



**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 : BIO 12/18 - 03/06

**Date de validation : 09.03.2006
Date de reconduction : 03.12.2009
Fin de validité : 09.03.2014**

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

**BIOMERIEUX
69280 MARCY L'ETOILE
FRANCE**

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

VIDAS LDUO

Référence du protocole : 13282 version I

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.

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

**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

Le test VIDAS LDUO est un test immunoenzymatique permettant la détection simultanée et différenciée d'antigènes de *Listeria monocytogenes* et d'antigènes de *Listeria* par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS.

Le cône à usage unique sert 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* et d'anticorps anti-*Listeria* adsorbés sur sa surface. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la cartouche. Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement. Lors de l'étape finale de révélation, la fluorescence émise est mesurée par l'instrument qui fournit deux valeurs de test pour chaque échantillon.

Dans le cadre de la marque AFNOR Validation, tous les échantillons positifs à l'issue du test VIDAS LDUO doivent être confirmés à partir du bouillon LX non chauffé conservé à 2-8°C, de l'une des manières suivantes:

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) en suivant le protocole indiqué par le fabricant.
Il est possible de réaliser une galerie API sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée sur la gélose sélective (testé dans l'étude de validation).
- dans le cas d'une détection de *Listeria monocytogenes* : en utilisant une gélose chromogène issue d'une méthode validée AFNOR. La présence de colonies caractéristiques de *L. monocytogenes* après isolement du bouillon LX suffit dans ce cas à confirmer la présence de *L. monocytogenes*.

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

NOTE 1

La méthode VIDAS LDUO permettant la détection simultanée de *Listeria monocytogenes* et *Listeria spp*, deux réponses sont apportées par le test : présence ou absence de *L. monocytogenes* (DLMO) et présence ou absence de *Listeria spp* (DLIS).

Pour l'étude de validation, le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140 a donc été adapté à la double détection de la méthode VIDAS LDUO.

NOTE 2 (Historique de validation)

En décembre 2009, la reconduction de validation a été prononcée, sans réalisation d'essais complémentaires, étant donné que ni la méthode VIDAS LDUO, 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 2005 sur 466 échantillons de produits dont 171 naturellement contaminés, 109 artificiellement contaminés et 186 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

produits carnés, produits végétaux, produits laitiers, produits de la pêche, prélèvements d'environnement.

Sur 280 échantillons positifs (naturellement ou artificiellement contaminés), 113 échantillons contenaient *L. monocytogenes* seule, 65 échantillons contenaient *L. monocytogenes* en mélange, et 102 échantillons contenaient des *Listeria* autres que *L. monocytogenes*.

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

Tableaux de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

Réponse *Listeria spp* (DLIS) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 239 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 26 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 15 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 186 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (3) dont aucun échantillon présumé positif par VIDAS LDUO, négatif après confirmation

Réponse *Listeria monocytogenes* (DLMO) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 155 ⁽¹⁾	Déviations positive A+ / R- PD = 16 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- a) NA = 288 ⁽³⁾ b) NA = 186 ⁽³⁾

a) en considérant les échantillons contenant des *Listeria* autres que *monocytogenes* comme des résultats négatifs

b) en éliminant tous les résultats provenant d'échantillons ne contenant que des *Listeria* autres que *monocytogenes* afin de rétablir l'équilibre entre échantillons positifs et négatifs

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par VIDAS LDUO (DLMO positif), négatif après confirmation

(3) dont 1 échantillon négatif en méthode de référence et négatif dans la réponse DLMO du test, mais positif dans la réponse DLIS avec isolement de *L. monocytogenes* à partir du bouillon LX

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

	Réponse <i>L. spp</i> (DLIS)	Réponse <i>L.monocytogenes</i> (DLMO)
Exactitude relative : AC %	91,2	93,7
Spécificité relative : SP %	87,7	92,1
Sensibilité relative : SE %	94,1	95,7

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) :

	Méthode alternative (SE %)	Méthode de référence (SE%)
Réponse DLIS <i>L. spp</i>	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 94,6$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 90,7$
Réponse DLMO <i>L.monocytogenes</i>	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,1$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 91,0$

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

	Y= PD + ND	d minimal	d = PD - ND	Conclusion
Réponse DLIS <i>L. spp</i>	Y = 41 donc Y>22	13	11	équivalence
Réponse DLMO <i>L.monocytogenes</i>	Y = 23 donc Y>22	10	9	équivalence

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

Le nombre d'échantillons discordants est lié en partie au fait que le bouillon d'enrichissement primaire n'est pas le même pour la méthode de référence et pour la méthode VIDAS LDUO.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2005, sur les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments :

produits carnés, produits végétaux, produits laitiers, produits de la pêche, 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 ₅₀ ⁽³⁾ avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,6 [0,4 - 0,9]	0,5 [0,3 - 0,8]
Lait cru	<i>L. innocua</i>	1,4 [0,8 - 2,5]	1,3 [0,7 - 2,5]
Rillettes	<i>L. welshimeri</i>	0,6 [0,3 - 1,0]	0,5 [0,3 - 0,9]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,7 [0,4 - 1,3]	0,7 [0,4 - 1,3]
Chou rouge	<i>L. monocytogenes</i> 4b	0,4 [0,3 - 0,7]	0,5 [0,3 - 1,0]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	0,8 [0,5 - 1,3]	0,6 [0,5 - 0,8]

(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

Globalement, le niveau de détection de la méthode alternative est identique à celui de la méthode de référence. Il se situe entre 0,3 et 2,5 cellules par 25 grammes.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées par le test VIDAS LDUO (réponse DLMO) sur 50 testées.
- 30 souches de *Listeria* autres que *monocytogenes* ont été détectées par le test VIDAS LDUO (réponse DLIS) sur 30 testées et ont répondu négativement dans la réponse DLMO.
- L'étude de 31 souches non *Listeria* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées, aussi bien en réponse DLMO qu'en réponse DLIS.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** en *Listeria spp* avec la méthode alternative se fait en 4 à 5 jours (si confirmation avec galeries API) jusqu'à 10 jours (si confirmation par les tests classiques), contre 7 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **positifs** en *Listeria monocytogenes* avec la méthode alternative se fait en 3 à 4 jours (si confirmation avec isolement sur gélose chromogène) jusqu'à 10 jours (si confirmation par les tests classiques), contre 7 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours 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 en 3 à 4 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 17 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau 3 cellules/ml
- niveau 30 cellules/ml

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

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	136	120	120	120	120	0	0
1	136	120	120	5	4	115	116
2	136	120	120	0	0	120	120

REF : méthode de référence

ALT : méthode alternative

* Un laboratoire a reçu les échantillons hors délai et n'a pas réalisé les analyses.

* Un autre laboratoire n'a pas réalisé les analyses suite à un problème de mise à jour du logiciel Vidas.

Calculs

- L'exactitude relative est de **97,5 %**
- le % de spécificité est de **100% pour la méthode alternative et pour la méthode de référence**
- le % de sensibilité est de **98,3% pour la méthode alternative et de 97,9% pour la méthode de référence**

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire 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 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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	94%	94%	1,01
L2	100%	100%	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	93%	92%	1,01
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