



**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 12/2 – 06/94**

<b>Date de validation :</b>	<b>17.06.1994</b>
<b>Dates de reconduction :</b>	09.06.1998
	03.07.2002
	04.05.2006*
	21.05.2010
<b>Fin de validité :</b>	<b>09.06.2014</b>

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

**BIOMERIEUX  
69280 MARCY L'ETOILE  
FRANCE**

*\*Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la 3<sup>ème</sup> reconduction en 2006*

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

**VIDAS LISTERIA (VIDAS LIS) – Ref. 30 700**

Références du protocole : **06745** versions R et S

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement.

**RESTRICTIONS**

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**



**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

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

## PRINCIPE DE LA METHODE

Le test VIDAS LIS est un test immuno-enzymatique permettant la détection d'antigènes *Listeria* par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS ou mini VIDAS.

Chaque test se décompose en deux éléments :

- le cône à usage unique, servant à la fois de base solide et de système de pipetage pour le test. L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps anti *Listeria* 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* conjugués à la phosphatase alcaline, substrat.

La méthode VIDAS LIS comprend un enrichissement en bouillon Fraser ½ incubé **20h à 26h** à  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  et un repiquage de 1 ml dans 10 ml de bouillon Fraser complet incubé **20h à 26h** à  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , puis le test VIDAS LIS est réalisé à partir d'un aliquot de Fraser complet chauffé  $15 \pm 1$  minutes à  $95\text{-}100^{\circ}\text{C}$ .

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test VIDAS doivent être confirmés à 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 cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

### NOTE (historique de validation)

Dans le cadre de l'étude de reconduction de 2006, la méthode alternative n'avait pas été modifiée depuis la reconduction délivrée en 2002 et l'extension en 2003. Le protocole de validation ayant changé (utilisation du protocole EN ISO 16140 pour la reconduction) et la méthode de référence EN ISO 11290-1 ayant subi un amendement, l'étude de validation a été refaite, à l'exception de l'étude de praticabilité de 1998. Egalement, des données obtenues en 2003 pour l'étude d'Exactitude/Spécificité/Sensibilité relatives ont été conservées et complétées.

En mai 2010, la reconduction de la méthode VIDAS LIS 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 (études de 2003 et 2006)

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

En 2003, des essais ont été effectués sur 135 échantillons de produits, en comparaison avec la méthode de référence utilisant les milieux Palcam et Oxford. Parmi ces 135 échantillons, 73 étaient naturellement contaminés et 62 étaient non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits végétaux, produits de la pêche, échantillons d'environnement.

Des essais ont été effectués en 2006 sur 202 échantillons de produits dont 55 naturellement contaminés, 37 artificiellement contaminés et 110 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits végétaux, produits de la pêche, échantillons d'environnement.

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

Le tableau ci-dessous exploite les résultats combinés des deux études.

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 = 162 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 1 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 172 <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 1 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 = 99,1%**
- Spécificité relative : **SP = 99,4%**
- Sensibilité relative : **SE = 98,8%**

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 :

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

Méthode de référence :

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

## 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 de la mer, produits végétaux et 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	<i>L. innocua</i>	1,1 [0,6 - 1,9]	1,1 [0,6 - 1,9]
Rillettes	<i>L. welshimeri</i>	0,7 [0,4 - 1,4]	0,7 [0,4 - 1,4]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,9 [0,6 - 1,5]	0,9 [0,6 - 1,5]
Chou rouge	<i>L. monocytogenes</i> 4b	0,7 [0,4 - 1,4]	0,7 [0,4 - 1,4]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	1,0 [0,8 - 1,3]	1,0 [0,8 - 1,3]

(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 est le même que celui de la méthode de référence. Il se situe entre 0,4 et 1,9 UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 51 souches de *Listeria* (25 souches de *L. monocytogenes* et 26 *Listeria non monocytogenes*) ont été détectées sur 51 testées.
- L'étude de 30 souches non *Listeria* 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 5 jours avec la méthode alternative (si confirmation avec galeries API après purification) ou 10 jours (si confirmation par les tests classiques) contre 9 à 12 jours avec la méthode de référence.
 

NB : Si l'on ne confirme que le genre *Listeria*, une coloration de GRAM et une catalase peuvent suffire et le résultat *Listeria* genre, sans identification de l'espèce est obtenu en 4 jours.
  - 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 5 jours.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 15 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria innocua* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (3 bactéries/ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 bactéries/ml)

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination.

### 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	120	112	112	112	112 <sup>(1)</sup>	0	0
1	120	112	112	13	13	99	99
2	120	112	112	0	0	112	112

\*Un laboratoire n'a pas reçu les échantillons dans les délais et n'a donc pas réalisé les analyses.  
(1) dont un échantillon positif par le test VIDAS LIS, négatif après confirmation.

### Calculs

- L'exactitude relative est de **100 %**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **94,2%**

## Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire pour **l'exactitude relative** et la **spécificité**. La valeur de **sensibilité** obtenue lors de l'étude interlaboratoire est plus faible que celle obtenue lors de l'étude préliminaire. Ceci est dû au fait que la sensibilité est calculée par rapport aux résultats attendus et que certains échantillons contaminés au niveau 1 se sont révélés non contaminés (ces résultats étaient concordants entre la méthode VIDAS LIS et la méthode de référence)

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

$$\text{Méthode alternative :} \\ (PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

$$\text{Méthode de référence :} \\ (PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

### 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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	82%	79%	1,03
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	82%	79%	1,03
L2	100%	100%	1,00

Les pourcentages de degrés d'accord et de concordance pour le niveau 1 sont dus au fait que certains échantillons se sont révélés non contaminés (ces résultats étaient concordants entre la méthode VIDAS LIS et la méthode de référence).

## 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)