



**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 : BRD 07/04 – 09/98

Date de validation :	15.09.1998
Dates d'extension :	07.09.1999 25.09.2008
Dates de reconduction :	28.11.2002 15.09.2006*
Fin de validité :	01.07.2010 15.09.2014

* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2006 lors de la 2^{ème} reconduction

La Société **BIO-RAD**
(siège social) 3 Boulevard Raymond Poincaré
 92430 MARNES LA COQUETTE

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

RAPID'L.MONO
Méthode de recherche

Référence du protocole : RAPID'L.mono (356-3694 et 355-5294) V11

DOMAINE D'APPLICATION

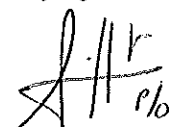
Tous produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement.

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

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode permet d'effectuer un étalement-isolément sur un seul milieu (RAPID'*L.mono*), après un enrichissement primaire de l'échantillon.

Le milieu RAPID'*L.mono* est un milieu de culture gélosé, permettant une détection de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria spp*, sur la base de la révélation chromogénique spécifique de l'activité PIPLC (Phosphatidyl Inositol Phospholipase C) chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*, qui forment des colonies bleues et chez les autres espèces de *Listeria* qui forment des colonies blanches.

La fermentation du xylose permet de différencier *L. ivanovii* (xylose + : présentant un halo jaune autour de la colonie) de *L. monocytogenes* (xylose - : ne présentant pas de halo autour de la colonie).

Dans le cadre de la marque AFNOR Validation, tous les échantillons positifs à l'issue du test RAPID'*L.mono* doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

Confirmation des résultats positifs *Listeria monocytogenes* :

1. en réalisant les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir des colonies isolées sur RAPID'*L.mono*
2. par l'utilisation de sondes nucléiques tel que prévu dans la norme EN ISO 7218 à partir des colonies isolées (avec ou sans l'étape de purification)
3. en effectuant un repiquage par spot d'une colonie isolée sur une gélose Agar *Listeria* selon Ottaviani & Agosti, directement à partir de RAPID'*L.mono* (se référer à la notice technique du fabricant pour les conditions à respecter)
4. par mise en œuvre du test Rhamnose
5. par une autre méthode certifiée AFNOR Validation, de principe différent du test RAPID'*L.mono* (se référer à la notice technique du fabricant pour les conditions à respecter).

Confirmation des résultats positifs *Listeria* autres que *Listeria monocytogenes* :

1. en réalisant les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO, à partir des colonies isolées sur RAPID'*L.mono*
2. par l'utilisation de sondes nucléiques tel que prévu dans la norme EN ISO 7218 à partir des colonies isolées (avec ou sans l'étape de purification)
3. en utilisant une galerie d'identification miniaturisée à partir des colonies isolées sur RAPID'*L.mono*
4. par une autre méthode certifiée AFNOR Validation, de principe différent du test RAPID'*L.mono* (se référer à la notice technique du fabricant pour les conditions à respecter).

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE (Historique de validation)

Lors de l'étude de reconduction réalisée en 2006, la formule du milieu RAPID'*L.mono* a été modifiée et l'utilisation des géloses a été étendue à la recherche des *Listeria spp*. La méthode de référence a été modifiée (ajout de l'amendement A1) et le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140 a été appliqué.

La quasi intégralité de l'étude a été refaite sauf pour quelques résultats repris dans l'étude d'exactitude et l'étude d'exclusivité.

L'étude d'extension conduite en septembre 2008 a permis de valider un nouveau test de confirmation : le Test Rhamnose. Les résultats sont conformes à ceux attendus.

La reconduction de la méthode Rapid'*L.mono* a été validée en juillet 2010 sans essais complémentaires. 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

Réponse *Listeria monocytogenes* (après 22 heures d'incubation)

Des essais ont été effectués en 2002 et 2006 sur 483 échantillons de produits dont 202 naturellement contaminés, 47 artificiellement contaminés et 234 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la pêche, 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 = 239 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 4 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 235 ⁽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** = 98.1%
- Spécificité relative : **SP** = 98.3%

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

- Sensibilité relative : **SE** = 98.0%

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 98.0\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98.4\%$$

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

PD = 4, ND = 5 donc Y = PD + ND = 9; $6 \leq Y \leq 22$ m = 4, M = 1 donc m > M

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

Réponse *Listeria* autres que *monocytogenes* (après 48 heures d'incubation)

Des essais ont été effectués en 2006 sur 420 échantillons de produits dont 99 naturellement contaminés, 87 artificiellement contaminés et 234 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la pêche, 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 = 174 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 5 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 234 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 7 échantillons présumés positifs par la méthode alternative après 48 heures d'incubation, négatifs après confirmation

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

- Exactitude relative : **AC = 97.1%**
- Spécificité relative : **SP = 97.9%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 96.1%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96.2\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 97.3\%$$

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

PD = 5, ND = 7 donc Y = PD + ND = 12; $6 \leq Y \leq 22$ m = 5, M = 2 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 7 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments :

Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la pêche 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(s)	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> 1/2c	0,7 [0,4 - 1,2]	0,7 [0,4 - 1,2]
	<i>L. welshimeri</i>	0,7 [0,4 - 1,0]	0,7 [0,4 - 1,0]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,4 [0,2 - 0,8]	0,4 [0,2 - 0,8]
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	0,9 [0,5 - 1,6]	0,6 [0,3 - 1,2]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	0,3 [0,2 - 0,4]	0,3 [0,2 - 0,4]
	<i>L. innocua</i>	0,6 [0,3 - 1,1]	0,6 [0,3 - 1,1]

(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

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,2 et 1,6 UFC/25 g.

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

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE) 1998, 1999, 2006 et 2008

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Etudes d'inclusivité (réalisées en 2006 et 2008) :

- 200 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 200 testées.
- 82 souches de *Listeria autres que monocytogenes* ont été détectées sur 82 testées.

Etudes d'exclusivité (réalisées en 1998, 1999 et 2008)

- 100 souches d'autres genres ont été testées et aucune réaction typique de *Listeria monocytogenes* (colonies bleues sans halo jaune) n'a été observée, même avec des souches ayant été répertoriées dans la bibliographie comme ayant une activité PIPLC : *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*.
- Lors des essais d'exactitude réalisés en 2006, quelques souches ont été identifiées car elles avaient des aspects de colonies proches des *Listeria* autres que *monocytogenes* : il s'agissait de *Bacillus*, *Enterococcus faecium*, *Oeokskovia xanthineolytica*, *Gardnerella vaginalis* et *Lactobacillus*. Néanmoins, ces quelques souches présentent un aspect différent de celui de *Listeria* lors de l'examen de GRAM.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats pour les *Listeria monocytogenes* :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 10 jours (selon le type de confirmation mis en oeuvre) avec la méthode alternative contre 9 à 12 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.
- **Délai d'obtention des résultats pour les *Listeria* autres que *monocytogenes* :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 à 3 jours avec la méthode alternative contre 3 à 6 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 10 jours (selon le type de confirmation mis en oeuvre).

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 sérotype *Listeria monocytogenes* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent

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	120	120	112	112	112	0	0
1	120	120	112	9	9	103	103
2	120	120	112	0	0	112	112

*un laboratoire a mal réalisé les manipulations et ses résultats n'ont pas été exploités.

Calculs

- L'exactitude relative est de **100%**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **96 %**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

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** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	87%	85%	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	87%	85%	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 contaminés se sont révélés non contaminés (ces résultats étaient concordants entre la méthode alternative 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