



**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 : CHR - 21/2 – 12/06

Date de validation :	14.12.2006
Date de reconduction :	25.09.2009
Fin de validité :	14.12.2013

La Société **CHROMagar**
(siège social et 4, place du 18 juin 1940
site de production) F-75006 Paris

Distributeur **Laboratoires HUMEAU**
4, rue Képler
ZA de Gesvrine – BP 4125
F-44241 La Chapelle-sur-Erdre Cedex

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

**CHROMagar™ Listeria numération
Pour le dénombrement des *Listeria monocytogenes***

Référence du protocole : NT-EXT-009 (Version 4)
 NT-EXT-009-Annexe (Version 1)
 NT-EXT-026 (Version 3)

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et prélèvements d'environnement

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

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

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

PRINCIPE DE LA METHODE

CHROMagar™ *Listeria* numération pour le dénombrement des *Listeria monocytogenes* est une méthode incluant un diluant et un milieu CHROMagar™ *Listeria* chromogène pour la détection spécifique des *Listeria monocytogenes*.

En cas de résultat positif par la méthode de dénombrement, la confirmation n'est pas nécessaire dans la mesure où la présence de *Listeria monocytogenes* a été confirmée lors de la recherche.

Dans les autres cas, les échantillons positifs à l'issue du test CHROMagar™ *Listeria* numération doivent être confirmés de l'une des manières suivantes:

- à partir des colonies isolées sur CHROMagar™ *Listeria*, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- A partir d'une colonie suspecte bien isolée sur CHROMagar™ *Listeria*, en réalisant un spot sur une gélose CHROMagar™ Identification *Listeria* : les *Listeria monocytogenes* présentent une coloration mauve avec un halo blanc.

En cas de résultats discordants (positif sur CHROMagar™ *Listeria*, non confirmé par les tests décrits ci-dessus), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE (historique de validation)

Dans le cadre de la reconduction de 2009, aucun essai complémentaire n'a été réalisé. Depuis la dernière validation en 2006, la méthode CHROMagar™ *Listeria* n'a pas été modifiée, et le protocole de validation ainsi que la méthode de référence n'ont pas changé.

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 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 : 10 à 50, 50 à 100, 100 à 500, 500 à 1 000 et 1 000 à 10 000 UFC/g.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Rillettes / <i>Listeria monocytogenes</i> 4e	$Y = 0,932 X + 0,305$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,011 X - 0,004$
Produits végétaux	Laitue / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 1,024 X - 0,051$
Produits de la pêche	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	$Y = 1,006 X - 0,031$
Prélèvements d'environnement	Eau de process / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	$Y = 0,967 X + 0,122$

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

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

Etude d'exactitude :

Des essais ont été effectués en 2006. L'exploitation statistique a porté sur 54 résultats interprétables provenant de 10 échantillons naturellement contaminés et 44 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits végétaux, produits de la pêche et prélèvements 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	1,70 à 4,15
Produits laitiers	1,48 à 4,08
Produits de la pêche	1,60 à 4,00
Produits végétaux	1,84 à 5,11
Prélèvement d'environnement	1,70 à 5,18

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

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,008 X - 0,012$$

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

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

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.

Méthode alternative
 $r = 0,332$

Méthode de référence
 $r = 0,280$

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

$p = 0,02$ si l'on prend la médiane

ou $D = 0,01$ si on prend la moyenne des biais individuels.

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

La spécificité de la méthode alternative a été étudiée en 2001 lors la Validation de la méthode pour la recherche de *Listeria monocytogenes* :

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 31 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 3 jours (si confirmation avec CHROMagar™ Identification Listeria) ou 4 à 7 jours (si confirmation par les tests classiques) avec la méthode alternative contre 4 à 7 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec avec la méthode alternative comme avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons d'un mélange de 50% de lait pasteurisé demi-écrémé et de 50% de lait entier pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* 1/2a aux 4 niveaux suivants :

- < 10 UFC/ml
- 50 – 500 UFC/ml
- 500 – 5 000 UFC/ml
- 5 000 – 50 000 UFC/ml

Les laboratoires ont testé, par chacune des **deux méthodes, deux réplicats par niveau** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants (pour les 3 niveaux supérieurs à 50 UFC/ml) :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
Niveau 1	10	0,128	0,215	0,165	0,175	0,047
Niveau 2	10	0,106	0,106	0,152	0,204	-0,022
Niveau 3	10	0,182	0,182	0,197	0,197	0,000

* Deux laboratoires ont été exclus, l'un pour réception tardive des échantillons et l'autre pour non respect du protocole d'analyse

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