



**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 10/08 – 12/09**

**Date de validation : 03.12.2009**

**Fin de validité : 03.12.2013**

**La Société**      **AES CHEMUNEX**  
rue Maryse Bastié  
Ker Lann / CS 17219  
F-35172 BRUZ CEDEX

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

**ADIAFOOD *Listeria monocytogenes***

Référence du protocole : ADIAF-LM-Rev.0

**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**

A handwritten signature in black ink, appearing to be "JBESLIN", written over a horizontal line.

**AFNOR Certification**

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France  
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00  
[certification@afnor.org](mailto:certification@afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode ADIAFOOD *Listeria monocytogenes* repose sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel. Le système automatisé permet la détection rapide des *Listeria monocytogenes* en identifiant leur séquence d'ADN en série d'étapes : préparation et enrichissement de l'échantillon, extraction de l'ADN et détection des pathogènes. Le kit est disponible en deux formats : microplaques ou barrettes de tubes.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- A partir des colonies isolées, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification). L'obtention des colonies pourra se faire par isolement de 100µl de bouillon Listerboost enrichi sur milieu sélectif pour *Listeria*. Se référer à la dernière édition de la norme NF EN ISO 7218 pour les modalités de confirmation pouvant être utilisées dans les méthodes normalisées.
- Par isolement de 100 µL de Listerbosst enrichi sur gélose ALOA™.

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

Par exemple, transférer 100 µl de bouillon Listerboost enrichi dans 10 ml de Fraser et poursuivre l'analyse selon les recommandation de la norme NF EN ISO11290-1 en vigueur.

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

Des essais ont été effectués en 2009 sur 320 échantillons de produits dont 77 naturellement contaminés, 80 artificiellement contaminés et 163 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la mer et prélèvements d'environnement.

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

Tableau de résultats (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 = 128 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 14 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 15 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 163 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 4 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

(3) dont 7 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

- Exactitude relative : **AC = 90,9%**
- Spécificité relative : **SP = 92,1%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 89,5%**

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

$$\text{Méthode alternative :} \\ (PA + PD) / (PA + PD + ND) = \mathbf{90,4\%}$$

$$\text{Méthode de référence :} \\ (PA + ND) / (PA + PD + ND) = \mathbf{91,1\%}$$

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

PD = 14 , ND = 15 donc Y = PD + ND = 29 ;

Test de Mc Nemar :  $X^2 = d^2/Y$ , avec  $d = | PD - ND |$  ;  $X^2 = 0,034$  ; donc  $X^2 < 3,841$

### Conclusion

Les deux méthodes sont comparables pour  $\alpha = 0,05$ .

## NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2009, sur les 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la mer et prélèvements 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 <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	0,8 [0,5 – 1,3]	0,8 [0,4 – 1,4]
Lait cru	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	1,6 [1,1 – 2,4]	1,1 [0,8 – 1,7]
Saumon fumé	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	0,5 [0,4 – 0,6]	0,5 [0,4 – 0,6]
Céleri	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	1,1 [0,7 – 1,9]	0,9 [0,6 – 1,3]
Eau de process	<i>Listeria monocytogenes</i> 3a	0,5 [0,3 – 1,0]	0,7 [0,4 – 1,2]

(3) **LOD<sub>50</sub>** : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas

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

## Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,3 et 2,4 UFC/25 g.  
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,4 et 1,7 UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 32 souches non *Listeria monocytogenes* (dont 12 n'appartenant pas au genre *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** se fait en 3 jours avec la méthode alternative contre 8 jours avec la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 5 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 entre 2 et 4 jours selon le protocole choisi.
- **Formation du personnel :** 1 jour de formation pour un opérateur non initié à la méthode.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2009 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé additionné de lait cru, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/ 25 ml
- 3 UFC/ 25 ml
- 30 UFC/ 25 ml

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses au total par laboratoire participant.

### 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	5	4	99	100
2	112	112	104	0	1	104	103

\* Les résultats d'un laboratoire ont été exclus, des échantillons ayant subi des intercontaminations.

## Calculs

- L'exactitude relative est de **97%**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **98%**

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

$$\text{Méthode alternative :} \\ (PA + PD) / (PA + PD + ND) = \mathbf{98\%}$$

$$\text{Méthode de référence :} \\ (PA + ND) / (PA + PD + ND) = \mathbf{98\%}$$

## 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 répliquats 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 répliquats 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** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	93%	92%	1,16
L2	98%	98%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	92%	92%	1,00
L2	100%	100%	1,00

## Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est équivalente 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](http://www.afnor-validation.org)