



**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 12/09-07/02

Date de validation :	03.07.2002
Dates de reconduction:	15.06.2006*
	21.05.2010
Extension le :	14.12.2006*
Fin de validité :	03.07.2014

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

BIOMERIEUX
69280 MARCY L'ETOILE
FRANCE

** Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2006 lors de la reconduction pour l'étude préliminaire et lors de l'extension 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 30°C**

Référence du protocole : 11600 version (K)

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine (sauf produits crus) et échantillons 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 en 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 1 ml dans 10 ml de bouillon Fraser complet incubé 24h à 26h à 30°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 :

- A partir du bouillon d'enrichissement 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 les tests décrits ci-dessus), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

Note : Historique de validation

1) Par rapport à la première validation (2002), l'étude préliminaire a été partiellement refaite pour prendre en compte le protocole de validation décrit dans la norme EN ISO 16140. Certains résultats obtenus lors de la précédente étude ont été conservés. Il s'agit des résultats de :

- L'étude d'exactitude / spécificité / sensibilité relative (refaite partiellement)
- L'étude d'inclusivité/exclusivité et l'étude de praticabilité

L'étude interlaboratoire réalisée en 2002 n'a pas été refaite.

2) L'extension de Validation de décembre 2006 concerne l'étude interlaboratoire qui a été entièrement refaite conformément aux exigences de la norme EN ISO 16140, et dont les résultats sont disponibles dans cette attestation.

3) En mai 2010, la reconduction de la méthode VIDAS LMO2 a été validée sans essais complémentaires, puisque depuis la dernière validation, la méthode alternative n'a pas été modifiée et la méthode de référence et le protocole de validation n'ont pas changé.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative

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

Les résultats obtenus en 2002 ont été conservés pour 60 résultats négatifs et 43 résultats positifs provenant d'échantillons naturellement contaminés. L'étude a été complétée en 2006 pour obtenir le nombre requis d'échantillons et les résultats ont été interprétés selon la norme EN ISO 16140.

Au total, 361 échantillons de produits dont 63 naturellement contaminés, 93 artificiellement contaminés et 205 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés non crus, produits laitiers non crus, produits de la pêche non crus, produits végétaux non crus, prélèvements 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) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 148 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 3 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 205 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (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 = 97,6%**
- Spécificité relative : **SP = 96,7%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 98,3%**

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 :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,8\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,1\%$

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

PD = 3, ND = 5 donc $Y = PD + ND = 8$; $6 \leq Y \leq 22$ $m=3, M=0$ 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 carnés non crus, produits laitiers non crus, produits de la pêche non crus, produits végétaux non crus, 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 pasteurisé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 b	0,8 [0,4 - 1,3]	0,8 [0,4 - 1,3]
Rillettes	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 c	0,7 [0,4 - 1,2]	0,7 [0,4 - 1,2]
Poêlée de légumes	<i>L. monocytogenes</i> 4 b	0,4 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,3 – 0,7]
Poisson pané	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 a	0,6 [0,4 – 0,9]	0,6 [0,4 – 0,9]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2 c	0,6 [0,3 – 1.2]	0,6 [0,3 – 1.2]

(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 est identique à celui de la méthode de référence. Il se situe entre 0,3 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE (étude 2002)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 43 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 **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode VIDAS LMO2 contre 5 jours avec la méthode de référence.
 - 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 3-4 jours (confirmations avec une gélose chromogène) contre 5 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - Les résultats **positifs** avec le test VIDAS LMO2 avec confirmation **négative** par la méthode de référence sont obtenus en 3 jours (si utilisation d'une gélose chromogène) à 10 jours (avec la méthode de référence) selon le mode de confirmation utilisé.

ETUDE INTERLABORATOIRE (selon la norme EN ISO 16140)

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	0	0	104	104
1	128	108	104	0	0	104	104
2	128	112	104	104	104	0	0

*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** et 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