



**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 07/17 – 01/09

**Date de validation : 26.01.2009
Fin de validité : 26.01.2013**

La Société
(siège social, distributeur,
et site de production)

Bio-Rad
3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE
FRANCE

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

AL - méthode de dénombrement

Référence du protocole : AL protocole court / Gélose – V2
356-3695 / 356-4041
356-4042 / 356-4043

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-2 (février 1997) incluant l'amendement **A1** (février 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**

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

La méthode AL pour le dénombrement est un milieu de culture gélosé chromogénique, qui permet simultanément de détecter le genre *Listeria* par mise en évidence d'une coloration bleue à bleu-verte (activité β -D-glucosidase) et de différencier les *Listeria monocytogenes* par apparition d'un halo opaque autour de la colonie (activité phospholipase C).

Le milieu AL estensemencé à 37°C (\pm 1°C) (en surface ou en profondeur) à partir de la suspension-mère diluée soit en Eau Peptonée Tamponnée (avec ou sans revivification), soit en bouillon Fraser ½ (avec revivification) incubée à 20°C (\pm 2°C) pendant 1h (\pm 5min). Le résultat final du dénombrement est obtenu après 48h (\pm 3h) (avec formation de colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* à partir de 24h).

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés de l'une des manières suivantes, à raison d'au moins une colonie par boîte :

- A partir des colonies isolées selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO en incluant l'étape de purification.
- Par l'utilisation de sondes nucléiques tel que prévu dans la norme EN ISO 7218 à partir des colonies isolées (avec ou sans l'étape de purification).
- A partir d'une colonie isolée par repiquage par spot sur gélose RAPID'L. *Mono*, sans purification préalable.
- Par l'utilisation de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la gélose A.L. 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.

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

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 2008 sur 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 :

- 50 à 100 UFC/g
- 100 à 500 UFC/g
- 500 à 1 000 UFC/g
- 1 000 à 5 000 UFC/g
- 5 000 à 10 000 UFC/g

Les résultats obtenus sont les suivants :

- **Méthode AL Dénombrement - EPT avec revivification - Ensemencement en surface :**

Catégorie d'aliments	Couple matrice / souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Y = X
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	
Produits végétaux	Crudités / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	

[avec Y = log(N méthode alternative) et X = log(N méthode de référence)]

- Méthode AL Dénombrement - EPT avec revivification - Ensemencement en profondeur :

Catégorie d'aliments	Couple matrice / souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	$X = 1,031Y - 0,229$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,967X + 0,046$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,009X - 0,068$
Produits végétaux	Crudités / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,958X + 0,092$
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	$Y = 0,978X - 0,087$

[avec $Y = \log(N$ méthode alternative) et $X = \log(N$ méthode de référence)]

- Méthode AL Dénombrement - EPT sans revivification - Ensemencement en surface :

Catégorie d'aliments	Couple matrice / souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	$Y = 1,032X - 0,322$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 1,042X - 0,295$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,013X - 0,153$
Produits végétaux	Crudités / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,952X + 0,054$
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	$Y = 1,044X - 0,426$

[avec $Y = \log(N$ méthode alternative) et $X = \log(N$ méthode de référence)]

- Méthode AL Dénombrement - EPT sans revivification - Ensemencement en profondeur :

Catégorie d'aliments	Couple matrice / souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	$Y = 1,016X - 0,309$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,988X - 0,140$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,084X - 0,443$
Produits végétaux	Crudités / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,952X - 0,013$
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	$Y = 1,008X - 0,327$

[avec $Y = \log(N$ méthode alternative) et $X = \log(N$ méthode de référence)]

- Méthode AL Dénombrement - Fraser ½ avec revivification - Ensemencement en surface :

Catégorie d'aliments	Couple matrice / souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	$Y = 1,106X - 0,645$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,995X + 0,012$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,064X - 0,286$
Produits végétaux	Crudités / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,993X - 0,100$
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	$Y = 1,013X - 0,163$

[avec $Y = \log(N$ méthode alternative) et $X = \log(N$ méthode de référence)]

- Méthode AL Dénombrement - Fraser ½ avec revivification - Ensemencement en profondeur :

Catégorie d'aliments	Couple matrice / souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	$Y = 0,974X - 0,083$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,991X - 0,150$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,024X - 0,227$
Produits végétaux	Crudités / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,956X - 0,002$
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	$Y = 0,979X - 0,134$

[avec $Y = \log(N$ méthode alternative) et $X = \log(N$ méthode de référence)]

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2008. L'exploitation statistique a porté sur 52 résultats interprétables provenant de 37 échantillons naturellement contaminés et 15 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, produits végétaux, prélèvements d'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)
Produits carnés	1,78 – 6,90
Produits laitiers	1,48 – 5,59
Produits de la pêche	1,70 – 5,73
Produits végétaux	1,30 – 6,22
Prélèvements d'environnement	1,96 – 5,57

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

	Equation de la droite $Y = a X + b$
EPT avec revivification - Ensemencement en surface	$Y = X$
EPT avec revivification - Ensemencement en profondeur	$Y = 0,954 X + 0,165$
EPT sans revivification - Ensemencement en surface	$Y = 0,965 X + 0,142$
EPT sans revivification - Ensemencement en profondeur	$Y = 0,945 X + 0,184$
Fraser ½ avec revivification - Ensemencement en surface	$Y = 0,970 X + 0,039$
Fraser ½ avec revivification - Ensemencement en profondeur	$Y = 0,920 X + 0,202$

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

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

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.

Les limites de répétabilités (en log) obtenues pour la méthode alternative et pour la méthode de référence sont, toutes catégories confondues, par type d'ensemencement, de :

	Limite de répétabilité (log)	
	Méthode alternative	Méthode de référence
EPT avec revivification Ensemencement en surface	0,17 UFC/g	
EPT avec revivification Ensemencement en profondeur	0,14 UFC/g	0,17 UFC/g
EPT sans revivification Ensemencement en surface	0,23 UFC/g	0,17 UFC/g
EPT sans revivification Ensemencement en profondeur	0,16 UFC/g	0,17 UFC/g
Fraser ½ avec revivification Ensemencement en surface	0,28 UFC/g	0,17 UFC/g
Fraser ½ avec revivification Ensemencement en profondeur	0,23 UFC/g	0,17 UFC/g

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence), toutes catégories confondues, par type d'ensemencement, est le suivant :

	médiane p	moyenne D
EPT avec revivification - Ensemencement en surface	0	0
EPT avec revivification - Ensemencement en profondeur	- 0,026	- 0,010
EPT sans revivification - Ensemencement en surface	+ 0,010	+ 0,012
EPT sans revivification - Ensemencement en profondeur	- 0,012	- 0,019
Fraser ½ avec revivification - Ensemencement en surface	- 0,057	- 0,073
Fraser ½ avec revivification - Ensemencement en profondeur	- 0,087	- 0,096

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.

La corrélation entre la méthode de référence et la méthode alternative, en utilisant les mêmes diluants (eau peptonée tamponnée), avec ou sans revivification est tout à fait satisfaisante, quelque soit le type d'ensemencement. Les biais entre les deux méthodes sont de l'ordre de $\pm 0,01$ log UFC/g.

Pour la méthode alternative utilisant le bouillon Fraser ½ comme diluant, les hypothèses statistiques sont acceptées. Les limites de répétabilité sont supérieures à celles obtenues pour la méthode de référence et les biais sont de l'ordre de $- 0,1$ log UFC/g. Il faut néanmoins rappeler que les prises d'essais entre la méthode de référence et la méthode alternative sont différentes.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 60 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 60 testées.
- L'étude de 18 souches non *Listeria* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.
L'étude de 19 souches de *Listeria non monocytogenes* a révélé un aspect caractéristique des *Listeria ivanovii* après 24 heures d'incubation, avec des halos de petite taille.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 jours (si confirmation avec test PCR) à 9 jours (si confirmation selon les tests classiques) avec la méthode alternative, contre 4 à 9 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative comme avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 16 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* aux 4 niveaux suivants :

- 0 UFC/ml
- 100 UFC/ml
- 1 000 UFC/ml
- 10 000 UFC/ml

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
Niveau 1	11	0,513	0,727	0,320	0,489	0,064
Niveau 2	11	0,231	0,427	0,079	0,265	0,028
Niveau 3	11	0,232	0,302	0,122	0,235	0,026

* Trois laboratoires n'ont pas pu réaliser les analyses suite à des problèmes de livraison, un laboratoire n'a pas transmis les résultats et un laboratoire présentait des résultats incohérents.

Conclusion

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