



**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**

<b>Date de validation :</b>	<b>28.11.2002</b>
<b>Date de reconduction*:</b>	<b>25.05.2007</b>
<b>Extension le :</b>	<b>27.09.2007</b>
<b>Fin de validité :</b>	<b>28.11.2010</b>

*\* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 lors de la reconduction de validation*

**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 :

Références du protocole :

COMPASS® *Listeria* Agar : BM123/F/2007-05 : 5  
CONFIRM'L.mono Agar: BM139/F/2008-03 : 2

**COMPASS® *Listeria* Agar**

**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 incluant l'amendement A1 (2004) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : Méthode de recherche - (février 1997).

**Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN**

**AFNOR Certification**

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France  
Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France  
Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40  
[certification@afaq.afnor.org](mailto:certification@afaq.afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## 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 est utilisé pour la différenciation, l'isolement et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* par la mise en évidence de la  $\beta$ -glucosidase et de la PI-PLC. Les colonies de *Listeria monocytogenes* apparaissent en bleu à bleu-vert, entourées d'un halo opaque, après incubation à 37°C pendant 24 heures (Il est possible de prolonger l'incubation jusqu'à 48).

Pour les colonies typiques bleues avec halo, la confirmation doit être réalisée à partir de colonies isolées sur COMPASS® *Listeria* Agar.

Dans le cadre de la méthode alternative COMPASS® *Listeria* Agar, le protocole est raccourci à une seule étape d'enrichissement sélectif.

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 :

1. à partir des colonies isolées sur COMPASS® *Listeria* Agar, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification)
2. en utilisant CONFIRM'L.mono Agar, selon les instructions décrites dans la notice correspondante
3. en mettant en œuvre une autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique de la méthode

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 oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

## NOTE

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

La formulation de COMPASS® *Listeria* Agar a changé par rapport à celle de COMPASS® *L. mono* Agar présent dans la première méthode validée en 2002. Egalement, le protocole de validation basé sur la norme EN ISO 16140 a été pris en compte pour cette reconduction. Il s'ensuit que la totalité des études (préliminaire et interlaboratoire) ont été refaites.

L'étude d'extension présentée en septembre 2007 avait pour objet d'ajouter une option de confirmation supplémentaire (Cf. 2<sup>ème</sup> de confirmation présentée dans le principe avec CONFIRM'L.mono Agar). Des essais ont été réalisés en souches pures et 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.

## 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 de produits 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 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 2 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 174 <sup>(3)</sup>

(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%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 95,6%**

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 <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 V2/124	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 1011/1410	0,1 [ 0,1 – 0,4 ]	0,1 [ 0,1 – 0,4 ]
Eau de process	<i>Listeria monocytogenes</i> 877/113	0,7 [ 0,5 – 0,9 ]	0,7 [ 0,5 – 0,9 ]

(3) LOD<sub>50</sub> : 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 10<sup>th</sup> 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 4 à 8 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 4 à 8 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* 4b aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (1 à 10 UFC/25 ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (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	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](http://www.afnor-validation.org)