



**Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire
Performances analytiques certifiées**

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME NF EN ISO 16140 : 2003**

N° attestation : UNI 03/05 - 09/06

Date de validation :	15.09.2006
Extension le :	29.03.2007
Fin de validité :	15.09.2010

La Société **OXOID Ltd**
(siège social Wade Road
et site de RG24 8 PW BASINGSTOKE
production) UK

Distributeur **OXOID Thermofisher**
6 route de Paisy
69571 DARDILLY CEDEX
France

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

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

Référence du protocole : **OCLA-D2 07/2007**

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE(S) DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-1 (février 1997) incluant l'**amendement A1** (2004) : 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**

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 - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode Listeria Precis™ comprend une incubation en bouillon de préenrichissement sélectif spécifique, suivie d'un isolement sur un milieu chromogène dénommé Brilliance™ Listeria, utilisé pour la différenciation et l'isolement de *Listeria monocytogenes*.

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

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

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

NOTE 1 : étude d'extension (mars 2007)

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

Des essais ont été réalisés à partir de cultures de souches en bouillon nutritif et isolées en parallèle sur gélose Brilliance™ Listeria et sur gélose TSA-YE et susceptibles de présenter des colonies caractéristiques.

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

Les résultats obtenus étaient conformes à ceux attendus.

NOTE 2 : modification de la référence commerciale (février 2008)

La méthode alternative anciennement dénommée OCLA a été renommée Listeria Precis™. Le milieu chromogène OCLA a changé de dénomination pour devenir Brilliance™ Listeria.

LINEARITE et EXACTITUDE relative

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Etude de linéarité :

Des essais ont été effectués en 2006 sur les 6 combinaisons produit alimentaire/souche et dans les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**, aux cinq niveaux de contamination artificielle suivants :

- 10 à 50 UFC par gramme
- 50 à 100 UFC par gramme
- 100 à 500 UFC par gramme
- 500 à 1 000 UFC par gramme
- 1 000 à 10 000 UFC par gramme

Les résultats obtenus sont les suivants :

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

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

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

Etude d'exactitude :

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

Produits carnés, ovoproduits, produits laitiers, produits de la pêche, produits végétaux et échantillons d'environnement.

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

A titre indicatif, les domaines de contamination (concentration) étaient les suivants :

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	1,0 – 4,0
Produits laitiers	1,5 – 4,1
Produits de la pêche	1,0 – 3,8
Produits végétaux	1,7 – 5,1
Ovoproduits	1,3 – 5,0
Prélèvements d'environnement	1,7 – 5,1

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

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

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

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

La répétabilité pour les deux méthodes et le biais entre les deux méthodes ont été déterminés selon le mode de calcul utilisé pour l'étude collaborative (Cf. §6.3.5 et §6.3.6 de la norme NF EN ISO 16140). Ces résultats apportent une information complémentaire pour le critère exactitude.

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode alternative est de **0,311**

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

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

$p = -0,03$ si l'on prend la médiane

Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Etude réalisée en 2004 lors de la Validation de la méthode utilisée pour la recherche des *Listeria monocytogenes*.

- 48 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées, après 24 h d'incubation du bouillon d'enrichissement. Les deux souches n'ayant pas donné de réaction positive sont des souches de collection de sérotype 3a et 4e.
- L'étude de 30 souches non *Listeria monocytogenes* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 4 à 7 jours avec la méthode alternative comme avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 2 jours (si pas de confirmations) ou 4 à 7 jours (avec confirmations) avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

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

- < 10 bactéries par ml
- 50 bactéries par ml
- 500 bactéries par ml
- 5 000 bactéries par 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	Nombre de laboratoires avec résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
Niveau 1	10	0,785	0,785	0,799	0,799	0,068
Niveau 2	10	0,131	0,192	0,323	0,364	0,029
Niveau 3	10	0,139	0,139	0,159	0,159	0,009

* Les résultats de trois laboratoires n'ont pas été exploités : deux laboratoires n'ont pas respecté le protocole et un autre laboratoire n'a pas reçu les échantillons dans les délais.

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