par l'Institut Pasteur de Paris (centre de référence des *Listeria*) et par le laboratoire expert de la Validation AFNOR.

- 357 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 358 testées. La souche non reconnue était une *Listeria monocytogenes* 3a qui n'a pas exprimé d'activité PIPLC.
- L'étude de 109 souches *Listeria non monocytogenes* et de 100 souches non *Listeria* 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 2 jours avec la méthode alternative (ou 4 à 7 jours en cas de confirmation) contre 4 à 7 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 2 jours (si pas de confirmations) ou 4 à 7 jours (avec confirmations) avec la méthode de référence

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2005 avec 15 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* 1/2 b aux 4 niveaux suivants (en cellules / ml) :

- niveau 0
- niveau 1 : 50 – 500
- niveau 2 : 500 – 5000
- niveau 3 : 5000 – 50000

Les laboratoires ont testé, par chacune des **deux méthodes**, **deux réplicats par niveau** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais (alt – ref)
Niveau 1	11	0,367	0,367	0,563	0,654	-0,054
Niveau 2	11	0,140	0,140	0,146	0,162	- 0,030
Niveau 3	11	0,050	0,138	0,082	0,194	-0,005

* Les échantillons de quatre laboratoires ont été exclus de l'interprétation des résultats (l'un pour une réception tardive et les trois autres en raison des températures à réception non conformes aux exigences).

Conclusion pour l'étude interlaboratoire

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence :

- Les répétabilités sont comparables pour les trois niveaux.
- La reproductibilité du niveau 1 est moins élevée pour la méthode de référence, alors que les répétabilités des niveaux 2 et 3 sont comparables.
- L'hypothèse selon laquelle le biais entre les deux méthodes est nul est statistiquement acceptée pour tous les niveaux.

Conclusion générale

La méthode RAPID'L.Mono a été comparée à la méthode NF EN ISO 11290-2 :2005.

Les résultats obtenus permettent de conclure que :

- la linéarité de la méthode alternative est satisfaisante,
- l'exactitude relative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence est satisfaisante.

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