



**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 : AES 10/03 – 09/00

Date de validation :	27.09.2000
Dates de reconduction*:	07.04.2005
	30.06.2008
Extension les :	15.09.2006
	01.04.2010
Fin de validité :	27.09.2012

*Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la reconduction en 2005 et lors de l'extension en 2006

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

AES CHEMUNEX
Rue Maryse Bastié – Ker Lann
CS 17219
35172 BRUZ CEDEX

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

ALOA® ONE DAY

Méthode de recherche de *Listeria* spp et *Listeria monocytogenes*

Référence du protocole : 520080 T

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-1 (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

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode ALOA[®] ONE DAY comprend un milieu gélosé chromogène (ALOA[®]) qui permet de détecter les *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp par la mise en évidence de la β -glucosidase. Les *Listeria monocytogenes* se distinguent par la formation d'un halo opaque lié à l'activité d'une phospholipase spécifique provoquant la précipitation de phospholipides.

Après ensemencement par étalement ou isolement, les boîtes sont incubées à 37°C et lues après 24 heures à 48 heures d'incubation. Les souches de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp forment des colonies typiques en 24 heures.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs de *Listeria monocytogenes* à l'issue de la méthode ALOA[®] ONE DAY doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- A partir de colonies isolées sur la gélose ALOA[®] selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- Par la technique ALOA[®] Confirmation (selon les intructions décrites dans la fiche technique ALOA[®] Confirmation).
- Par toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode ALOA[®] ONE DAY, en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique du fabricant.

Dans le cadre de la marque AFNOR Validation, tous les échantillons positifs de *Listeria* spp à l'issue de la méthode ALOA[®] ONE DAY doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- A partir des colonies isolées sur la gélose ALOA[®] selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- Par test immuno-chromatographique *Listeria* species Confirmation strip à partir d'une colonie isolée sur la gélose ALOA[®].
- Par piqûre sur gélose PALCAM à partir d'une colonie isolée sur la gélose ALOA[®].
- par toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode ALOA[®] ONE DAY, en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique du fabricant.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, 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

La présente méthode a été initialement validée en 2000 sous la référence ALOA/L.Monodisk.

En 2002, une **extension** de la marque AFNOR VALIDATION a été attribuée à la méthode ALOA ONE DAY[™], en remplacement de la méthode ALOA/L.Monodisk.

En 2004, l'étude de **reconduction** a pris en compte les aspects suivants :

- Etude d'une cinquième matrice (prélèvements d'environnement),
- Prise en compte du nouveau référentiel de validation normalisé EN ISO 16140 pour l'étude préliminaire
- Prise en compte de l'amendement A1 à la norme de référence EN ISO 11290-1

Des essais ayant été pratiqués par anticipation dès l'année 2000 conformément à la future norme EN ISO 16140, l'étude de reconduction en 2004 a porté sur les aspects suivants :

- Etude comparative :
 - réexploitation des données obtenues précédemment pour les catégories d'alimentation humaine
 - étude de la catégorie prélèvements d'environnement
- Etude interlaboratoire : reprise des résultats précédemment obtenus.

En 2006, une nouvelle **extension** de la marque AFNOR VALIDATION a été attribuée pour prendre en compte la nouvelle étude interlaboratoire réalisée selon le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140. Les résultats de cette nouvelle étude ont été intégrés dans cette attestation en remplacement de ceux obtenus selon l'ancien protocole d'étude.

En juin 2008, la validation a été **reconduite** sans réalisation d'essais complémentaires, puisque ni la méthode ALOA® ONE DAY, ni la méthode prise en référence, ni le protocole de validation n'ont été modifiés.

En avril 2010, une seconde **extension** a permis d'étendre le champ d'application AFNOR VALIDATION à la recherche de toutes les *Listeria* spp. Deux nouvelles options de confirmation applicable à la recherche de *Listeria* spp ont été validées (piqûre sur gélose Palcam et test *Listeria* species Confirmation Strip), ainsi que la possibilité de procéder à un isolement (en plus de l'ensemencement par étalement).

Des compléments d'essais ont été réalisés en exactitude/spécificité/sensibilité relatives, ainsi que pour le niveau de détection relatif, la sélectivité et la praticabilité. Le protocole par isolement a été utilisé pour la recherche des *L. spp* avec lecture à 24 heures. Les résultats figurent dans la présente attestation.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

1/ Réponse *Listeria monocytogenes* :

Des essais ont été effectués en 2000 sur **164 échantillons de produits** dont 53 naturellement contaminés et 111 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits de la mer, produits végétaux, produits laitiers.

Des essais complémentaires ont été effectués en 2004 et 2005 sur :

- **92 échantillons** appartenant aux catégories produits carnés, produits de la mer, produits végétaux, produits laitiers, dont 23 échantillons naturellement contaminés, 52 artificiellement contaminés et 17 non contaminés.
- **61 échantillons d'environnement** dont 4 naturellement contaminés, 26 artificiellement contaminés et 31 non contaminés.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les deux méthodes. Deux lectures (à 24 heures et 48 heures) ont été effectuées.

Les résultats sont repris ci-dessous dans deux tableaux distincts.

Tableau de résultats « lecture à 24 heures » (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 156 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 159 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) (3) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

Tableau de résultats « lecture à 48 heures » (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 157 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 0 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 158 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) (3) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

2/ Réponse *Listeria spp* :

Des essais ont été effectués en 2010 sur 379 échantillons de produits dont 123 naturellement contaminés, 74 artificiellement contaminés et 111 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits de la mer, produits végétaux, produits laitiers et échantillons d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés en simple par les deux méthodes.

Tableau de résultats « lecture à 24 heures » (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 191 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 182 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont trois échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Les pourcentages obtenus, par rapport à la méthode de référence, sont les suivants :

	Réponse <i>L.monocytogenes</i>		Réponse <i>L. spp</i>
	A 24 heures	A 48 heures	A 24 heures
Exactitude relative : AC %	99,36	99,36	98,42
Spécificité relative : SP %	99,37	98,75	99,45
Sensibilité relative : SE %	99,36	100	97,45

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

La sensibilité a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Réponse	Méthode alternative (SE %) (PA + PD) / (PA + PD + ND) =	Méthode de référence (SE %) (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
<i>L.monocytogenes</i> (24 heures)	99,40%	99,40%
<i>L.monocytogenes</i> (48 heures)	100%	98,74%
<i>L. spp</i> (24 heures)	97,46%	99,49%

Analyse des discordants (selon l'annexe F de la norme NF EN ISO 16140) :

Réponse *L. spp* (24 heures) :

PD = 1, ND = 5, Y = PD + ND = 6 ; $6 \leq Y \leq 22$, m=1, M=0, donc m>M : Equivalence

Conclusion

Les performances de la méthode ALOA® ONE DAY apparaissent équivalentes à celles de la méthode de référence.

Les résultats obtenus par la méthode ALOA® ONE DAY avec lecture à 24 heures et lecture à 48 heures sont équivalents.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2004, 2005 et 2010 sur les 7 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits de la mer, produits végétaux, produits laitiers, échantillons d'environnement.

Les produits ont été analysés 6 fois, par les deux méthodes, à 4 niveaux de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>L. monocytogenes</i> LM1	0,5 [0,4 – 0,7]	0,5 [0,4 – 0,7]
Rillettes	<i>L. welshimeri</i>	0,5 [0,3 – 0,7]	0,5 [0,3 – 0,7]
Saumon	<i>L. monocytogenes</i> LM16	0,5 [0,4 – 0,7]	0,5 [0,4 – 0,7]
Salade	<i>L. monocytogenes</i> LM42	0,4 [0,3 – 0,5]	0,4 [0,3 – 0,5]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> LM17	0,5 [0,4 – 0,8]	0,5 [0,4 – 0,8]
Chiffonnettes	<i>L. monocytogenes</i> LM12	0,5 [0,4 – 0,7]	0,5 [0,4 – 0,7]
Eau de process	<i>L.innocua</i>	0,4 [0,3 – 0,6]	0,4 [0,3 – 0,6]

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas.

"Hitchins A. Proposed Used of a 50% Limit of detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of presence-Absence Microbial detection Methods, Draft 10th December, 2003"

Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,3 et 0,8 UFC/25 g. Il est identique à celui de la méthode de référence.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Etude réalisée en 2004 :

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 30 souches non *Listeria monocytogenes* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées. Il convient de signaler que certaines colonies de *Listeria ivanovii* présentent un aspect typique avec halo fin au terme des 24 premières heures d'incubation.

Etude réalisée en 2010 :

- 63 souches de *Listeria* spp ont été détectées sur 63 testées.
- L'étude de 32 souches non *Listeria* spp 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** en *Listeria monocytogenes* se fait en 4 à 8 jours (en cas de lecture à 24 heures) ou en 5 à 9 jours (en cas de lecture à 48 heures) avec la méthode ALOA[®] ONE DAY (selon le mode de confirmation utilisé) contre 7 à 11 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **positifs** en *Listeria* spp se fait en 2 à 8 jours (en cas de lecture à 24h) ou en 3 à 9 jours (en cas de lecture à 48h) avec la méthode ALOA[®] One Day (selon le mode de confirmation mis en œuvre , contre 7 à 11 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** (en l'absence de colonies typiques) se fait en 2 jours (en cas de lecture à 24 heures) ou en 3 jours (en cas de lecture à 48 heures) avec la méthode ALOA ONE DAY[™] contre 5 à 11 jours avec la méthode de référence.
- Dans le cas de résultats présumés **positifs** par la méthode alternative, mais rendus **négatifs après confirmation**, les résultats négatifs sont obtenus en 2 à 8 jours (en cas de lecture à 24 heures) ou en 3 à 9 jours (en cas de lecture à 48 heures).

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait de chèvre pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* 4b aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination.

Résultats :

Niveaux de contamination	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités*	Nombre de résultats négatifs		Nombre de résultats positifs	
				REF	ALT	REF	ALT
0	112	112	104	104	104	0	0
1	112	112	104	0	0	104	104
2	112	112	104	0	0	104	104

* Un laboratoire a déclaré avoir mal manipulé. Ses résultats n'ont pas été pris en compte.

Calculs

- L'exactitude relative est de 100 %
- La spécificité est de 100 %
- La sensibilité est de 100 %

Interprétation

Les résultats de l'étude collaborative sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

Degré d'accord : % de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés par le même laboratoire dans des conditions de répétabilité. C'est la moyenne des probabilités que deux répliqués donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Concordance : % de chance de trouver le résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). C'est le % de toutes les paires de répliqués donnant le même résultat.

Odds ratio (COR) : il est défini par la formule suivante :

$$\text{COR} = \frac{\text{degré d'accord} \times (100 - \text{concordance})}{\text{concordance} \times (100 - \text{degré d'accord})}$$

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode alternative** et pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100	100	1
L1	100	100	1
L2	100	100	1

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est identique à celle de la méthode de référence.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org