



**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 23/05 – 12/07

Date de validation : 04.12.2007  
Fin de validité : 04.12.2011

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

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

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

**COMPASS® *Listeria* Agar**  
**Pour le dénombrement 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**

Produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement de production

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune

**METHODE DE REFERENCE**

**NF EN ISO 11290-2** (août 1998) et son **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](mailto:certification@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 NF 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. La méthode COMPASS® *Listeria* Agar utilisée pour la recherche de *L. monocytogenes* a été validée avec le numéro d'attestation BKR 23/02 – 11/02.

Le dénombrement des *Listeria monocytogenes*, qui fait l'objet de la présente attestation, se fait par inclusion ou étalement, suivi d'une incubation 24 à 48 heures à 37°C. Les colonies de *Listeria monocytogenes* apparaissent en bleu à bleu-vert, entourées d'un halo opaque.

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 ou l'ISO (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 de principe différent, en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique de la méthode

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

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.

Si la confirmation a été réalisée lors de l'étape de recherche avec COMPASS® *Listeria* Agar, alors l'utilisateur peut s'affranchir de la confirmation lors du dénombrement.

### NOTE 1

La méthode alternative COMPASS® *Listeria* Agar ayant déjà été validée selon les exigences de la norme NF EN ISO 16140 pour l'application en recherche de *Listeria monocytogenes*, les résultats de l'étude de spécificité de cette étude ont été repris.

### NOTE 2

La présente attestation a été rééditée en juin 2009 pour prendre en compte les modifications de la notice technique de COMPASS® *Listeria* Agar. Les modifications portent sur l'ajout d'un milieu de base au format déshydraté accompagné de deux suppléments. La formule du milieu complet reste inchangée. Les modifications n'ont pas donné lieu à des essais complémentaires.

## 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 2007 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 : 100, 500, 1000, 5000 UFC/ gramme.

Les deux protocoles, par inclusion et par étalement, ont été testés pour la méthode COMPASS® *Listeria* Agar.

Les résultats obtenus sont les suivants, avec la méthode par étalement :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>L. monocytogenes</i>	$Y = 0,975 X + 0,101$
Produits laitiers	Lait cru / <i>L. monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,996 X - 0,023$
Végétaux et ovoproduits	Chou / <i>L. monocytogenes</i> 1/2	$Y = 1,009 X - 0,062$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>L. monocytogenes</i>	$Y = 0,986 X + 0,073$
Echantillons d'environnement	Eau de process / <i>L. monocytogenes</i>	$Y = 0,975 X + 0,093$

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

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

Les résultats obtenus sont les suivants, avec la méthode par inclusion :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>L. monocytogenes</i>	$Y = 0,996 X - 0,039$
Produits laitiers	Lait cru / <i>L. monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,929 X + 0,207$
Végétaux et ovoproduits	Chou / <i>L. monocytogenes</i> 1/2	$Y = 1,061 X - 0,090$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>L. monocytogenes</i>	$Y = 0,975 X - 0,014$
Echantillons d'environnement	Eau de process / <i>L. monocytogenes</i>	$Y = 1,047 X - 0,276$

### Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2007. L'exploitation statistique a porté sur 73 résultats interprétables (dont 63 provenant d'échantillons artificiellement contaminés) pour la méthode par étalement, et 69 résultats interprétables (dont 58 provenant d'échantillons artificiellement contaminés) pour la méthode avec inclusion.

Ces échantillons appartenaient aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, végétaux et ovoproduits, produits de la pêche, 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)	
	Méthode par étalement	Méthode par inclusion
Produits carnés	0,70 à 6,82	1,78 à 6,76
Produits laitiers	1,00 à 4,61	1,00 à 4,61
Produits de la pêche	1,00 à 5,26	1,00 à 5,20
Végétaux et ovoproduits	1,00 à 4,96	1,00 à 4,93
Echantillons d'environnement	1,30 à 3,71	1,00 à 3,66

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, a été établie pour les deux méthodes (étalement et inclusion).

Méthode par étalement :	Méthode par inclusion:
$Y = 0,991 X + 0,035$	$Y = 1,013 X - 0,135$

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

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

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 :

	<i>Biais D</i> (moyenne des biais individuels)	Limite de répétabilité (en log) méthode alternative	Limite de répétabilité (en log) méthode de référence
Méthode par étalement	0,000	0,264	0,176
Méthode par inclusion	-0,070	0,176	0,176

#### 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.

Le biais entre les deux méthodes est faible.

La répétabilité de la méthode alternative par étalement est légèrement supérieure à celle de la méthode de référence, et équivalente avec le protocole par inclusion.

## SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

### Mise en œuvre 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 œuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :
  - L'obtention des résultats **positifs** avec la méthode alternative se fait en 2 à 3 jours (si confirmation par CONFIRM' *L. mono* Agar<sup>®</sup>) ou 4 à 7 jours (si confirmation avec les tests classiques) contre 4 à 7 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.
- Temps de manipulation :

La méthode COMPASS<sup>®</sup> *Listeria* Agar requiert l'utilisation d'une seule boîte de dénombrement. Elle est particulièrement aisée à mettre en œuvre et offre un gain de temps important lors de l'étape de confirmation.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 11 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* aux 4 niveaux suivants :

- 0
- 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	(1)	Méthode de référence		Méthode alternative					
		r	R	r		R		Biais	
				Etalement	inclusion	Etalement	inclusion	Etalement	inclusion
Niveau 1	10	0,542	0,522	0,601	0,273	0,607	0,277	0,010	-0,192
Niveau 2	10	0,141	0,427	0,094	0,143	0,363	0,227	-0,018	-0,023
Niveau 3	10	0,106+	0,247	0,249	0,102	0,338	0,187	-0,016	0,002

r = Répétabilité ; R = Reproductibilité

(1) Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables : *les résultats d'un laboratoire n'ont pas été exploités car ils présentaient des incohérences au niveau des dilutions successives.*

### 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)