



**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 : BKR 23/02 – 11/02

Date de validation :	28.11.2002
Dates de reconduction:	25.05.2007*
	24.09.2010
Extension le :	27.09.2007
Fin de validité :	28.11.2014

* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 lors de la 1^{ère} reconduction

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

SOLABIA S.A.S.
Division BOKAR DIAGNOSTICS
29 rue Delizy
93698 PANTIN cedex

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

COMPASS[®] Listeria Agar
Pour la détection des *Listeria monocytogenes*

Références du protocole :

COMPASS[®] Listeria Agar : BM123/F/2007-05 : 7
CONFIRM' L. mono Agar[®]: BM139/F/2008-03 : 3

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement de production

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-1 (février 1997) incluant l'amendement A1 (février 2005) – Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : Méthode de recherche

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

PRINCIPE DE LA METHODE

COMPASS® *Listeria* Agar est un milieu de culture gélosé dont la formulation correspond à celles préconisées dans l'amendement A1 de la norme EN ISO 11290 (parties 1 et 2). Il permet la détection des *Listeria monocytogenes*, en une seule étape préalable d'enrichissement sélectif, après 24 heures d'incubation des boîtes à 37°C (il est possible de prolonger l'incubation jusqu'à 48 heures). Les colonies de *Listeria monocytogenes* apparaissent en bleu à bleu-vert, entourées d'un halo opaque. La confirmation est ensuite effectuée à partir des colonies caractéristiques isolées sur COMPASS® *Listeria* Agar.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode COMPASS® *Listeria* Agar doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- A partir des colonies isolées sur COMPASS® *Listeria* Agar, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification)
- En utilisant CONFIRM' *L.mono* Agar®, selon les instructions décrites dans la notice correspondante
- En mettant en œuvre une autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode COMPASS® *Listeria* Agar. Le protocole validé de la méthode utilisée 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 l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

Note 1 (Historique de validation)

La méthode COMPASS® *Listeria* Agar, destinée à la recherche des *Listeria monocytogenes* en 24 heures, a fait l'objet des études de reconduction et d'extension de 2007. Elle remplace les deux méthodes précédemment certifiées AFNOR Validation avec la référence commerciale COMPASS® *L. mono* Agar, et identifiées sous deux références d'attestation : BKR 23/1 – 09/02 (recherche en 48h) et BKR 23/2 – 11/02 (recherche en 24h).

Pour la reconduction de mai 2007, le protocole de validation basé sur la norme EN ISO 16140 a été pris en compte. De plus, la formulation de COMPASS® *Listeria* Agar a changé par rapport à celle de COMPASS® *L. mono* Agar. Il s'ensuit que l'étude de validation (préliminaire et interlaboratoire) a été totalement refaite.

L'étude d'extension de COMPASS® *Listeria* Agar présentée en septembre 2007 a permis de valider une nouvelle option de confirmation : CONFIRM' *L.mono* Agar. Des essais ont été réalisés sur des souches pures susceptibles de présenter des colonies caractéristiques sur COMPASS® *Listeria* Agar.

- 153 souches de *Listeria monocytogenes* de sérotypes et d'origines variées ont été testées
- 106 souches non cibles (48 *Listeria* autres que *monocytogenes* et 58 souches non *Listeria*) ont été testées.

Les résultats obtenus étaient satisfaisants. Ils ne sont pas disponibles dans la présente attestation.

Lors de l'étude de reconduction de septembre 2010, aucun essai complémentaire de validation n'a été réalisé puisque la méthode COMPASS® *Listeria* Agar n'a pas été modifiée depuis la dernière validation, et que le protocole de validation ainsi que la méthode de référence n'ont pas changé.

NOTE 2 (format déshydraté de milieu de base)

L'attestation fut rééditée en juin 2009 pour prendre en compte les modifications de la notice technique de COMPASS® *Listeria* Agar. Les modifications portaient sur l'ajout d'un milieu de base au format déshydraté accompagné de deux suppléments. La formule du milieu complet n'avait pas changé. Les modifications n'avaient pas donné lieu à des essais complémentaires.

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 334 échantillons dont 74 naturellement contaminés, 89 artificiellement contaminés et 171 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits laitiers, produits carnés, produits végétaux et divers, produits de la pêche, 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) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 151 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 174 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 3 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

NOTE : Lors de l'étude de validation, pour deux échantillons de produits laitiers, les halos sont apparus à 48 heures d'incubation.

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

- Exactitude relative : **AC = 97,3%**
- Spécificité relative : **SP = 98,9%**
- Sensibilité relative : **SE = 95,6%**

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 95,6\%$$

Méthode de référence :

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

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

$$PD = 2, ND = 7 \text{ donc } Y = PD + ND = 9 ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 2, M = 1 \text{ donc } m > M$$

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

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 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux et divers, produits de la pêche, 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 ₆₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	0,4 [0,1 – 1,3]	0,4 [0,1 – 1,3]
Lait cru	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	0,6 [0,4 – 0,9]	0,6 [0,4 – 1,0]
Saumon fumé	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	0,4 [0,2 – 1,1]	0,4 [0,2 – 1,1]
Haricots verts	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	0,1 [0,1 – 0,4]	0,1 [0,1 – 0,4]
Eau de process	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,7 [0,5 – 0,9]	0,7 [0,5 – 0,9]

(3) LOD₆₀ : 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

Le niveau de détection se situe entre 0,1 et 1,3 UFC/25 g pour la méthode alternative et la méthode de référence.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- Parmi les 30 souches non *Listeria monocytogenes*, les 8 souches de *Listeria ivanovii* testées donnent des colonies bleues avec auréole d'opacification après 24 heures d'incubation. Les auréoles obtenues sont plus petites que celles obtenues avec *L. monocytogenes*.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 4 jours selon les tests de confirmation réalisés avec la méthode alternative, contre 4 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 4 à 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 3 à 4 jours, selon les tests réalisés.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* sérotype 4b aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25ml
- 1 à 10 UFC/25 ml
- 5 à 50 UFC/25 ml

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	96	96	96	96	96	0	0
1	96	96	96	3	3	93	93
2	96	96	96	0	0	96	96

Calculs

- L'exactitude relative est de **100%**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **98,4%**

Interprétation

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

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** et la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord %	Concordance %	COR
L0	100	100	1,00
L1	95	93,9	1,23
L2	100	100	1,00

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