



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

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

N° attestation : BIO-12/11-03/04

Date de validation :	12.03.2004*
Extension les :	02.12.2004*
	14.12.2006*
Reconduction le:	17.01.2008
Fin de validité :	12.03.2012

La Société bioMérieux  
(siège social) Chemin de l'Orme  
69280 Marcy l'Etoile

\* Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre  
en 2004 pour l'étude préliminaire et en 2006  
pour l'étude interlaboratoire

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

**VIDAS Listeria monocytogenes II (VIDAS LMO 2) – Réf 30704**  
**avec étape d'enrichissement à 37°C**

Référence du protocole : 11600 version (J) et (K)

**DOMAINE D'APPLICATION**

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

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune

**METHODE DE REFERENCE**

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 VIDAS LMO2 est un test immuno-enzymatique permettant la détection d'antigène de *Listeria monocytogenes* par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS ou mini VIDAS. Chaque test se compose de deux éléments :

- Le cône à usage unique servant à la fois de phase solide et de système de pipetage pour le test. L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps anti-*Listeria monocytogenes* adsorbés sur sa surface.
- La cartouche qui contient tous les réactifs prêts à l'emploi nécessaires pour le test : solution de lavage, anticorps anti-*Listeria monocytogenes* conjugués à la phosphatase alcaline et substrat.

La méthode VIDAS LMO2 comprend un enrichissement en bouillon Fraser ½ incubé 24h à 26h à 30°C ± 1°C et un repiquage de 0,1 ml de bouillon Fraser ½ en bouillon Fraser complet incubé 24h à 26h à 37°C ± 1°C, puis le test VIDAS LMO2 est réalisé à partir d'un aliquot de Fraser complet.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test VIDAS LMO2 doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- à partir du bouillon Fraser, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- en utilisant une gélose chromogène, en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique ci-dessus référencée.

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

### **NOTE : Historique de la Validation**

La première validation prononcée en mars 2004 prenait en comparaison la méthode de référence EN ISO 11290-1 (1997).

Des résultats de l'étude de validation de la méthode VIDAS LMO 2 avec enrichissement à 30°C (validée en juillet 2002 sous la référence BIO 12/9-07/02) ont été repris dans l'étude de validation de la méthode avec enrichissement à 37°C, qui fait l'objet de la présente attestation : l'étude d'inclusivité/exclusivité et l'étude de praticabilité. Le reste de l'étude préliminaire a été entièrement refait selon le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140.

En décembre 2004, une extension de Validation a porté sur la comparaison de la méthode VIDAS LMO2(enrichissement à 37°C) à la norme de référence EN ISO 11290-1 incluant l'**amendement A1 (2004)**. Dans la méthode de référence, les milieux PALCAM et OXFORD ont été remplacé par les milieux « Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti » et un second milieu au choix. Les essais d'extension de validation ont été réalisés avec trois milieux : Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti », PALCAM et OXFORD.

En décembre 2006, l'étude interlaboratoire a été entièrement refaite conformément aux exigences de la norme EN ISO 16140, donnant lieu à une deuxième extension de validation.

En décembre 2007, la reconduction de validation a été prononcée, sans réalisation d'essais complémentaires, étant donné que ni la méthode VIDAS LMO2, ni la méthode prise en référence, ni le protocole de validation n'ont été modifiés.

## 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 2004 sur 327 échantillons de produits dont 101 naturellement contaminés, 58 artificiellement contaminés et 168 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Produits laitiers
- Produits végétaux
- Produits carnés
- Produits de la pêche
- Echantillons d'environnement

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

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Les résultats prennent en compte l'utilisation des milieux **ALOA®** et **PALCAM** pour la méthode de référence.

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 155 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 2 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 169 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

Les pourcentages obtenus par rapport à la méthode de référence sont les suivants (calculs effectués selon la norme EN ISO 16140) :

- **Exactitude relative** : 99,1%
- **Spécificité relative** : 98,8%

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

- **Sensibilité relative** : 99,4%

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

Pour la méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,7 \%$$

Pour la méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,4 \%$$

### Conclusion

Les performances de la méthode VIDAS LMO2 apparaissent équivalentes à celles de la méthode de référence.

## NIVEAU DE DETECTION relatif

Comparaison des performances de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2004, sur des combinaisons suivantes produits alimentaires/souches, et pour les catégories suivantes : produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la mer, 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 <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Lait cru	L. monocytogenes 1/2b	0,4 [0,3 – 0,6]	0,4 [0,3 – 0,6]
Rillettes artisanales	L. monocytogenes 1/2c	0,5 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,3 – 0,7]
Chou rouge	L. monocytogenes 4b	0,6 [0,4 – 1,1]	0,6 [0,4 – 1,1]
Saumon fumé	L. monocytogenes 1/2a	0,4 [0,3 – 0,6]	0,4 [0,3 – 0,6]
Eau de process	L. monocytogenes 1/2c	0,8 [0,4 – 1,8]	0,8 [0,4 – 1,8]

(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

Les niveaux de détection obtenus pour la méthode alternative sont identiques à ceux obtenus pour la méthode de référence, et se situent entre 0,3 et 1,8 UFC/25 g.

### INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE [étude réalisée en 2002]

#### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 44 souches non *Listeria* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

### PRATICABILITE [étude réalisée en 2002]

#### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :
  - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 9 à 10 jours avec la méthode VIDAS LMO2 [en incluant la confirmation par les tests classiques de la norme de référence) ou en 3 à 4 jours [confirmations avec une gélose chromogène), contre 5 à 11 jours avec la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode VIDAS LMO2 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 en 9 à 10 jours.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 16 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau 3 UFC / 25ml
- niveau 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	128	112	104	104	104	0	0
1	128	108	104	0	0	104	104
2	128	112	104	0	0	104	104

\*deux laboratoires ont reçu tardivement des échantillons et n'ont pas réalisé les analyses et un laboratoire n'a pas réalisé les analyses pour quatre échantillons car ils étaient fuités.

\*\*au final, les trois laboratoires ont été exclus

### 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.

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

Méthode alternative :

$$[PA + PD] / [PA + PD + ND] = 100\%$$

Méthode de référence :

$$[PA + ND] / [PA + PD + ND] = 100\%$$

### 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 réplicats 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 réplicats donnant le même résultat.

**Odds ratio [COR]** : il est défini par la formule suivante :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

### **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](http://www.afnor-validation.org)