



**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 12/27 – 02/10

Date de validation : 04.02.2010

Fin de validité : 04.02.2014

La Société **BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
F-69280 MARCY L'ETOILE

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

VIDAS® *Listeria monocytogenes* Xpress (VIDAS LMX)
Ref. 30 123

Référence du protocole : 14226 C

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 - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

VIDAS® LMX est un test immunoenzymatique, permettant la détection d'antigènes de *Listeria monocytogenes* par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS®.

Le kit se compose d'un cône (SPR®) à usage unique qui sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps anti-*Listeria monocytogenes* adsorbés sur sa surface. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et sont pré-répartis dans une cartouche.

Deux protocoles d'enrichissement ont été validés :

- Un protocole général permettant l'analyse de tous les produits d'alimentation humaine et des échantillons d'environnement à l'exception des fromages au lait cru,
- Un protocole spécifique permettant l'analyse des fromages au lait cru.

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 :

- Procéder à un isolement sur une gélose chromogène. Incuber la gélose selon les recommandations de la notice technique. Identifier de 1 à 5 colonies caractéristiques selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- L'utilisation d'une gélose chromogène faisant partie d'une méthode certifiée AFNOR VALIDATION sans identification des colonies caractéristiques. La présence de colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* après isolement du bouillon LMX suffit à confirmer le résultat positif.
- Sur gélose chromogène de type Ottaviani et Agosti, la confirmation des colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* par réalisation d'une galerie API® peut être faite sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée.

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 (cf. notice technique du fabricant pour les alternatives de confirmation).

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 384 échantillons de produits dont 110 naturellement contaminés, 80 artificiellement contaminés et 194 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, produits végétaux 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 = 153 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 19 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 18 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 194 ⁽³⁾

(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 :

- Exactitude relative : **AC = 90,4%**
- Spécificité relative : **SP = 91,1%**

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) :

$$\begin{aligned} & \text{Méthode alternative :} \\ & (PA + PD) / (PA + PD + ND) = 90,5\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Méthode de référence :} \\ & (PA + ND) / (PA + PD + ND) = 90,0\% \end{aligned}$$

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

$$Y = PD + ND = 37 ; Y > 22 ;$$

$$\text{Test de Mc Nemar : } d = |PD - ND| = 1 ; \quad d_{\text{minimal}} = 12 ; \quad d < d_{\text{minimal}}$$

Conclusion

Les méthodes sont considérées équivalentes.

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 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits carnés, produits laitiers (dont fromages au lait cru), 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 ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>L.monocytogenes</i> 1/2b	1,1 [0,6 – 1,8]	0,7 [0,4 – 1,3]
Lait cru	<i>L.monocytogenes</i> 1/2b	0,4 [0,2 – 0,7]	0,5 [0,3 – 0,9]
Fromage au lait cru	<i>L.monocytogenes</i> 1/2a	0,6 [0,4 – 1,0]	0,7 [0,4 – 1,3]
Chou rouge râpé	<i>L.monocytogenes</i> 4b	0,6 [0,4 – 1,0]	0,5 [0,3 – 0,8]
Saumon fumé	<i>L.monocytogenes</i> 1/2a	0,4 [0,2 – 0,7]	0,5 [0,2 – 0,9]
Eau de process	<i>L.monocytogenes</i> 1/2c	0,3 [0,2 – 0,6]	0,4 [0,2 – 0,7]

(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 Use 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 0,2 et 1,8 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 60 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 60 testées.
- L'étude de 31 souches non *Listeria monocytogenes* a montré des réactions croisées avec 1 souche de *Bacillus sphaericus* et 2 souches de *Staphylococcus* (*S. intermedius* et *S.aureus*) enrichies en bouillon non sélectif. Pour ces 3 souches non cibles, les valeurs de test (VT) étaient proches du seuil et les taux d'inoculation élevés. Ces trois souches ont donné un résultat négatif lorsqu'elles ont été cultivées dans le bouillon sélectif de la méthode.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 à 8 jours avec la méthode alternative contre 4 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 4 à 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 2 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2009 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 :

- 0 UFC/25ml
- 3 UFC/25ml
- 22 UFC/25

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	120	96	96	96	0	0
1	128	120	96	0	0	96	96
2	128	120	96	1	5	95	91

* Un laboratoire n'a pas réalisé les essais.

** Les résultats de trois laboratoires n'ont pas été exploités pour cause de réception tardive des échantillons.

Calculs

- L'exactitude relative est de 98,6%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 97,4%

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire 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 :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,9\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$

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%	1,00
L1	100%	100%	1,00
L2	94%	89,8%	1,79

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	100%	100%	1,00
L2	98%	97,9%	1,15

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