



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 : UNI 03/05 - 09/06

Date de validation :	15.09.2006
Extension le :	29.03.2007
Reconduction le :	02.07.2010
Fin de validité :	15.09.2014

La Société OXOID Ltd  
Wade Road  
Basingstoke, Hampshire  
RG24 8 PW, England, UK

Distributeur OXOID Thermo Fisher Scientifics  
6 route de Paisy – BP 13  
69571 DARDILLY CEDEX  
France

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

**Listeria Precis™**  
(méthode de dénombrement)

Référence du protocole : OCLA-D3 07-2010

**DOMAINE D'APPLICATION**

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

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune.

**METHODE(S) DE REFERENCE**

NF EN ISO 11290-2 (1998) incluant l'amendement A1 (2004) : 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 *Listeria Preci*<sup>TM</sup> comprend une revivification en bouillon non sélectif, suivie d'un isolement sur un milieu chromogène dénommé *Brilliance*<sup>TM</sup> *Listeria*, utilisé pour la différenciation et l'isolement de *Listeria monocytogenes*.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATON, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode *Listeria Preci*<sup>TM</sup> doivent être confirmés selon l'un des deux cas suivants:

- à partir des colonies isolées sur milieu chromogénique, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- à partir des colonies caractéristiques, isolées sur gélose *Brilliance*<sup>TM</sup> *Listeria*, selon le test OBIS MONO

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

### Note 1 : Historique de validation

L'étude d'extension menée en mars 2007 avait pour objet d'ajouter une option de confirmation supplémentaire : la méthode OBIS MONO.

Des essais ont été réalisés à partir de cultures de souches en bouillon nutritif et isolées en parallèle sur gélose *Brilliance*<sup>TM</sup> *Listeria* et sur gélose TSA-YE :

- 150 souches de *Listeria monocytogenes* de sérotypes et d'origines variées ont été testées
- 100 souches non cibles (autres que *monocytogenes*) ont été testées.

Les résultats obtenus étaient conformes à ceux attendus.

Dans le cadre de l'étude de reconduction de juillet 2010, les résultats de l'étude interlaboratoire obtenus en 2006 ont été réinterprétés selon les modalités décrites dans le projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 (prA1 2009). Les nouveaux résultats sont disponibles dans la présente attestation. La méthode alternative n'a pas été modifiée depuis la dernière validation, et la méthode de référence reste inchangée.

### Note 2 : modification de la référence commerciale (février 2008)

La méthode alternative anciennement dénommée **OCLA** a été renommée *Listeria Preci*<sup>TM</sup>. Le milieu chromogène **OCLA** a changé de dénomination pour devenir *Brilliance*<sup>TM</sup> *Listeria*.

## 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 2006 sur les 6 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 UFC par gramme
- 50 à 100 UFC par gramme
- 100 à 500 UFC par gramme
- 500 à 1 000 UFC par gramme
- 1 000 à 10 000 UFC par gramme

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 4e	$Y = 0,989 X + 0,114$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,019 X - 0,074$
Produits végétaux	Laitue / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,008 X - 0,026$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	$Y = 1,042 X - 0,145$
Ovoproduits	Ovoproduit cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 0,978 X - 0,016$
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 0,968 X + 0,132$

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

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

### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2006. L'exploitation statistique a porté sur 65 résultats interprétables provenant de 12 échantillons naturellement contaminés et 53 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, ovoproduits, produits laitiers, produits de la pêche, produits végétaux et échantillons 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	1,0 – 4,0
Produits laitiers	1,5 – 4,1
Produits de la pêche	1,0 – 3,8
Produits végétaux	1,7 – 5,1
Ovoproduits	1,3 – 5,0
Prélèvements d'environnement	1,7 – 5,1

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,040 X - 0,182$$

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

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

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 **0,311**

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de **0,264**

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :

$$p = -0,03 \text{ si l'on prend la médiane}$$

### 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)

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Résultats de l'étude réalisée en 2004 lors de la validation de la méthode *Listeria Preci*<sup>TM</sup> pour la recherche des *Listeria monocytogenes* :

- 48 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées, après 24 h d'incubation du bouillon d'enrichissement. Les deux souches n'ayant pas donné de réaction positive sont des souches de collection de sérotype 3a et 4e.
- L'étude de 30 souches non *Listeria 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 4 à 7 jours avec la méthode alternative comme 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.
  - Dans le cas de résultats présumés **positifs** par la méthode alternative, mais rendus **négatifs après confirmation**, les résultats négatifs sont obtenus en 4 à 7 jours.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons d'un mélange de 50% de lait entier pasteurisé et 50% de lait pasteurisé ½ écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* sérotype 1/2a aux 4 niveaux suivants :

- Niveau 0 : < 10 bactéries par ml
- Niveau 1 : 50 bactéries par ml
- Niveau 2 : 500 bactéries par ml
- Niveau 3 : 5 000 bactéries par ml

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

Les résultats obtenus, calculés conformément au projet d'amendement 1 de la norme EN ISO 16140 :2003 (version prA1 :2009), sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires avec résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		Biais (t)
		Ecart type de Répétabilité $S_r$	Ecart type de Reproductibilité $S_R$	Ecart type de Répétabilité $S_r$	Ecart type de Reproductibilité $S_R$	
Niveau 1	10	0,2415	0,2415	0,2045	0,2433	1,14
Niveau 2 (a)	10	0,0543	0,0659	0,0914	0,1325	0,82
Niveau 2 (b)	10	0,2607	0,2607	0,1900	0,1953	0,35
Niveau 3	10	0,0378	0,0378	0,0478	0,0758	0,22

\* Les résultats de trois laboratoires n'ont pas été exploités (un laboratoire n'a pas pu réaliser les essais car il a reçu des flacons d'échantillon cassés et deux laboratoires n'ont pas respecté le protocole)

(a) : calculs réalisés pour le niveau 2 en prenant en compte les résultats obtenus sur les trois boîtes inoculées avec la suspension mère

(b) : calculs réalisés pour le niveau 2 en prenant en compte les résultats obtenus sur la ou les boîtes inoculées avec 0,1 ml de la suspension mère

Note : Limite de répétabilité  $r = 2,8 S_r$ , avec  $S_r$  : écart-type de répétabilité  
Limite de reproductibilité  $R = 2,8 S_R$ , avec  $S_R$  : écart-type de reproductibilité

### **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](http://www.afnor-validation.org)