

SOLABIA SAS

29 rue Delizy

93500 PANTIN

Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse
Application à la microbiologie alimentaire

Rapport de synthèse

Validation ISO 16140 de la méthode
COMPASS[®] *Listeria* Agar pour le
dénombrement de *Listeria monocytogenes*
(Etudes préliminaire et collaborative
conduites selon la norme NF EN ISO 16140)

Méthodes quantitatives

Confidentiel

Ce rapport comprend 50 pages dont 2 annexes.

La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

EP COMPASS[®] *Listeria* Agar dénombrement

Version 1 - 28 décembre 2007

ADRIA DEVELOPPEMENT

Creac'h Gwen - F. 29196 QUIMPER Cedex - Tél. (33) 02.98.10.18.18 - Fax (33) 02.98.10.18.08

E-mail : adria.developpement@adria.tm.fr - Site web : <http://www.adria.tm.fr> - Site réservé adhérents : <http://www.clubiaa.net>
ASSOCIATION LOI DE 1901 - N° SIRET 306 964 271 00036 - N° EXISTENCE 532900006329 - N°TVA FR4530696427100036

Sommaire

1	INTRODUCTION _____	2
	1.1 Référentiel de validation _____	2
	1.2 Protocole et principe de la méthode alternative _____	2
	1.3 Domaine d'application demandé _____	2
	1.4 Méthode de référence _____	2
2	ETUDE COMPARATIVE DES METHODES _____	3
	2.1 Linéarité _____	3
	2.2 Exactitude relative _____	9
	2.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) _____	19
	2.4 Sensibilité relative _____	21
	2.5 Spécificité/Sélectivité _____	23
3	ETUDE INTERLABORATOIRES _____	23
	3.1 Organisation de l'étude _____	23
	3.2 Contrôles des paramètres expérimentaux _____	24
	3.3 Résultats des analyses _____	25
	3.4 Calculs et interprétation statistique _____	26
4	PRATICABILITE _____	32
5	CONCLUSION _____	36
<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 1 - Méthode alternative</i> _____	<i>37</i>
<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 2 - Méthode de référence NF EN ISO 11290-2/A1 (février 2005): méthode de dénombrement de Listeria monocytogenes</i> _____	<i>48</i>

Avant Propos

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par le symbole♦.

L'ensemble des renseignements permettant de valider la garantie des analyses est tenu à la disposition de la Société SOLABIA.

Les résultats sont synthétisés au sein de tableaux et interprétés selon la norme NF EN ISO 16140.

-
- ✓ **Fabricant :** BOKAR DIAGNOSTICS
Rue des Quarante Mines
BP 10245
60002 BEAUVAIS Cedex

 - ✓ **Laboratoire expert :** ADRIA Développement
ZA Creac'h Gwen
29196 QUIMPER Cedex

 - ✓ **Méthode à valider :** COMPASS® *Listeria* Agar pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes*

 - ✓ **Référentiel de validation :** Norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives

 - ✓ **Méthode de référence♦ :** Norme NF EN ISO 11290-2/A1 (février 2005): Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 2 : méthode de dénombrement

 - ✓ **Etendue de la validation :** Tous produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement

♦ NF EN ISO 11290-2/A1 : essais effectués sous le couvert de l'accréditation par le laboratoire expert

1 INTRODUCTION

1.1 Référentiel de validation

Le référentiel de validation utilisé est la norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

Le protocole et les notices techniques sont donnés en Annexe 1.

COMPASS® *Listeria* Agar est un milieu chromogène permettant un isolement et un dénombrement différentiel de *Listeria monocytogenes*. La méthode est la suivante :

- préparation d'une suspension-mère (1/10) en eau peptonée tamponnée,
- dénombrement **par inclusion** (1 ml/boîte) ou **par étalement** (0,1 ml en surface/boîte), une seule boîte par dilution nécessaire
- incubation 24 à 48 h \pm 3 h à 37°C,
- dénombrement des colonies caractéristiques (bleues entourées d'un halo d'opacification),
- confirmation sur une colonie par les **tests classiques** (décrits dans la méthode de référence) ou par **CONFIRM' L. mono Agar** (cas 2 de confirmation).

Le choix du test de confirmation à réaliser au cours de l'étude inter-laboratoire a été soumis à l'avis du bureau technique, le cas 2 de confirmation a été retenu. Le protocole est donné en annexe 2.

1.3 Domaine d'application demandé

Tous produits d'alimentation humaine
Echantillons de l'environnement

1.4 Méthode de référence

La méthode de référence utilisée est la Norme NF EN ISO 11290-2/A1 (février 2005): Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 2 : méthode de dénombrement.

Le protocole est schématisé en Annexe 2.

2 ETUDE COMPARATIVE DES METHODES

2.1 Linéarité

La linéarité est définie comme l'aptitude de la méthode, pour une matrice donnée, à fournir des résultats proportionnels à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon, c'est-à-dire qu'à une augmentation de l'analyte correspond une augmentation linéaire ou proportionnelle des résultats.

2.1.1 Matrices utilisées et protocoles de contamination

Cinq catégories de produits ont été analysées (une matrice par catégorie), cinq niveaux de contamination ont été testés et deux répétitions ont été réalisées par échantillon. Au total, 50 analyses ont été effectuées à la fois par la méthode de référence et la méthode alternative. Les couples matrice / souche et les taux testés sont donnés dans le tableau suivant :

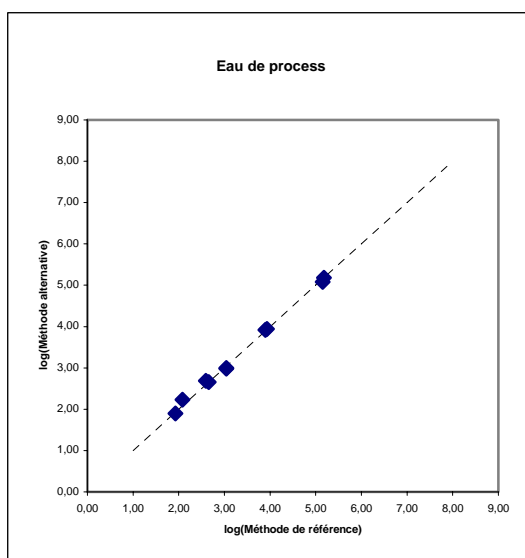
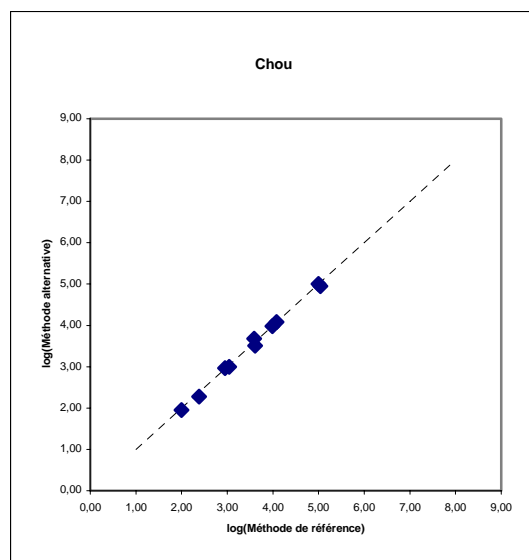
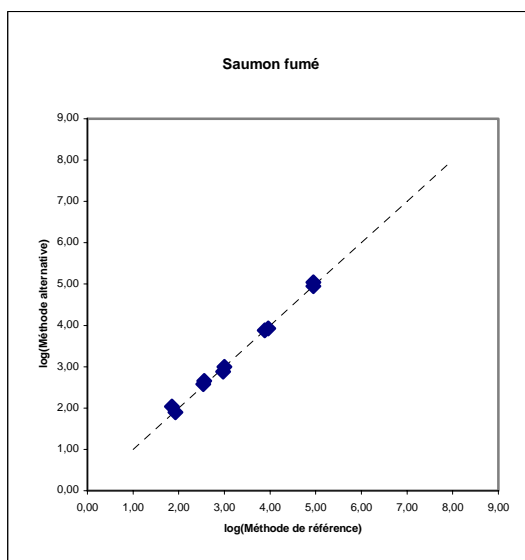
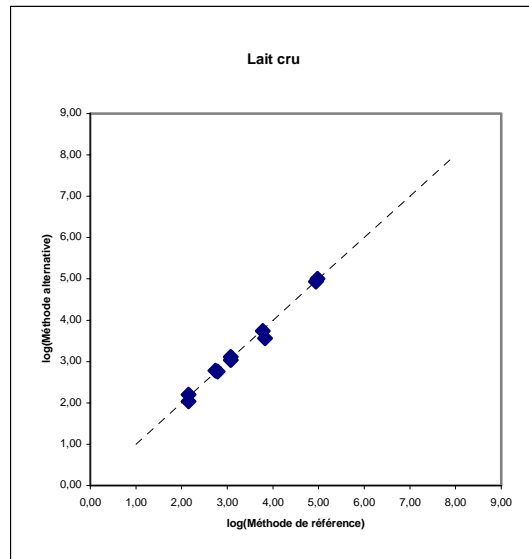
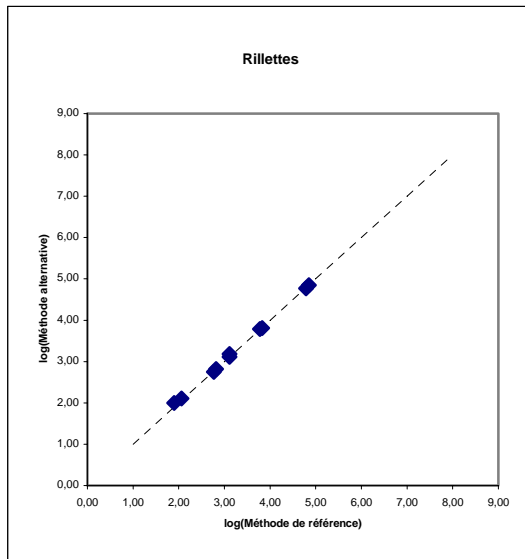
Matrice testée	Souche	Taux d'inoculation
Rillettes	<i>Listeria monocytogenes</i> Ad 269 isolée de lardons fumés	
Lait cru	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b 153 isolée de fromage	
Saumon fumé	<i>Listeria monocytogenes</i> 850/109 isolée d'assiette nordique	100
		500
Chou	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 1011/1410 isolée de brocolis surgelés	1 000
		5 000
Eau de process	<i>Listeria monocytogenes</i> BR32 isolée d'environnement de pisciculture	

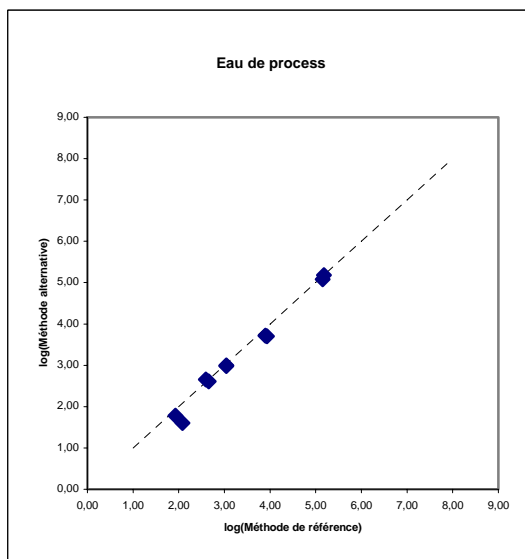
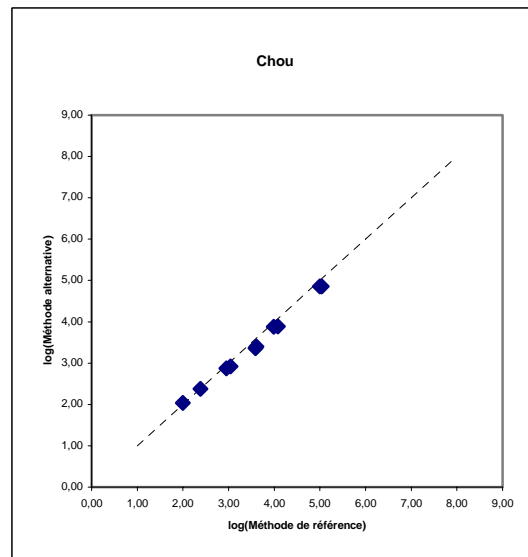
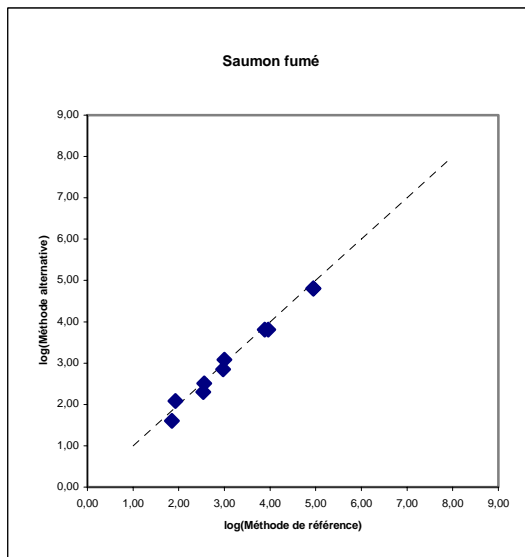
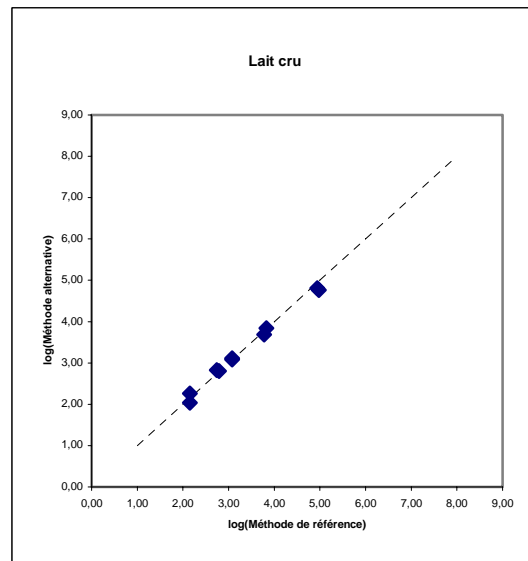
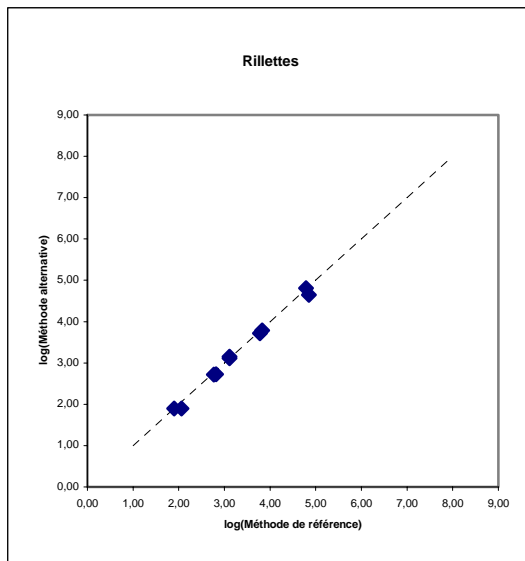
2.1.2 Résultats bruts

Les échantillons ont été testés en double par chacune des deux méthodes.

Les graphiques bidimensionnels pour chaque matrice sont présentés figure 1.

Figure 1 - Linéarité : graphique bidimensionnel

- Méthode par étalement

- Méthode par inclusion

2.1.3 Interprétation statistique

Les résultats des interprétations statistiques sont donnés dans les tableaux pour :

- la méthode par étalement :

Matrice	R	Régression utilisée	Rob.F	Valeur critique	P%	Coefficient de corrélation	Droite de régression
Rillettes	1,40	GMFR	0,000	5,41	100	0,999	log alt =0,975 log Réf. + 0,101
Lait cru	1,75	GMFR	4,399	5,41	7	0,998	log alt =0,996 log Réf. - 0,023
Chou	1,11	GMFR	0,000	5,41	100	1,000	log alt =1,009 log Réf. - 0,062
Saumon fumé	3,00	OLS 1	1,860	5,41	25	0,998	log alt =0,986 log Réf. + 0,073
Eau de process	1,00	GMFR	8,540	5,41	2	0,999	log alt =0,975 log Réf. + 0,093

- la méthode par inclusion :

Matrice	R	Régression utilisée	Rob.F	Valeur critique	P%	Coefficient de corrélation	Droite de régression
Rillettes	0,80	GMFR	6,011	5,41	4	0,999	log alt = 0,996 log Réf. - 0,039
Lait cru	1,25	GMFR	2,626	5,41	16	0,999	log alt = 0,929 Log Réf. + 0,207
Chou	0,44	OLS 2	7,014	5,41	3	0,994	log alt = 1,061 log Réf. - 0,090
Saumon fumé	7,00	OLS 1	0,844	5,41	53	0,992	log alt = 0,975 log Réf. - 0,014
Eau de process	1,67	GMFR	39,658	5,41	0	0,995	log alt = 1,047 log Réf. - 0,276

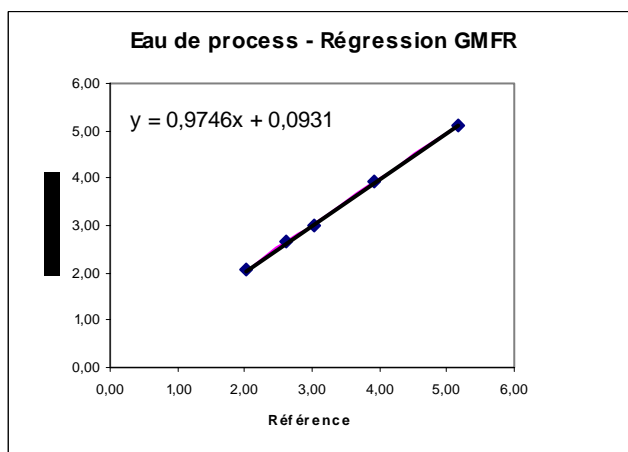
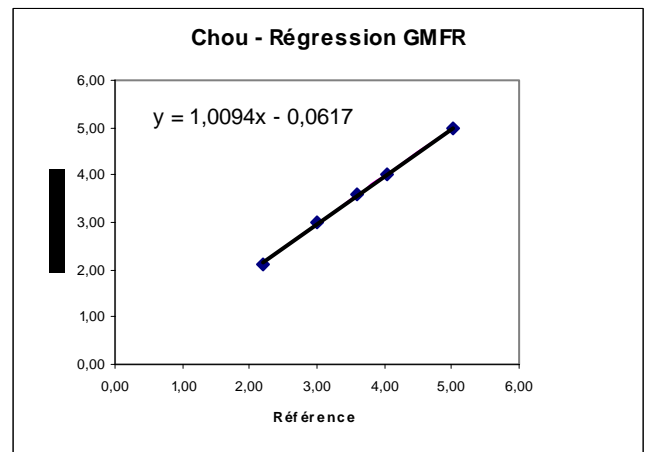
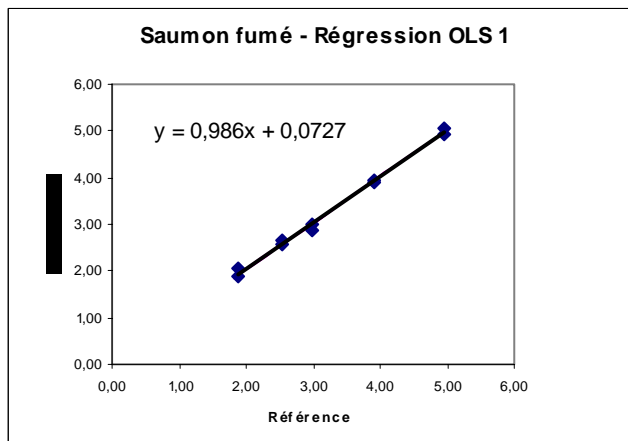
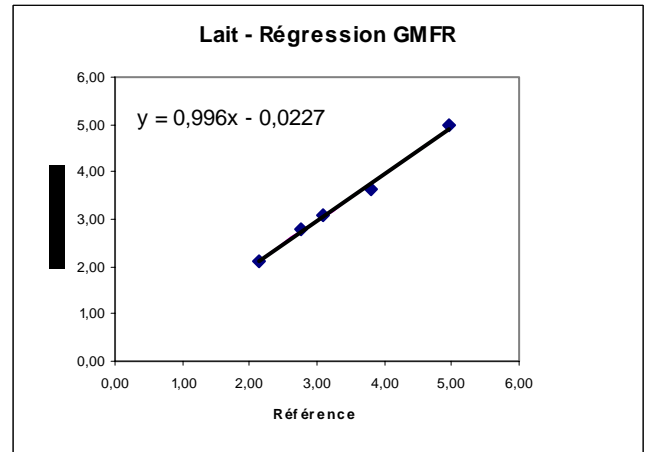
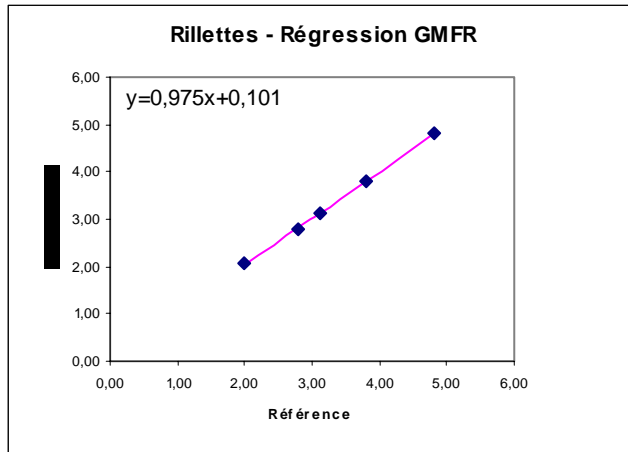
Interprétation statistique :

P > 5 % : pas significatif 1 % < P < 5 % : significatif
 0,1 % < P < 1 % : très significatif P < 0,1 % : hyper significatif

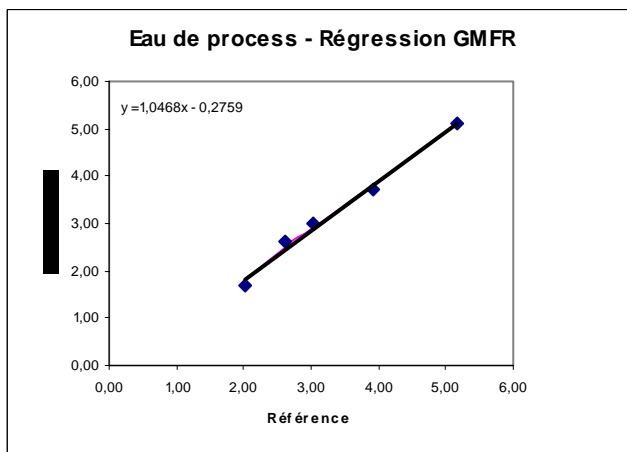
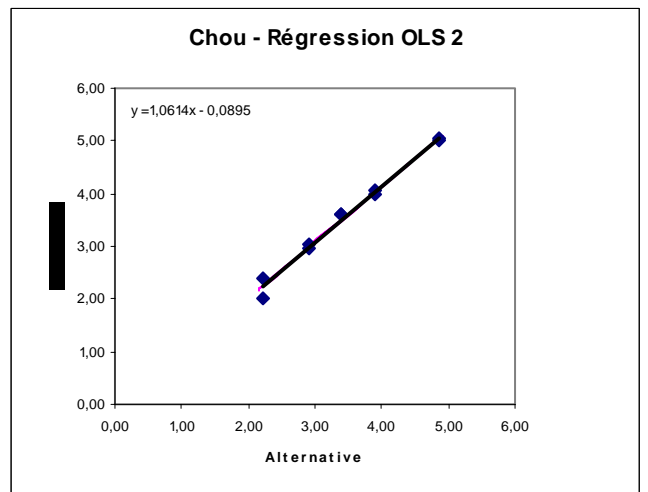
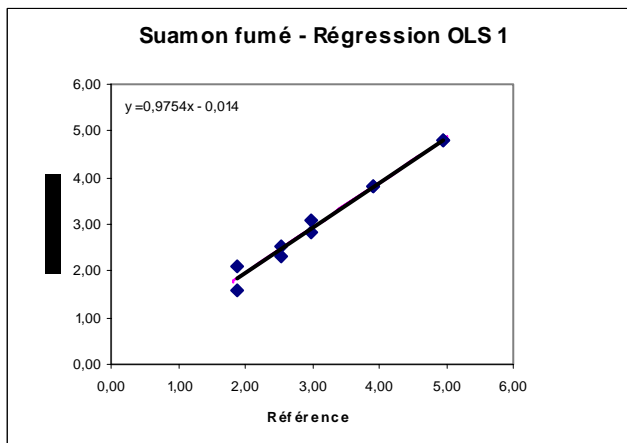
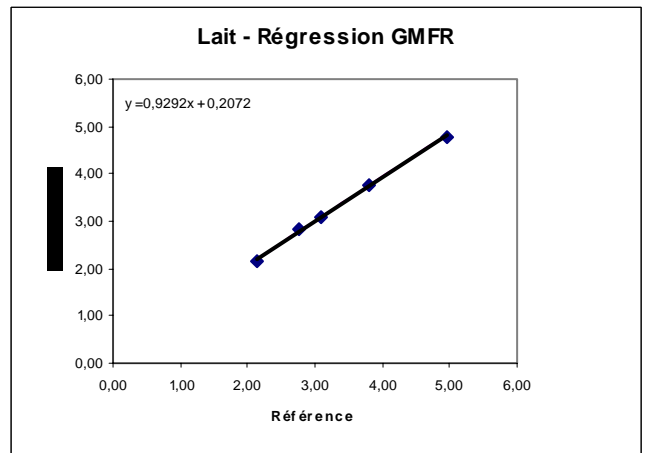
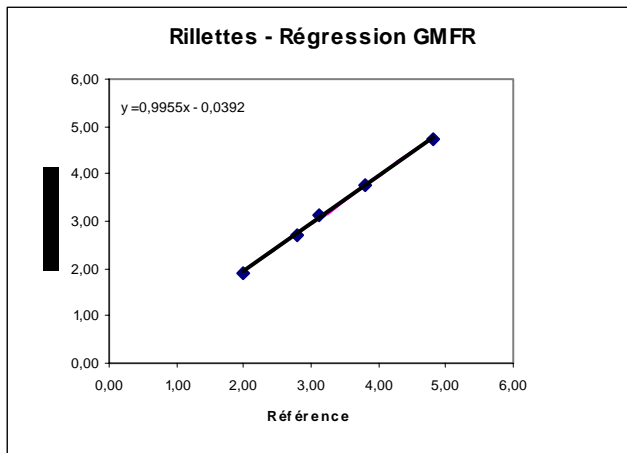
Les droites de régression sont données figure 2.

Figure 2 - Linéarité : Droites de régression

- Méthode par étalement



- Méthode par inclusion



2.1.4 Conclusion

Les coefficients de régression sont tous supérieurs à 0,99, valeurs particulièrement satisfaisantes pouvant mettre en défaut la robustesse des tests statistiques de linéarité.

La méthode COMPASS[®] *Listeria* Agar, par inclusion et étalement, est linéaire.

2.2 Exactitude relative

L'exactitude est l'écart de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

2.2.1 Nombre et nature des échantillons

Un total de 90 échantillons a été analysé pour obtenir 73 résultats exploitables par la méthode de dénombrement par étalement et 69 résultats exploitables par la méthode par inclusion. Ces analyses ont été analysées après avoir réalisé un screening sur de nombreux échantillons susceptibles d'être contaminés.

Tableau 1 - Nombre et nature des échantillons

Catégories	Types	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités	
			Par étalement	Par inclusion
Produits carnés	Viandes crues, charcuterie, plats traiteurs	14	12	11
Produits laitiers	Laits crus, fromages au lait cru, crèmes, glaces	24	16	15
Produits de la mer	Poissons crus, fumés, plats traiteurs	21	17	16
Végétaux, ovoproduits	Végétaux crus, salades, ovoproduits, légumes cuisinés	16	14	13
Echantillons de l'environnement	Eaux de siphon, prélèvements de surface, poussières	15	14	14
Total		90	73	69

2.2.2 Contamination artificielle des échantillons

Tableau 2

Méthode par étalement					
N° éch	Produit	Contaminations artificielles			
		Souche	Origine	Type de stress	Evaluation du stress
2259	Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 909	Lait	-20°C	0,57
2260	Fromage à pâte molle	<i>L. monocytogenes</i> 909	Lait	-20°C	0,57
2261	Fromage au lait cru de chèvre, cendré	<i>L. monocytogenes</i> 909	Lait	-20°C	0,57
2262	Filets de poulet	<i>L. monocytogenes</i> A00C041	Chair à saucisse	-20°C	>2,8
2263	Saucisson à l'ail	<i>L. monocytogenes</i> A00C041	Chair à saucisse	-20°C	>2,8
2264	Escalopes de dinde	<i>L. monocytogenes</i> A00C041	Chair à saucisse	-20°C	>2,8
2265	Eau de siphon	<i>L. monocytogenes</i> Ad550	Environnement - Egout	-20°C	0,64
2266	Chiffonnette table de préparation	<i>L. monocytogenes</i> Ad550	Environnement - Egout	-20°C	0,64
2267	Chiffonnette chariot	<i>L. monocytogenes</i> Ad550	Environnement - Egout	-20°C	0,64
2341	Truite de mer fumée	<i>L. monocytogenes</i> A00M023	Saumon fumé	4°C-TT 55°C 15min	0,8
2342	Saumon fumé d'Atlantique	<i>L. monocytogenes</i> A00M023	Saumon fumé	4°C-TT 55°C 15min	0,8
2343	Pâte molle au lait cru	<i>L. monocytogenes</i> Ad523	Fromage à raclette	4°C-TT 55°C 15min	0,5
2344	Comté au lait cru	<i>L. monocytogenes</i> Ad523	Fromage à raclette	4°C-TT 55°C 15min	0,5
2345	Salade Strasbourgeoise	<i>L. monocytogenes</i> 180	Salade fraîcheur	4°C-TT 55°C 15min	2,05
2346	Salade poireaux poulet	<i>L. monocytogenes</i> 180	Salade fraîcheur	4°C-TT 55°C 15min	2,05
2347	Poêlée champêtre	<i>L. monocytogenes</i> Ad544	Oignons préfrits	4°C-TT 55°C 15min	1,2
2348	Julienne de légumes	<i>L. monocytogenes</i> Ad544	Oignons préfrits	4°C-TT 55°C 15min	1,2
2365	Entremêlé de pâtes et d'écrevisses	<i>L. monocytogenes</i> A00M116	Saumon fumé	-20°C-TT 55°C 15min	0,4
2366	Brioche au saumon	<i>L. monocytogenes</i> Ad269	Lardons fumés	-20°C-TT 55°C 15min	0,5
2367	Céleri rémoulade	<i>L. monocytogenes</i> Ad544	Oignons préfrits	-20°C-TT 55°C 15min	0,4
2368	Macédoine de légumes	<i>L. monocytogenes</i> Ad544	Oignons préfrits	-20°C-TT 55°C 15min	0,4
2369	Epinards	<i>L. monocytogenes</i> 180	Salade fraîcheur	-20°C-TT 55°C 15min	1,02
2370	Brocolis	<i>L. monocytogenes</i> 180	Salade fraîcheur	-20°C-TT 55°C 15min	1,02
2373	Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> Ad243	Environnement porc	-20°C-TT 55°C 15min	0,43
2374	Chiffonnette chambre froide épices et arômes	<i>L. monocytogenes</i> Ad243	Environnement porc	-20°C-TT 55°C 15min	0,43
2407	Filet de Pangas	<i>L. monocytogenes</i> A00M021	Saumon	-20°C-TT55°C 30min	0,46
2408	Filet de lieu noir	<i>L. monocytogenes</i> A00M021	Saumon	-20°C-TT55°C 30min	0,46
2409	Riz cuisiné au poisson	<i>L. monocytogenes</i> A00M023	Saumon fumé	-20°C	1,5
2410	Salade cocktail au surimi	<i>L. monocytogenes</i> A00M023	Saumon fumé	-20°C	1,5
2435	Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> Ad611	lait	TT 55°C 30min	0,6
2436	Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> Ad611	lait	TT 55°C 30min	0,6
2437	Fromage de chèvre au lait cru	<i>L. monocytogenes</i> Ad611	lait	TT 55°C 30min	0,6
2438	Epinards hachés	<i>L. monocytogenes</i> Ad285	Poivrons verts	-20°C-TT55°C 30min	0,8
2439	Poivrons rouges	<i>L. monocytogenes</i> Ad285	Poivrons verts	-20°C-TT55°C 30min	0,8
2440	Coule d'œuf	<i>L. monocytogenes</i> 1973/2400	Quiche lorraine	-20°C-TT55°C 30min	0,4
2441	Crème anglaise	<i>L. monocytogenes</i> 1973/2400	Quiche lorraine	-20°C-TT55°C 30min	0,4
2447	Salade Camarguaise au crabe	<i>L. monocytogenes</i> Ad148	saumon fumé	TT55°C 30min	0,6
2448	Salade Camarguaise au surimi	<i>L. monocytogenes</i> A00M0113	Saumon fumé irlandais	TT55°C 30min	0,4
2449	Cocktail de fruits de mer	<i>L. monocytogenes</i> Ad148	saumon fumé	TT55°C 30min	0,6
2450	Salade Alaska	<i>L. monocytogenes</i> A00M0113	Saumon fumé irlandais	TT55°C 30min	0,4
2451	Saumon fumé irlandais	<i>L. monocytogenes</i> A00M0113	Saumon fumé irlandais	TT55°C 30min	0,4
2452	Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 877/113	Ecouvillon tapis tunnel glacage	pH3 7jours	0,9
2453	Eau de siphon	<i>L. monocytogenes</i> A00E0038	Tapis reconstitution	pH10 7jours	0,5
2454	Chiffonnette chambre froide	<i>L. monocytogenes</i> 877/113	Ecouvillon tapis tunnel	pH3 7jours	0,9

Méthode par étalement					
N° éch	Produit	Contaminations artificielles			
		Souche	Origine	Type de stress	Evaluation du stress
	produits de la mer		glaçage		
2455	Chiffonnette milieu de ligne	<i>L. monocytogenes</i> A00E0038	Tapis reconstitution	pH10 7jours	0,5
2456	Chiffonnette fin de ligne	<i>L. monocytogenes</i> A00E049	Support tapis fileteuse	TS+10%NaCl	0,7
2481	Poussières	<i>L. monocytogenes</i> Ad243	Environnement Porc	-20°C	0,5
2482	Poussières	<i>L. monocytogenes</i> Ad243	Environnement Porc	-20°C	0,5
2483	Poussières	<i>L. monocytogenes</i> Ad243	Environnement Porc	-20°C	0,5
2484	Fromage à pâte pressée cuite	<i>L. monocytogenes</i> 909	Lait	-20°C-TT 55°C 30min	0,5
2485	Fromage à pâte molle et croûte fleurie	<i>L. monocytogenes</i> 909	Lait	-20°C-TT 55°C 30min	0,5
2486	Filet de lieu	<i>L. monocytogenes</i> A00M0113	Saumon fumé	TT 55°C 30min--20°C	0,5
2487	Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> A00M0113	Saumon fumé	TT 55°C 30min--20°C	0,5
2488	Filet de Pangas	<i>L. monocytogenes</i> A00M0113	Saumon fumé	TT 55°C 30min--20°C	0,5
2519	Aubergines farcies	<i>L. monocytogenes</i> Ad265	Langue de bœuf	TT 55°C 40min	0,6
2520	Lasagnes	<i>L. monocytogenes</i> Ad265	Langue de bœuf	TT 55°C 40min	0,6
2521	Tomates farcies	<i>L. monocytogenes</i> Ad265	Langue de bœuf	TT 55°C 40min	0,6
2522	Raclette au lait cru	<i>L. monocytogenes</i> AL0106	Lait	TT 55°C 40min	0,5
2523	Roquefort	<i>L. monocytogenes</i> AL0106	Lait	TT 55°C 40min	0,5
2524	Reblochon au lait cru	<i>L. monocytogenes</i> Ad664	Fromage non affiné au lait cru	TT 55°C 40min	0,5
2525	Fromage à pâte molle non cuite au lait cru	<i>L. monocytogenes</i> Ad664	Fromage non affiné au lait cru	TT 55°C 40min	0,5
2526	Thon	<i>L. monocytogenes</i> Ad130	Saumon fumé	TT 55°C 40min	0,7
2527	Filet de Maquereau	<i>L. monocytogenes</i> Ad130	Saumon fumé	TT 55°C 40min	0,7
2528	Seiches à la tomate	<i>L. monocytogenes</i> Ad130	Salade chou-carotte	TT 55°C 40min	0,7
2529	Gaspacho à l'Andalouse	<i>L. monocytogenes</i> Ad545	Poivrons en lamelles	TT 55°C 40min	0,8
2530	Légumes du Sud	<i>L. monocytogenes</i> Ad543	Poivrons en lamelles	TT 55°C 40min	0,8
2531	Mouliné de légumes	<i>L. monocytogenes</i> Ad543	Poivrons en lamelles	TT 55°C 40min	0,8
2532	Eau de siphon	<i>L. monocytogenes</i> Ad627	Emballage-Laiterie	TT 55°C 40min	0,5
2533	Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> Ad627	Emballage-Laiterie	TT 55°C 40min	0,5

63 échantillons ont été artificiellement contaminés sur un total de 73 résultats exploitables pour la méthode par étalement et 58 sur 69 échantillons pour la méthode par inclusion.

Le pourcentage de contamination artificielle est donc respectivement de 86,3 % pour la méthode par étalement et de 84,0 % pour la méthode par inclusion.

2.2.3 Protocole de confirmation

Pour la méthode de référence, 5 colonies par boîte et par dilution ont été confirmées par les tests décrits dans la méthode de référence. Pour la méthode alternative, une colonie par boîte et par dilution a été confirmée à la fois par les tests décrits dans la méthode de référence et par strie sur CONFIRM' *L. mono* Agar.

2.2.4 Résultats bruts

Les échantillons ont été analysés en double par chacune des deux méthodes.

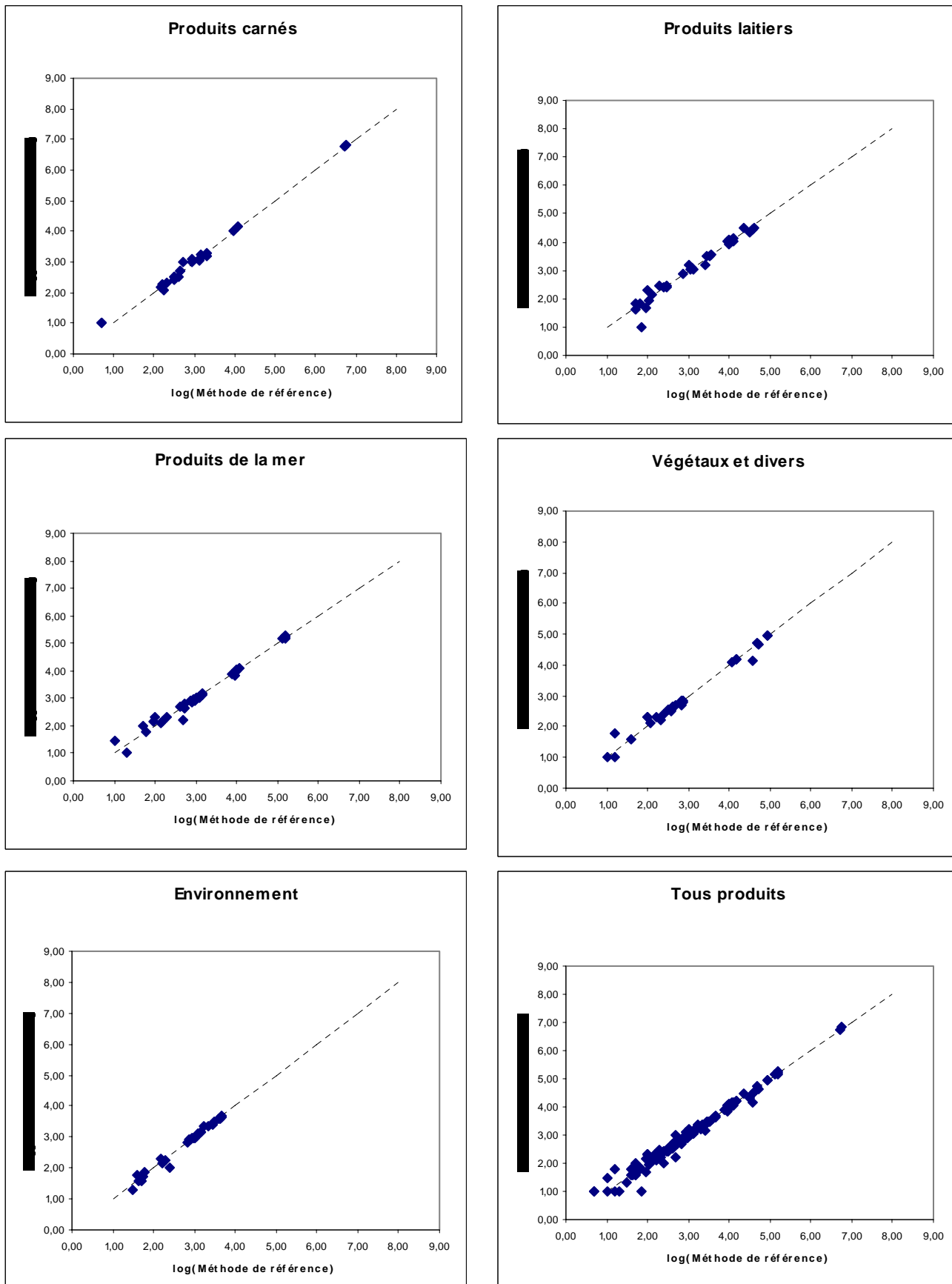
Tableau 3

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 mer	1,00 à 5,26	1,00 à 5,20
Végétaux et ovoproduits	1,00 à 4,96	1,00 à 4,93
Echantillons de l'environnement	1,30 à 3,71	1,00 à 3,66

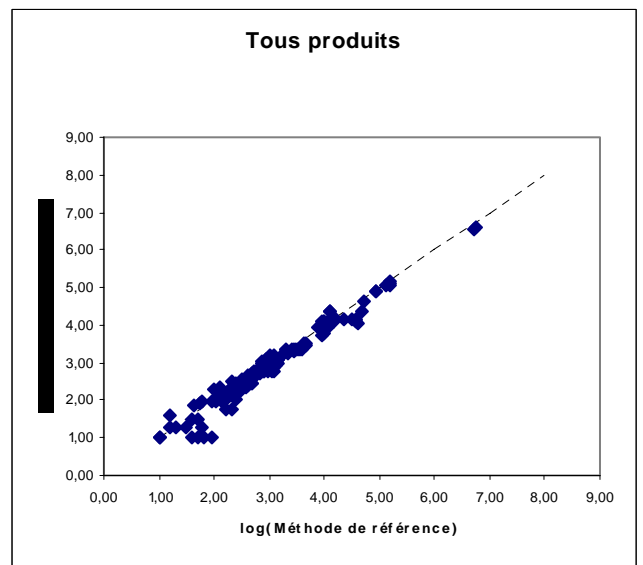
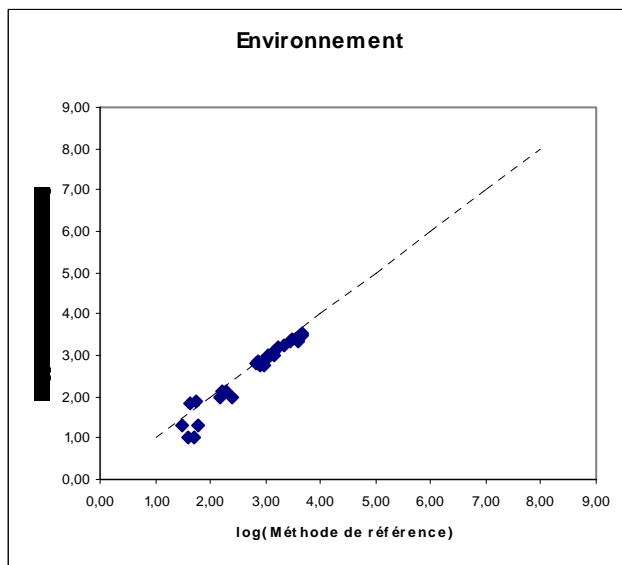
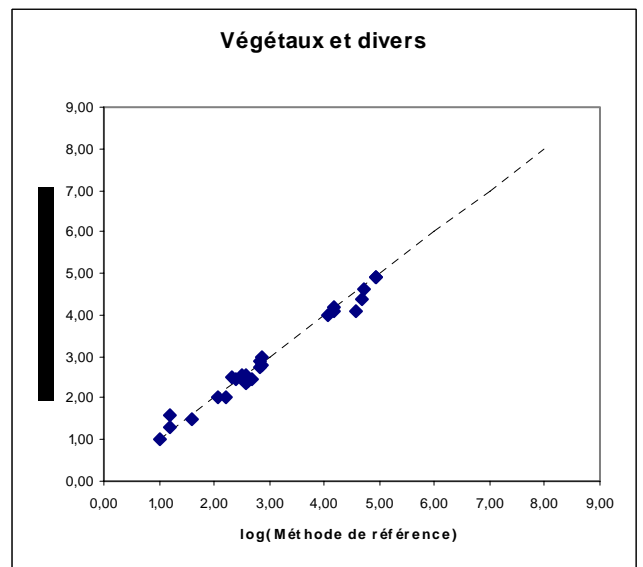
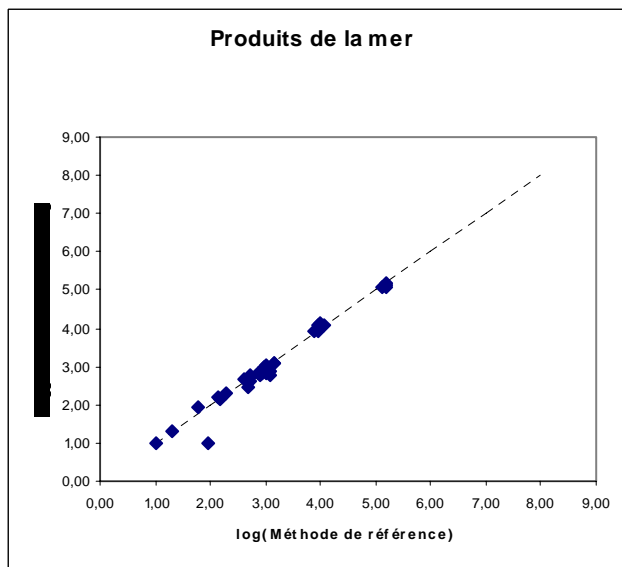
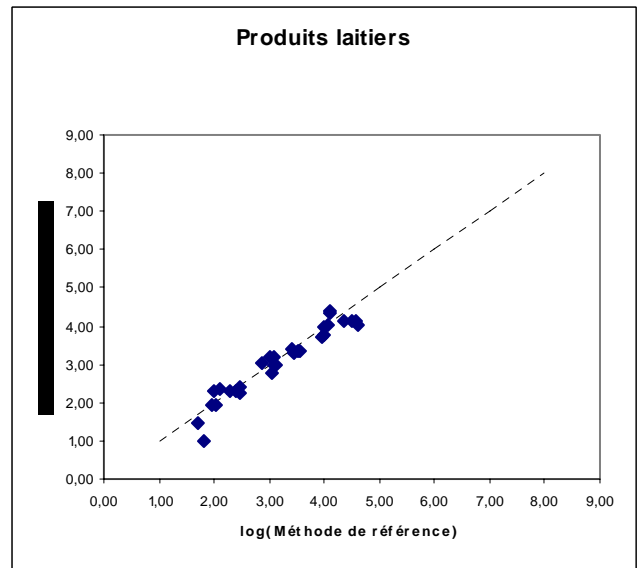
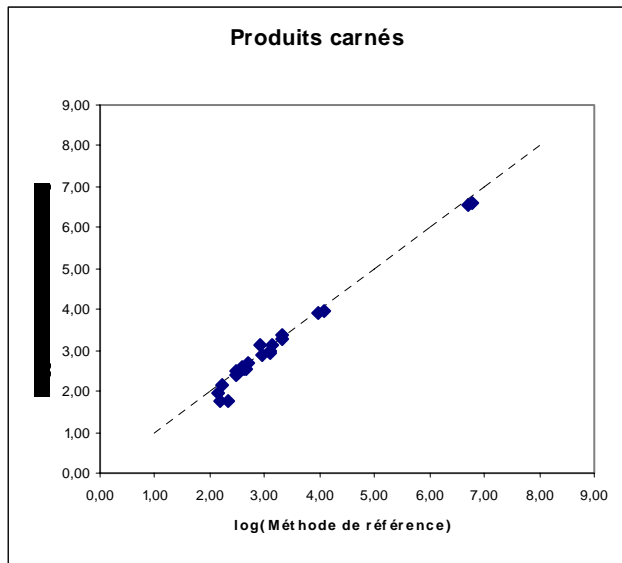
Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie sont donnés figure 3.

Figure 3 - Exactitude relative : Graphique bidimensionnel

Méthode par étalement



Méthode par inclusion



2.2.5 Interprétation

Tableau 4

Méthode par étalement										
Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P%	
									Ordonnée à 0	Pente à 1
Produits carnés	12	1,50	GMFR	0,101	1,336	0,983	0,749	2,228	21	47
Produits laitiers	16	1,63	GMFR	-0,117	1,045	1,029	0,840	2,145	31	42
Produits de la mer	17	0,80	GMFR	0,037	0,348	0,989	0,340	2,131	73	74
Végétaux et ovoproduits	14	1,23	GMFR	0,126	1,312	0,963	1,212	2,179	21	25
Echantillons de l'environnement	14	1,20	GMFR	-0,097	1,758	1,031	1,592	2,179	10	14
Tous produits	73	1,50	GMFR	0,0354	1,114	0,991	0,903	1,994	37	27

Méthode par inclusion										
Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P%	
									Ordonnée à 0	Pente à 1
Produits carnés	11	2,00	GMFR	-0,145	1,347	1,012	0,386	2,262	21	71
Produits laitiers	15	0,75	GMFR	-0,085	0,391	0,994	0,085	2,160	70	93
Produits de la mer	16	2,50	OLS1	-0,144	1,032	1,028	0,657	2,145	9	23
Végétaux et ovoproduits	13	1,50	GMFR	0,100	1,184	0,948	1,971	2,200	26	7
Echantillons de l'environnement	14	0,47	OLS2	0,473	1,977	0,879	2,061	2,179	1	6
Tous produits	69	1,00	GMFR	-0,135	2,721	1,013	0,867	1,996	1	39

Interprétation statistique :

P > 5 % : pas significatif

1 % < P < 5 % : significatif

0,1 % < P < 1 % : très significatif

P < 0,1 % : hyper significatif

Tableau 5

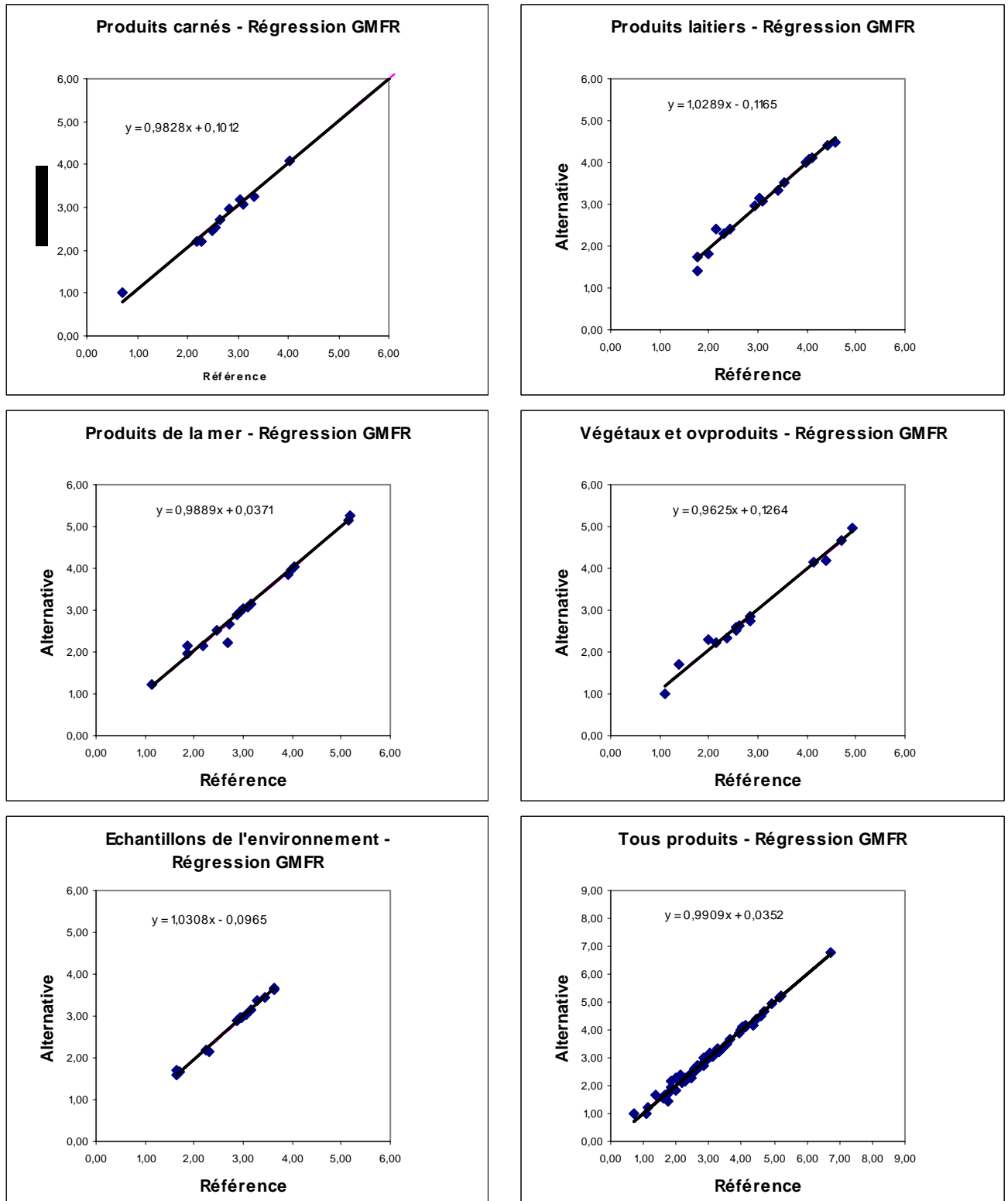
Méthode par étalement			
Catégorie	Biais D	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	0,050	0,220	0,147
Produits laitiers	-0,022	0,382	0,235
Produits de la mer	0,005	0,117	0,148
Végétaux et ovoproduits	-0,002	0,235	0,191
Echantillons de l'environnement	0,000	0,264	0,220
Toutes catégories confondues	0,000	0,264	0,176

Méthode par inclusion			
Catégorie	Biais D	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	-0,085	0,294	0,147
Produits laitiers	-0,070	0,176	0,235
Produits de la mer	-0,040	0,294	0,117
Végétaux et ovoproduits	-0,080	0,352	0,235
Echantillons de l'environnement	-0,110	0,103	0,220
Toutes catégories confondues	-0,070	0,176	0,176

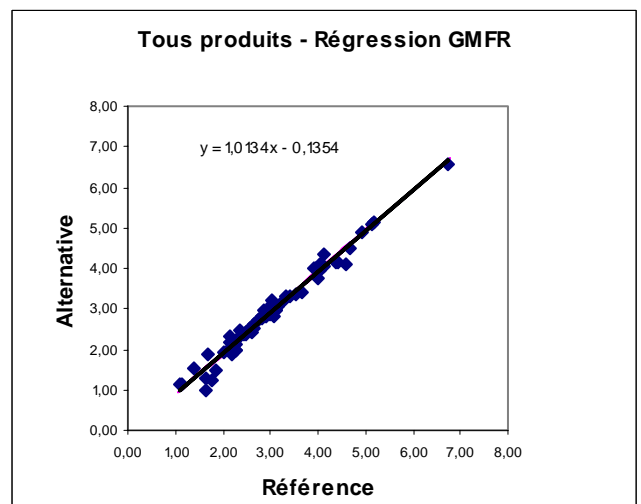
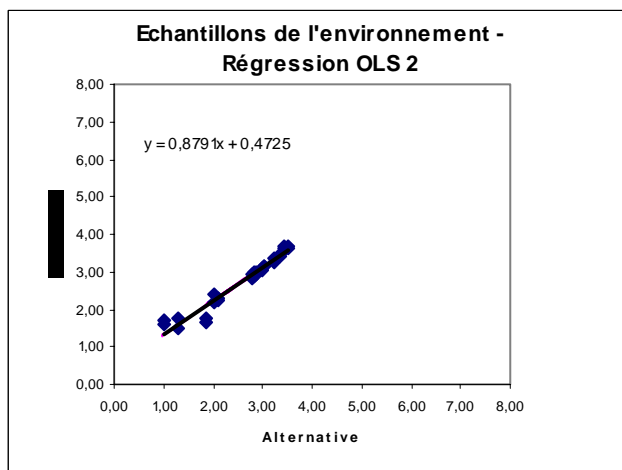
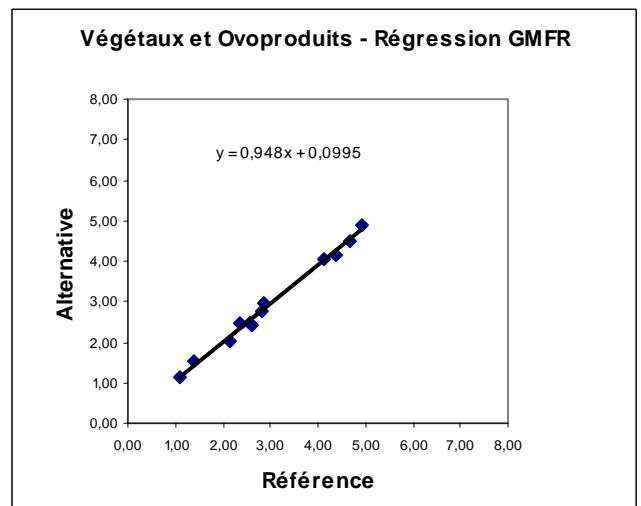
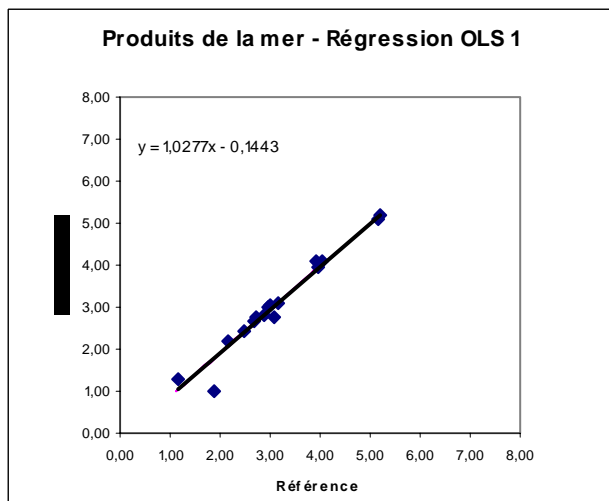
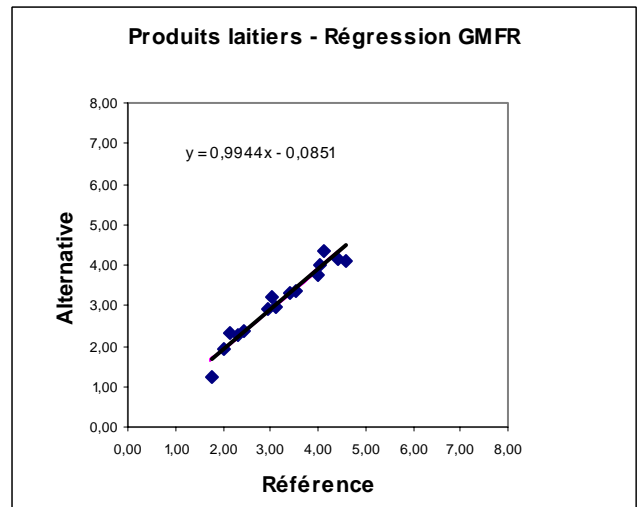
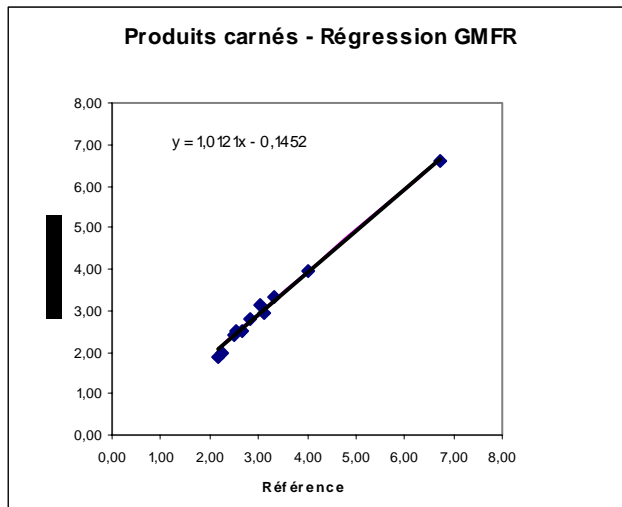
Les droites de régression (sous la forme de graphiques et d'équations) pour chacune des matrices et pour l'ensemble des matrices sont données figure 4.

Figure 4 - Exactitude relative : droites de régression

Méthode par étalement



Méthode par inclusion



2.2.6 Conclusion

Les biais entre la méthode alternative et la méthode de référence sont faibles et varient :

- entre - 0,022 et 0,050, lorsque la méthode alternative est effectuée par étalement,
- entre - 0,110 et - 0,070, lorsque la méthode alternative est effectuée par inclusion.

La répétabilité de la méthode alternative est satisfaisante :

- équivalente à celle de la méthode de référence, avec une valeur de 0,176 pour tous produits confondus (méthode par inclusion),
- légèrement supérieure à celle de la méthode de référence par étalement, avec une valeur de 0,264 pour tous produits confondus (méthode par étalement).

Les tests statistiques valident l'exactitude dans la majorité des cas, avec une valeur de $P > 5 \%$.

Une valeur de $P = 1 \%$ est observée lorsque l'hypothèse de l'ordonnée proche de 0 est testée pour les échantillons de l'environnement et pour tous produits confondus lorsque la méthode alternative est réalisée par inclusion.

La méthode COMPASS[®] *Listeria* Agar montre une exactitude satisfaisante, qu'elle soit réalisée par inclusion ou par étalement.

2.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

Le niveau critique (LC) est défini comme la plus petite quantité qui peut être détectée (non nulle), mais non quantifiée comme une valeur exacte. En dessous de cette valeur, il ne peut être assuré que la valeur vraie est nulle.

La limite de détection (LOD) est définie comme le niveau supérieur au niveau critique.

La limite de quantification (LOQ) est définie comme la plus petite quantité d'analyte (c'est-à-dire le plus petit nombre réel d'organismes) qui peut être mesurée et quantifiée avec une exactitude et une fidélité définies dans les conditions expérimentales de la méthode en cours de validation.

2.3.1 Protocole

La souche *Listeria monocytogenes* A00M0113 a été cultivée en bouillon BHI. Des suspensions de différentes concentrations ont été préparées et inoculées par étalement (1 ml sur 3 boîtes et 0,1 ml sur 1 boîte) et par inclusion (1 ml par boîte). Six réplicats par condition ont été dénombrés. Chaque suspension a été dénombrée en parallèle en PCA inclusion (10 boîtes par taux).

2.3.2 Résultats

Les données sont intrinsèques à la méthode alternative.

Les résultats sont donnés dans les tableaux suivants :

Tableau 6

Méthode par étalement : 1 ml sur 3 boites			
Niveau	Nombre d'échantillons "positifs"	Ecart-type So	Biais X0 (médiane des Xoi)
0	0/6	/	/
0,5	1/6	0,408	0
1	3/6	0,548	0,5
5	6/6	1,602	7,5

Méthode par étalement : 0,1ml sur 1 boite			
Niveau	Nombre d'échantillons "positifs"	Ecart-type So	Biais X0 (médiane des Xoi)
0	0/6	/	/
5	3/6	0,548	0,5
10	6/6	1,033	2
50	6/6	2,137	5

Méthode par inclusion : 0,1ml par boite			
Niveau	Nombre d'échantillons "positifs"	Ecart-type So	Biais X0 (médiane des Xoi)
0	0/6	/	/
5	3/6	0,816	0,5
10	4/6	1,169	1
50	6/6	1,633	6,5

Tableau 7

Méthode par étalement : 1 ml sur 3 boîtes

	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_o + X_o$	0,7
LOD	$3,3 S_o + X_o$	1,3
LOQ	$10S_o + X_o$	4,1

Méthode par étalement : 0,1ml sur 1 boîte

	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_o + X_o$	1,7
LOD	$3,3 S_o + X_o$	3,5
LOQ	$10S_o + X_o$	10,5

Méthode par inclusion : 0,1ml par boîte

	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_o + X_o$	2,2
LOD	$3,3 S_o + X_o$	4,3
LOQ	$10S_o + X_o$	13,2

2.4 Sensibilité relative

La sensibilité relative est définie comme la capacité de la méthode alternative à détecter deux quantités différentes d'analyte qui ont été mesurées avec la méthode de référence en utilisant une matrice donnée sur toute l'étendue de mesure. C'est la variation de quantité minimale (accroissement de la concentration d'analyte x) qui donne une variation significative du signal mesuré (réponse y).

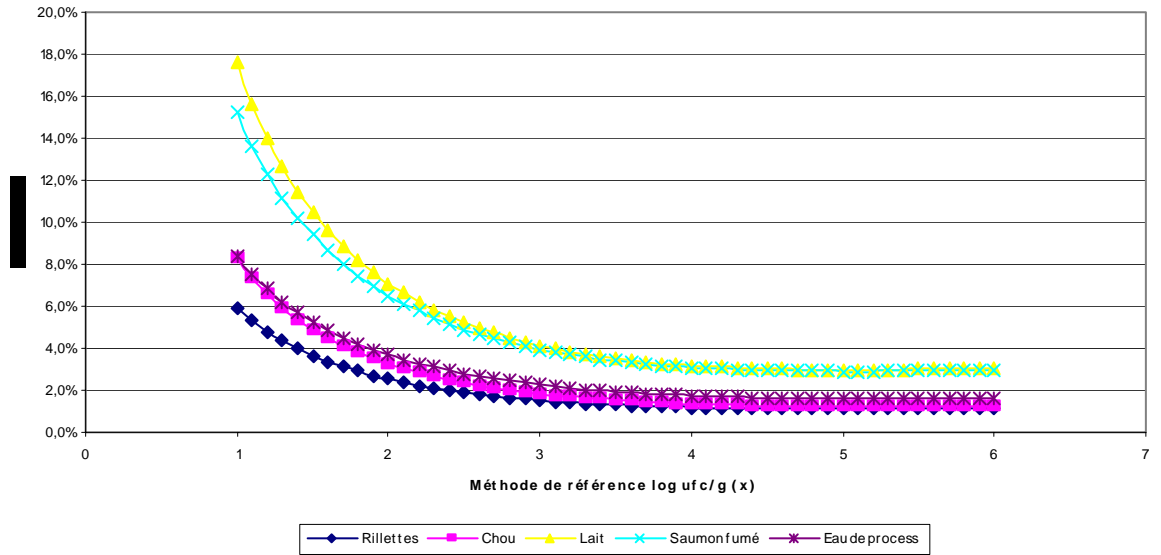
Les données sont intrinsèques à la méthode. Elles sont obtenues à partir des résultats obtenus dans l'étude de linéarité (pas de nouveau protocole spécifique mis en oeuvre)

Les profils de précision obtenus pour les différentes matrices sont présentés figure 5.

Figure 5 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices

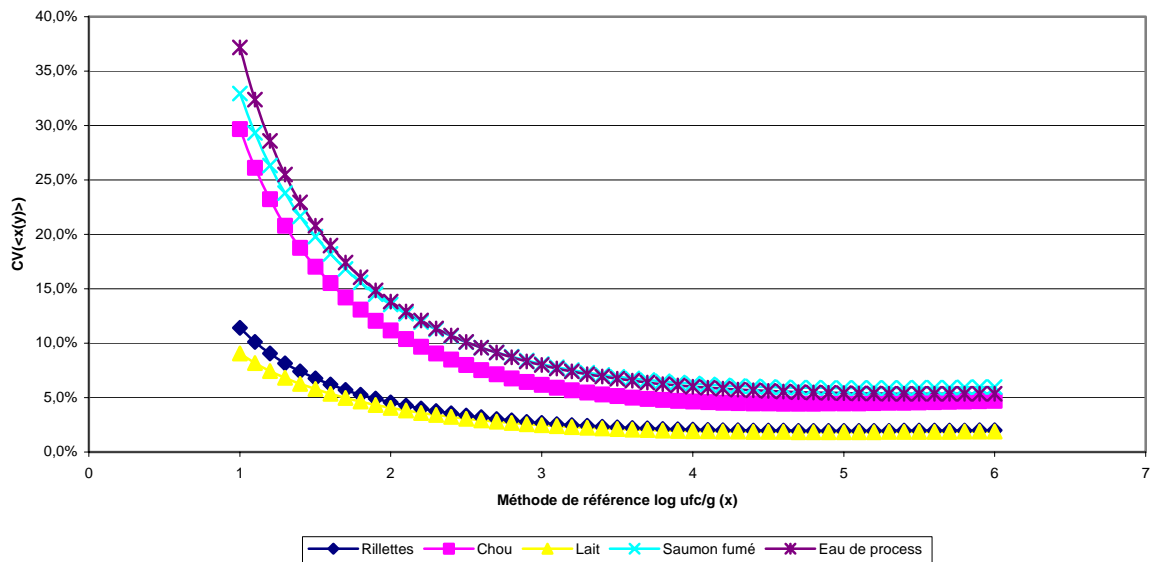
Méthode par étalement

Profils de précisions obtenus pour les différentes matrices



Méthode par inclusion

Profils de précisions obtenus pour les différentes matrices



2.5 Spécificité/Sélectivité

Cette partie a été traitée lors de la présentation de la validation de la méthode de recherche, les tests de confirmation étant alors les tests classiques de la méthode de référence.

COMPASS[®] *Listeria* Agar est spécifique vis-à-vis des 50 souches *Listeria monocytogenes*, et sélectif vis-à-vis des 30 souches non cibles testées.

Des compléments d'étude sont présentés dans le dossier d'extension de la méthode COMPASS[®] *Listeria* Agar pour la recherche des *L. monocytogenes*, la confirmation étant alors basée sur l'utilisation de CONFIRM' *L. mono* (cas 2 de confirmation).

3 ETUDE INTERLABORATOIRES

3.1 Organisation de l'étude

Onze laboratoires ont participé à l'étude qui a porté sur du lait pasteurisé demi-écrémé, inoculé par *Listeria monocytogenes* 153 isolée de Munster.

Les taux d'inoculation visés étaient les suivants :

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

Les échantillons ont été répartis à raison de 10 ml par flacon. Deux échantillons par taux et par laboratoire ont été préparés, soit huit échantillons par laboratoire.

Les réactifs nécessaires à la mise en œuvre de la méthode alternative et de la méthode de référence ont été fournis par la Société SOLABIA.

Les instructions détaillées ont été transmises aux laboratoires par le laboratoire expert.

3.2 Contrôles des paramètres expérimentaux

3.2.1 Stabilité de la souche au cours du transport

Afin de vérifier la stabilité de la souche *Listeria monocytogenes* 153, un dénombrement a été réalisé sur le taux d'inoculation intermédiaire, ceci sur trois répétitions, à J0 et après 48 heures de conservation à 4°C. Les résultats sont reportés dans le tableau 8.

Tableau 8 - Dénombrement de *Listeria monocytogenes* 153 (en UFC/ml)

	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3
J0	1 200	1 200	1 300
J1	1 100	900	1 600
J2	1 100	900	1 600

Aucune évolution de la souche n'est observée au bout de 48 h de conservation à 4°C.

3.2.2 Résultats obtenus pour les deux méthodes

Les résultats de dénombrements de *Listeria monocytogenes* obtenus par le laboratoire expert, par la méthode de référence et par la méthode alternative, sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 - Résultats du laboratoire expert (en log UFC/g)

Méthode par étalement				
Taux visé (log UFC/g)	Méthode de référence		Méthode alternative	
	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
2	1,93	2,04	2,11	2,20
3	2,72	2,82	2,75	2,83
4	3,98	3,97	3,98	3,84

Méthode par inclusion				
Taux visé (log UFC/g)	Méthode de référence		Méthode alternative	
	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
2	1,93	2,04	1,96	1,95
3	2,72	2,82	2,90	2,98
4	3,98	3,97	3,88	3,89

Les taux de contamination visés ont été atteints.

3.2.3 Température des échantillons à réception

Les températures mesurées à réception sont données dans le tableau 10.

Tableau 10 - Température des échantillons à réception

Laboratoires	Température mesurée par le thermobouton (°C)	Température mesurée à réception (°C)	Délai de réception des échantillons
A	2,0	4,7	J1
B	2,0	1,9	J1
C	2,0	2,1	J1
D	1,5	2,5	J1
E	2,0	3,1	J1
F	2,0	4,9	J1
G	2,5	4,7	J1
H	2,0	3,9	J1
I	1,5	3,0	J1
J	2,5	3,6	J1
K	- 1,0	4,5	J1

Une température de - 1°C a été mesurée par le thermobouton à réception pour le laboratoire K qui n'a mentionné aucune congélation des échantillons.

3.2.4 Température des échantillons pendant le transport

Aucune anomalie n'a été relevée pendant le transport ; la température mesurée pendant le transport était comprise entre - 1°C et 4°C.

3.3 Résultats des analyses

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile de la matrice a été effectué selon la méthode ISO 4833 (échantillons non inoculés de l'étude).

Le laboratoire J a obtenu des résultats incohérents pour la méthode de référence (dilutions successives incohérentes). Les résultats de ce laboratoire ont donc été exclus de l'interprétation.

3.4 Calculs et interprétation statistique

✓ DEFINITIONS

- ↪ *Exactitude* : « Etreitesse de l'accord entre un résultat d'essai et la valeur de référence acceptée ».
- ↪ *Fidélité* : « Etreitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité stipulées ».
- ↪ *Répétabilité* : « Etreitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec la même méthode en utilisant un matériau d'essai identique, dans des conditions identiques (appareillage, opérateur, laboratoires et intervalles de temps courts, c'est-à-dire des conditions de répétabilité) ».
- ↪ *Limitée de répétabilité (r)* : « Valeur inférieure ou égale à laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus dans des conditions de répétabilité est attendue avec une probabilité de 95 % ».
- ↪ *Reproductibilité* : « Etreitesse d'accord entre des résultats d'essai individuels effectués sur un matériau d'essai identique en utilisant la même méthode et obtenus par des opérateurs de différents laboratoires utilisant un équipement différent (c'est-à-dire dans des conditions de reproductibilité) ».
- ↪ *Limite de reproductibilité (R)* : « Valeur inférieure ou égale à laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus dans des conditions de reproductibilité est attendue avec une probabilité de 95 % ».

3.4.1 Synthèse des résultats obtenus par les deux méthodes

Une synthèse des résultats est présentée tableau 11.

**Tableau 11 - Synthèse des résultats obtenus par la méthode alternative
et la méthode de référence (en UFC)**

Méthode par étalement																
Laboratoires	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative	
A	<10	<10	<10	<10	50	250	55	250	1600	1400	1700	1400	7000	7500	7400	7100
B	<10	<10	<10	<10	64	160	55	140	1300	1500	1200	1300	12000	13000	12000	12000
C	<10	<10	<10	<10	140	110	130	120	1000	880	970	910	7100	15000	6500	15000
D	<10	<10	<10	<10	170	160	170	170	900	940	850	910	11000	9400	11000	9100
E	<10	<10	<10	<10	140	270	150	260	1500	1700	1600	1600	11000	11000	7100	9400
F	<10	<10	<10	<10	82	110	100	130	950	960	970	640	12000	11000	11000	9000
G	<10	<10	<10	<10	110	120	110	160	1200	1300	1200	1200	12000	13000	14000	12000
H	<10	<10	<10	<10	240	100	220	110	1100	960	980	940	11000	9100	11000	8500
I	<10	<10	<10	<10	86	140	73	120	1100	1000	1100	990	12000	13000	12000	12000
K	<10	<10	<10	<10	160	230	160	250	1500	1400	910	1500	12000	17000	15000	23000

Méthode par inclusion																
Laboratoires	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative	
A	<10	<10	<10	<10	50	250	36	160	1600	1400	710	650	7000	7500	6400	6800
B	<10	<10	<10	<10	64	160	55	120	1300	1500	1200	1300	12000	13000	12000	12000
C	<10	<10	<10	<10	140	110	160	130	1000	880	890	1100	7100	15000	9600	13000
D	<10	<10	<10	<10	170	160	91	91	900	940	960	1100	11000	9400	11000	11000
E	<10	<10	<10	<10	140	270	170	82	1500	1700	1000	1000	11000	11000	9000	9600
F	<10	<10	<10	<10	82	110	100	91	950	960	1000	1300	12000	11000	9500	12000
G	<10	<10	<10	<10	110	120	73	110	1200	1300	1100	1200	12000	13000	11000	11000
H	<10	<10	<10	<10	240	100	91	73	1100	960	970	960	11000	9100	11000	10000
I	<10	<10	<10	<10	86	140	64	64	1100	1000	1100	920	12000	13000	12000	15000
K	<10	<10	<10	<10	160	230	91	82	1500	1400	1400	1900	12000	17000	20000	28000

3.4.2 Calcul du biais

Pour chaque niveau, la différence des moyennes des réplicats (d_i) obtenues par la méthode alternative et la méthode de référence est calculée : $d_i = (M_{i,alt} - M_{i,réf})$.

La médiane ($MED\{d_i\}$) des d_i permet de déterminer le biais D ($MED\{d_i\} = \text{biais D}$).

Le biais D et l'écart-type robuste $S\{d_i\} = K1S_n$ donnent une statistique de t ($t(d) = MED\{d_i\} \sqrt{n}/S\{d_i\}$). Cette valeur de t obtenue est comparée à une valeur critique trouvée dans la table de Student (pour $n = 10$, $t_{critique} = 2,269$). Les valeurs de $t(d)$ obtenues par niveau sont reportées dans le tableau 5.

Tableau 12 - Valeurs de t(d) obtenues par niveau

Méthode par étalement				
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Biais D	t critique ddl (n-1)	Conclusion
1	n =10	0,010	2,262	Biais non significatif
2	n =10	- 0,018	2,262	Biais non significatif
3	n =10	- 0,016	2,262	Biais non significatif

Méthode par inclusion				
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Biais D	t critique ddl (n-1)	Conclusion
1	n =10	- 0,192	2,262	Biais non significatif
2	n =10	- 0,023	2,262	Biais non significatif
3	n =10	0,002	2,262	Biais non significatif

Niveau critique : $t(d) < t_{critique}$

Le biais obtenu entre les deux méthodes est non significatif, quel que soit le niveau testé : il est compris entre - 0,018 et 0,010 log UFC/g pour la méthode COMPASS® *Listeria* Agar par étalement et entre - 0,192 et 0,02 log UFC/g pour la méthode COMPASS® *Listeria* Agar par inclusion.

Le biais entre les deux méthodes déterminé au cours de l'étude préliminaire est d'ordre similaire, toutes catégories confondues, :

- biais de 0,000 log UFC/g pour la méthode par étalement
- biais de - 0,070 log UFC/g pour la méthode par inclusion.

3.4.3 Calcul de la répétabilité

Les valeurs obtenues pour la limite de répétabilité, ainsi que les valeurs obtenues pour le test F sont données dans le tableau 13.

Tableau 13 - Valeurs obtenues pour la limite de répétabilité et valeurs pour le Test F

Méthode par étalement						
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de répétabilité		F calculé (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n ; n)	P %
		Méthode de référence	Méthode alternative			
1	n = 10	0,542	0,601	1,231	2,98	63
2	n = 10	0,141	0,094	2,212*	2,98	11
3	n = 10	0,106	0,249	5,458	2,98	1

Méthode par inclusion						
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de répétabilité		F calculé (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n ; n)	P %
		Méthode de référence	Méthode alternative			
1	n = 10	0,542	0,273	3,945*	2,98	2
2	n = 10	0,141	0,143	1,036	2,98	48
3	n = 10	0,106	0,102	1,092*	2,98	21

Interprétation statistique : P > 5% : non significatif 1 % < P < 5 % : significatif
 0,1 % < P < 1 % : très significatif P < 0,1 % : hyper significatif

La limite de répétabilité de la méthode alternative déterminée au cours de l'étude préliminaire est égale, pour toutes catégories confondues, :

- à 0,264 log UFC/g pour la méthode par étalement
- à 0,176 log UFC/g pour la méthode en inclusion.

La limite de répétabilité de la méthode de référence est égale à 0,176 log UFC/g.

Les limites de répétabilité de la méthode alternative obtenues au cours de l'étude collaborative montrent des valeurs comparables à celles de la méthode de référence. Il est à noter que la limite de répétabilité de la méthode alternative réalisée par inclusion est meilleure que celle de la méthode de référence pour les faibles taux de contamination.

3.4.5 Rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont donnés dans le tableau 15.

Tableau 15 - Rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité

Méthode par étalement			
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité / limite de répétabilité	
		Méthode de référence	Méthode alternative
1	n = 10	1	1,009
2	n = 10	3,038	3,844
3	n = 10	2,323	1,358

Méthode par inclusion			
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité / limite de répétabilité	
		Méthode de référence	Méthode alternative
1	n = 10	1	1,015
2	n = 10	3,038	1,588
3	n = 10	2,323	1,833

Niveau critique : reproductibilité / répétabilité : < 2

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont de même ordre pour la méthode de référence et la méthode alternative. Ils sont généralement inférieurs à 2.

3.4.6 Dispersion entre les laboratoires

Méthode par étalement				
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Méthode de référence F (ou 1/F*)	Méthode alternative F (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n - 1 ; n)
1	n = 10	1,166*	1,036	3,13
2	n = 10	17,453	28,549	3,13
3	n = 10	9,795	2,687	3,13

Méthode par inclusion				
Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Méthode de référence F (ou 1/F*)	Méthode alternative F (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n - 1 ; n)
1	n = 10	1,166*	1,061	3,13
2	n = 10	17,453	4,046	3,13
3	n = 10	9,795	5,716	3,13

Niveau critique : F ou $1/F < F$ (critique)

La dispersion des résultats entre laboratoires est généralement meilleure pour la méthode alternative quel que soit le mode de réalisation, à l'exception de la dispersion observée pour le niveau 2 de contamination pour la méthode alternative effectuée par étalement.

4 PRATICABILITE

La praticabilité a été évaluée d'après les treize critères définis dans les exigences relatives aux études de validation :

1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode :

Les boîtes sont conditionnées en coffret de 20 boîtes, conditionnées en deux sous-unités de 10 boîtes en film plastique. Le milieu pré-coulé est conditionné en flacons de 200 ml (x 6). Les suppléments liquides et lyophilisés sont conditionnés en coffret de 2 fois 6 flacons (qsp 200 mL).

2. *Volume des réactifs :*

Boîtes précoulées : 19 ml par boîte de 90 mm de diamètre

Flacons de milieu prêt à l'emploi : 200 ml

3. *Condition de stockage :*

La température de stockage est mentionnée sur le coffret ; elle est de 2 – 8°C à l'abri de la lumière. La température de stockage des flacons de milieu et des suppléments est de 2 - 8°C.

4. *Modalités d'utilisation après première utilisation :* Sans objet

5. *Equipements ou locaux spécifiques nécessaires :*

La méthode ne nécessite pas de locaux spécifiques ; elle peut être mise en œuvre dans des locaux et équipements habituellement utilisés dans un laboratoire de microbiologie manipulant des germes pathogènes.

6. *Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer :* Sans objet

7. *Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode :*

Pour un technicien formé aux techniques de microbiologie, moins d'une demi-journée est nécessaire pour se former à la méthode.

8. Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique

	Temps en minutes						
	NF EN ISO 11290-2/A1		COMPASS® <i>Listeria</i> Agar Etalement		COMPASS® <i>Listeria</i> Agar Inclusion		
Nombre d'échantillon	5	10	5	10	5	10	
Prélèvement	19	29	19	29	19	29	
Ajout du diluant et broyage	19	29	19	29	19	29	
Dilution et inoculation	25	40	12	25	8	18	
Etalement ou inclusion	17	30	8	15	3	8	
Lecture	50	75	25	45	13	25	
Isolement sur TSYEA	40	63	4	6	4	6	
Confirmations	CONFIRM' <i>L.mono</i>	45	80	4	6	4	6
	Lecture CONFIRM' <i>L.mono</i>	20	30	1	2	1	2
	CAMP Test	45	80	6	10	6	10
	Lecture CAMP Test	20	30	1	2	1	2
	Gram	40	90	12	20	12	20
	Catalase	20	40	4	7	4	7
	TSBYE	120	220	8	15	8	15
	Inoculation des glucides	160	300	13	25	13	25
Lecture des glucides	10	15	2	3	2	3	
Total pour des échantillons positifs ou présentant des colonies suspectes							
Confirmation par CONFIRM' <i>L. mono</i>	584	1040	92	157	71	123	
Confirmation par tests classiques	584	1040	133	231	113	197	
Total/échantillon positif ou présentant des colonies suspectes							
Confirmation par CONFIRM' <i>L. mono</i>	117	104	18	16	14	12	
Confirmation par tests classiques	117	104	27	23	23	20	

Conclusion :

La méthode COMPASS® *Listeria* Agar requiert l'utilisation d'une seule boîte de dénombrement contrairement à la méthode de référence. La méthode de confirmation CONFIRM' *L. mono* est particulièrement aisée à mettre en œuvre et offre un gain de temps important par rapport à la confirmation par tests classiques.

9. Délai d'obtention des résultats

- Echantillons négatifs :
 - * méthode de référence J2
 - * méthode alternative : J2

- Echantillons positifs (présomptifs ou confirmés) :
 - * méthode de référence : J4 à J7
 - * méthode alternative :
 - ⇒ confirmation par méthode CONFIRM' L. mono : J2 à J3
 - ⇒ confirmation par tests classiques : J4 à J7

10. Type de qualification de l'opérateur :

Elle est identique à celle nécessaire à la mise en œuvre de la méthode de référence NF EN ISO 11290-1.

11. Etapes communes avec la méthode de référence :

Préparation de la suspension-mère

12. Traçabilité des résultats d'analyses : Sans objet

13. Maintenance par le laboratoire : Sans objet

5 CONCLUSION

Les **conclusions de l'étude préliminaire** sont les suivantes :

- ❑ La méthode COMPASS® *Listeria* Agar montre une linéarité et une exactitude satisfaisantes.
- ❑ La méthode COMPASS® *Listeria* Agar offre un gain de temps important dans les manipulations et dans les délais d'obtention des résultats.

Les **conclusions de l'étude interlaboratoire** sont les suivantes :

- ❑ Le biais entre les deux méthodes est faible et non significatif ; il varie de - 0,018 à 0,010 log UFC/g pour la méthode par étalement et de - 0,192 à 0,002 log UFC/g pour la méthode par inclusion.
- ❑ Les limites de répétabilité et de reproductibilité de la méthode alternative (technique par étalement et technique par inclusion) sont comparables à celles de la méthode de référence. Il est à noter que les limites de répétabilité et de reproductibilité de la méthode alternative réalisée par inclusion sont meilleures que celles de la méthode de référence pour les faibles taux de contamination.
- ❑ La dispersion entre laboratoires est globalement meilleure pour la méthode alternative que pour la méthode de référence.



BIOKAR DIAGNOSTICS

COMPASS® *Listeria* Agar

DOMAINE D'UTILISATION

COMPASS® *Listeria* Agar est un milieu sélectif utilisé pour les différenciation, isolement et dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires, les échantillons de l'environnement et les prélèvements pathologiques d'origine animale, même fortement contaminés. Sa formulation correspond à celles préconisées dans les protocoles de recherche et de dénombrement de l'amendement A1 des normes internationales EN ISO 11290-1 et 11290-2.

COMPASS® *Listeria* Agar est également employé dans le cadre d'une méthode alternative rapide de recherche de *L. monocytogenes*, dans les produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement, raccourcie à une seule étape préalable d'enrichissement sélectif : elle est officiellement validée par AFAQ AFNOR Certification, sous Attestation N° BKR 23/2-11/02, dont le terme de validité est fixé au 28 novembre 2010.

COMPASS® *Listeria* Agar peut aussi être employé dans le cadre d'une méthode alternative rapide de dénombrement de *L. monocytogenes*, par ensemencement d'une seule boîte en surface ou en profondeur : elle est officiellement validée par AFAQ AFNOR Certification, sous Attestation N° BKR 23/05-12/07, dont le terme de validité est fixé au 4 décembre 2011.

HISTORIQUE

En 1991, MENGAUD *et al.* ont identifié une phospholipase C phosphatidyl-inositol spécifique (PI-PLC) produite par les deux espèces de *Listeria* pathogènes, *L. ivanovii* et *L. monocytogenes*, seule cette dernière l'étant pour l'Homme. Ils ont suggéré que cette enzyme pouvait constituer un facteur de virulence. La même année, NOTERMANS *et al.* développèrent une méthode en double couche pour détecter la PI-PLC en milieu gélosé à l'aide de L- α -phosphatidylinositol. Dans ces conditions, les deux espèces de *Listeria* pathogènes forment des colonies entourées d'un halo opaque, alors que les colonies des espèces non pathogènes n'en présentent pas. Par ailleurs, l'utilisation d'un substrat chromogène, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside, permet de remplacer l'esculine qui était utilisée dans les milieux Oxford et PALCAM. La présence d'esculinase (β -glucosidase) peut ainsi être mise en évidence par la formation d'un précipité bleu sur la colonie. Le mélange sélectif contenu dans le milieu, permet l'inhibition de la presque totalité des bactéries contaminantes.

En associant ces trois principes, **COMPASS® *Listeria* Agar** permet la mise en évidence de colonies bleues entourées d'un halo opaque, bien typiques de *Listeria monocytogenes*.

PRINCIPES

- Les peptones et les facteurs de croissance (extrait de levure, pyruvate de sodium et sulfate de magnésium) favorisent la croissance de *Listeria monocytogenes*.
- L'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.
- Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique du milieu.
- Les *Listeria* hydrolysent le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside (ou X- β -glucoside). Le produit résultant subit une dimérisation oxydative qui se traduit par la formation d'un précipité bleu sur les colonies.
- Le phosphatidyl-inositol est utilisé comme substrat pour la détection de la phospholipase C de *Listeria monocytogenes*. Lorsqu'il est dégradé, un précipité opaque apparaît autour des colonies.
- Le chlorure de lithium et le mélange sélectif constitué de plusieurs antibiotiques et d'un antifongique assurent l'inhibition de la microflore secondaire.

PREPARATION

- Faire fondre le milieu de base (réactif R1 (BM12800) du kit BT008) pendant le minimum de temps nécessaire à sa reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47°C.
- Reprendre le lyophilisat du Supplément sélectif (réactif R2 (BS06700) du kit BT008) en y ajoutant aseptiquement 2 mL d'eau distillée stérile.
- Dans chaque flacon de 200 mL de milieu de base, ajouter stérilement d'abord 2 mL de Supplément sélectif et ensuite 6 mL de Supplément d'enrichissement (réactif R3 (BS06800) du kit BT008).
- Homogénéiser parfaitement après l'introduction de chaque supplément.
- Couler en boîtes de Petri stériles, ceci dans le cadre de l'utilisation de **COMPASS® *Listeria* Agar** dans un protocole de recherche ou de dénombrement par ensemencement en surface.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.

MODE D'EMPLOI (méthode alternative rapide de recherche)

- Préparer une suspension mère de l'échantillon à analyser dans un bouillon de **Fraser-demi** [BK133 + (BS030 ou BS032) ou BK173 + (BS059 ou BS062) ou BM016 par exemple] en respectant un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de 1/10ème.
- Incuber la suspension mère à **(30 ± 1)°C pendant (24 ± 2) heures**.
- Déposer 100 μ L de la culture obtenue sur une boîte de **COMPASS® *Listeria* Agar** et réaliser un isolement à l'aide d'une anse bouclée ou d'une pipette Pasteur.
- Incuber à **(37 ± 1)°C pendant (24 ± 2) heures**.

NOTA 1 :

Il est possible de prolonger l'incubation jusqu'à 48 heures, l'apparition des halos pouvant parfois être différée dans le cas de quelques matrices laitières.

MODE D'EMPLOI (méthode alternative rapide de dénombrement)

- Préparer une suspension mère de l'échantillon à analyser dans de l'eau peptonée tamponnée [BK018, BK131 ou BM010, BM056, BM057 par exemple].
- Incuber la suspension à **(20 ± 2)°C pendant (60 ± 5) minutes.**
- Transférer 0,1 mL de la suspension et, si nécessaire, de ses dilutions décimales successives à la surface d'une seule boîte (par dilution) de **COMPASS® Listeria Agar.**
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- ou
- Transférer 1 mL de la suspension et, si nécessaire, de ses dilutions décimales successives dans une seule boîte de Petri stérile (par dilution).
- Couler environ 15 mL de milieu complet.
- Homogénéiser parfaitement et laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à **(37 ± 1)°C pendant (24 ± 2) heures.**
- **En l'absence de colonies caractéristiques** (c'est à dire absence de colonies ou colonies bleues avec halos encore peu visibles à 24 heures), **prolonger l'incubation de 24 heures supplémentaires.**
- L'expression des résultats se fera conformément aux recommandations établies dans la norme ISO 7218 (août 2007).

NOTA 2 :

COMPASS® Listeria Agar s'inscrit également comme premier milieu d'isolement obligatoire du protocole opératoire de recherche de *L. monocytogenes* tel que décrit dans le texte normatif EN ISO 11290-1/A1, ainsi que comme milieu unique du protocole opératoire de dénombrement de *L. monocytogenes* selon l'EN ISO 11290-2/A1.

LECTURE

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* apparaissent bleues à bleu vert et sont entourées d'un halo opaque. Les autres espèces de *Listeria* forment des colonies bleues à bleu vert, sans halo. Il est à noter que des souches de *Listeria ivanovii* peuvent présenter des colonies caractéristiques, de tailles néanmoins plus réduites.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, les résultats positifs doivent être confirmés soit :

- en mettant en œuvre les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification nécessaire)
- ou
- en utilisant **CONFIRM' L. mono Agar**
- ou
- en utilisant toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de celui de **COMPASS® Listeria Agar** (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 (exemple : enrichissement commun avec un même milieu). Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun).

En cas de résultats discordants (positifs par la méthode alternative, non confirmés 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.

NOTA 3 :

Lorsque la présence de *Listeria monocytogenes* a déjà été confirmée lors de la recherche, il est possible de s'affranchir de l'étape de confirmation à l'issue du dénombrement, en cas de résultat positif.

FORMULE – TYPE du milieu complet

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande	18,00 g
- Tryptone	6,00 g
- Extrait de levure	10,00 g
- Pyruvate de sodium	2,00 g
- Glucose	2,00 g
- Glycérophosphate de magnésium	1,00 g
- Sulfate de magnésium anhydre	0,50 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- L- α -phosphatidyl-inositol	2,00 g
- Hydrogénophosphate disodique anhydre	2,50 g
- Chlorure de lithium	10,00 g
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside	0,05 g
- Acide nalidixique	0,02 g
- Ceftazidime	0,02 g
- Polymyxine B (sulfate)	76700 UI
- Cycloheximide	0,05 g
- Agar agar bactériologique	12,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 \pm 0,2.

CONTRÔLE QUALITE

- Aspect, couleur : gélose ambrée, opalescente.
- Réponse culturale typique après 24-48 heures d'incubation à (37 \pm 1)°C :

Microorganismes	Croissance (Rapport de productivité : P_R)	Caractéristiques
<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 59.53	$P_R \geq 50\%$	colonies bleu vert entourées d'un halo opaque colonies bleu vert entourées d'un halo opaque
<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 78.31	$P_R \geq 50\%$	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	inhibée, score 0 inhibée, score 0	

STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu complet préparé en boîtes, avec suppléments : 15 jours à 2-8°C (à titre indicatif).

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri et Kit :

- Stocker entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

PRESENTATION

Code

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm) :

- Coffret de 20 boîtes
- Coffret de 120 boîtes

BM12308
BM12408

Kit :

- Coffret composé de 6 flacons de 200 mL de milieu de base (R1),
de 6 flacons qsp 200 mL de supplément sélectif lyophilisé (R2)
et de 6 flacons qsp 200 mL de supplément d'enrichissement liquide (R3)

BT00808

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MENGAUD, J., BRAUN-BRETON, C., and COSSART, P.. 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor ? *Molecular Microbiology*, **5(2)** : 367-372.

NOTERMANS, S.H., DUFRENNE, J., LEIMESTER-WÄCHTER, M., DOMANN, E., and CHAKRABORTY, T.. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **57(9)** : 2666-2670.

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AGOSTI, M.. 1997. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. *Industria Alimentari*, **36** : 1-3

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., and AGOSTI, M.. 1997. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. *Quimper Froid Symposium Proceedings* p6. ADRIA Quimper France. 16-18 June 1997.

NF EN ISO 16140 (V 08-103). Octobre 2003. Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

NF EN ISO 11290-1/A1 (V 08-028-1/A1). Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 : Méthode de recherche - Amendement 1 : Modification des milieux d'isolement, de la recherche de l'hémolyse et introduction de données de fidélité.

NF EN ISO 11290-2/A1 (V 08-028-2/A1). Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 2 : Méthode de dénombrement - Amendement 1 : Modification du milieu d'isolement.

NF EN ISO 7218 (V 08-002). Octobre 2007. Microbiologie des Aliments. Exigences générales et recommandations.



BKR 23/2-11/02 et BKR 23/05-12/07
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFAQ AFNOR Certification
www.afnor-validation.org

CONFIRM[®] L. mono Agar a fait l'objet d'un dépôt de marque de la part de SOLABIA S.A.S..

COMPASS[®] est une marque de SOLABIA S.A.S..

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2007-12-12.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document : BM123/F/2007-05 : 2

6/6

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34



CONFIRM' *L. mono* Agar

DOMAINE D'UTILISATION

CONFIRM' *L. mono* Agar est un milieu solide destiné à la confirmation de l'espèce *Listeria monocytogenes*, à partir d'une seule colonie caractéristique obtenue sur **COMPASS® *Listeria* Agar**, ceci dans le cadre de la méthode de recherche (validée par AFAQ AFNOR Certification sous Attestation N° BKR 23/2-11/02, ceci jusqu'au 28 novembre 2010) et de dénombrement (validée par AFAQ AFNOR Certification sous Attestation N° BKR 23/05-12/07, ceci jusqu'au 4 décembre 2011).

HISTORIQUE

Les méthodes de confirmation normalisées (recherche de l'hémolyse, utilisation des glucides et test de CAMP) sont fastidieuses à mettre en œuvre et restent mal adaptées à l'utilisation des géloses à révélation chromogénique, qui montrent une spécificité et une sélectivité très importantes vis-à-vis des *Listeria monocytogenes*.

Dès 1977, Groves et Welshimer ont montré la corrélation entre la pathogénicité et l'acidification du rhamnose chez les bactéries appartenant au genre *Listeria*.

Quatorze ans plus tard, Notermans et ses collaborateurs (1991) montraient que l'activité enzymatique de la phospholipase C phosphatidyl-inositol spécifique (PI-PLC) était un des marqueurs fondamentaux de la pathogénicité de l'espèce *Listeria monocytogenes*.

Le principe de **CONFIRM' *L. mono* Agar** est fondé sur la mise en évidence de ces deux expressions qui, combinées, s'avèrent spécifiques de *Listeria monocytogenes*, à partir d'une seule colonie caractéristique prélevée sur **COMPASS® *Listeria* Agar**.

PRINCIPES

- La composition originale du milieu en peptones et en facteurs de croissance assure la récupération des souches appartenant au genre *Listeria*, isolées à partir de **COMPASS® *Listeria* Agar** (consulter la fiche technique concernée).
- Le système inhibiteur assure la sélectivité vis-à-vis de la flore d'accompagnement, éventuellement prélevée avec les colonies caractéristiques isolées à partir de **COMPASS® *Listeria* Agar**.
- La mise en évidence de la fermentation du rhamnose est assurée par le virage au jaune de l'indicateur coloré, en raison de la chute localisée du pH.
- La mise en évidence de la PI-PLC est assurée par la visualisation d'un halo d'opacification autour de la strie d'inoculation.

MODE D'EMPLOI

- Ensemencer en strie individuelle la surface de **CONFIRM' L. mono Agar**, à partir d'une seule colonie typique isolée sur **COMPASS® Listeria Agar**. Il est possible de réaliser jusqu'à 6 confirmations en ensemençant la gélose de manière radiale, préférentiellement de la périphérie de la boîte vers son centre.
- Incuber à $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ pendant (24 ± 3) heures.

LECTURE / INTERPRETATION

L'aspect des stries est le suivant, après incubation à $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ pendant (24 ± 3) heures :

Microorganisme	Caractéristiques		
	Croissance	Décoloration jaune (Fermentation du rhamnose)	Halo d'opacification (Hydrolyse des phospholipides)
<i>Listeria monocytogenes</i>	bonne	positive	positive
<i>Listeria ivanovii</i>	partiellement inhibée ⁽¹⁾	négative	variable
<i>Listeria innocua</i> , <i>Listeria murrayi</i> , <i>Listeria welshimeri</i> , <i>Listeria seeligeri</i>	bonne	variable	négative
<i>Listeria grayi</i>	bonne	négative	négative
<i>Bacillus cereus</i>	partiellement inhibée ⁽¹⁾	négative	variable
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	totalement inhibée	-	-
<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas</i>	totalement inhibée	-	-

⁽¹⁾: Les souches de *Listeria ivanovii* et *Bacillus cereus* sont partiellement inhibées sur CONFIRM' L. mono Agar, ce qui peut se traduire par l'absence de culture bactérienne sur la strie d'inoculation. Toutefois, dans un certain nombre de cas, malgré l'absence de culture au dépôt après incubation, un halo d'opacification peut apparaître en raison du maintien des activités enzymatiques des cellules déposées à la surface de la gélose.

FORMULE-TYPE

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Mélange spécial de peptones	18,800 g
- Activateurs de croissance	8,600 g
- Mélange sélectif	9,700 g
- Rhamnose	7,330 g
- Indicateur coloré	0,097 g
- Phospholipides	1,450 g
- Agar agar bactériologique.....	14,500 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,1.

CONTRÔLE QUALITE

- Milieu préparé : gélose rouge, opalescente
- Réponse culturale typique après (24 ± 3) heures d'incubation à (37 ± 1)°C :

Microorganismes	Croissance	Caractéristiques des stries	
		Décoloration (jaune)	Halo d'opacification
<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 78.31	bonne, score 2	positive	présence
<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 59.53	bonne, score 2	positive	présence
<i>Listeria ivanovii</i> CIP 78.42T	ralentie, score 0-1	négative	présence
<i>Listeria innocua</i> ATCC® 33090	bonne, score 2	positive	absence
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	inhibée, score 0		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	inhibée, score 0		

STOCKAGE / CONSERVATION**Milieu pré-coulé en boîtes de Petri :**

- Stocker entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

PRESENTATION

Code

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm) :

- Coffret de 20 boîtes

BM12908

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GROVES, R. D., and WELSHIMER, H. J.. 1977. Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions. *Journal of Clinical Microbiology*, 5(6), 559-563.

NOTERMANS, S.H., DUFRENNE, J., LEIMESTER-WÄCHTER, M., DOMANN, E., and CHAKRABORTY, T.. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9), 2666-2670.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

CONFIRM' L. mono Agar a fait l'objet d'un dépôt de marque de la part de SOLABIA S.A.S..

COMPASS® est une marque de SOLABIA S.A.S..

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2007-12-07.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document : BM129/F/2007-06 : 2

4/4

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

**Annexe 2 - Méthode de référence NF EN ISO 11290-2/A1 (février 2005):
méthode de dénombrement de *Listeria monocytogenes***

