



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 12/4 – 02/95

Date de validation :	23.03.1999
Date de 1 <sup>ère</sup> reconduction :	18.01.1999
Date de 2 <sup>nde</sup> reconduction :	06.02.2003
Date de 3 <sup>ième</sup> reconduction* :	02.02.2007
Fin de validité :	07.02.2011

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

La Société

BioMérieux SA  
69280 Marcy l'Etoile

Site de  
production

GEN-PROBE Inc.  
San Diego, CA 92121 (USA)

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

**ACCUPROBE *Listeria monocytogenes***

Référence du protocole : bioMérieux réf. 39500/Gen-Probe Cat. No. 2920 référence 103051F-01 Rev B

**DOMAINE D'APPLICATION**

Produits d'alimentation humaine et prélèvements d'environnement

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune

**METHODE DE REFERENCE**

EN ISO 11290-1 incluant l'amendement A1 (2004) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : Méthode de recherche - (février 1997).

Le Directeur Général Délégué  
Jacques BESLIN

**AFAQ AFNOR Certification**

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France

Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France

Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40

[certification@afaq.afnor.org](mailto:certification@afaq.afnor.org) - [www.afnor.fr](http://www.afnor.fr)

## PRINCIPE DE LA METHODE

Après une phase d'enrichissement en bouillon Fraser demi suivie d'un isolement sur gélose Palcam ou Oxford, le test ACCUPROBE permet la détection de *Listeria monocytogenes* par un test d'hybridation moléculaire. La détection des complexes ARN-ADN formés et marqués se fait par émission de photons détectés à l'aide d'un luminomètre.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés. La confirmation est réalisée :

- A partir du milieu d'isolement (gélose Palcam ou Oxford), par la mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification),
- par isolement sur une gélose chromogénique de formulation OAA, ou sur une gélose chromogénique issue d'une méthode bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION selon les prescriptions de la notice du fabricant (les milieux chromogènes ALOA<sup>®</sup>, Compass, CHROMagar, OAA et Rapid L'mono ont été utilisés pour l'étude de validation)
- Par l'utilisation de toute autre méthode validée AFNOR, de principe différent de celui de la méthode ACCUPROBE. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble.

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.

## 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 2006 sur 346 échantillons de produits dont 113 naturellement contaminés, 56 artificiellement contaminés et 177 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

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

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

Tableau de résultats obtenus avec la gélose Palcam (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 157 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 8 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 3 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 178 <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 3 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, non confirmés

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

- Exactitude relative : **AC = 96,8%**
- Spécificité relative : **SP = 95,7%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 98,1%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 98,2\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 95,2\%$$

Tableau de résultats obtenus avec la gélose Oxford pour les produits laitiers et avec la gélose Palcam pour les autres produits (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 156 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 8 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 178 <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 3 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, non confirmés

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

- Exactitude relative : **AC = 96,5%**
- Spécificité relative : **SP = 95,7%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 97,5%**

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

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,6\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 95,2\%$$

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

Pour les résultats obtenus avec la gélose Palcam :

$$PD = 8, ND = 3 \text{ donc } Y = PD + ND = 11 ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 3, M = 1 \quad \text{donc } m > M$$

Pour les résultats obtenus avec la gélose Oxford pour les produits laitiers et avec la gélose Palcam pour les autres produits :

$$PD = 8, ND = 4 \text{ donc } Y = PD + ND = 12 ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 4, M = 2 \quad \text{donc } m > M$$

### Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

## NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2006, 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 et divers, 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 :

		Niveau de détection relatif LOD <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	Listeria monocytogenes 1/2	0,5 [ 0,3 – 0,7 ]	0,5 [ 0,3 – 0,7 ]
Saumon fumé	Listeria monocytogenes 1/2a	0,2 [ 0,1 – 0,5 ]	0,2 [ 0,1 – 0,5 ]
Végétaux crus	Listeria monocytogenes 1/2	0,3 [ 0,1 – 0,6 ]	0,3 [ 0,1 – 0,6 ]
Lait cru	Listeria monocytogenes 4b	1,2 [ 0,3 – 5,2 ]	1,2 [ 0,3 – 5,2 ]
Eau de process	Listeria monocytogenes	0,5 [ 0,2 – 1,2 ]	0,5 [ 0,2 – 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 et de la méthode de référence se situe entre 0,3 et 5,2 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 30 souches non *Listeria monocytogenes* 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 à 6 jours avec la méthode alternative contre 11 à 12 jours avec la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 à 4 jours avec la méthode alternative contre 2 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 3 à 6 jours

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* 4b aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC / 25 ml
- 1 – 10 UFC / 25 ml
- 5 – 50 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	104	104	79**	79**	79**	0	0
1	104	104	80	0	0	80	80
2	104	104	80	0	0	80	80

\* Les résultats de trois laboratoires n'ont pas été retenus dans l'interprétation :

- un laboratoire n'a pas respecté le protocole de la méthode alternative.
- deux laboratoires ont obtenu des résultats positifs par la méthode alternative après 48h d'enrichissement. Une intercontamination a été suspectée.

\*\* Un laboratoire a analysé seulement 7 échantillons à ce niveau (un sac était percé à réception).

### 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 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%	98,8%	1,01
L1	100%	100%	1,00
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%	98,8%	1,01
L1	100%	100%	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 AFAQ AFNOR Certification  
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition  
un document de synthèse des études préliminaire et collaborative