



**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 07/10 – 04/05

Date de validation :	07.04.2005
Extensions les :	15.12.2006
	28.09.2007
	26.01.2009
	05.02.2010
1 ^{ère} reconduction :	26.03.2009
Fin de validité :	07.04.2013

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

BIO-RAD
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE
FRANCE

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

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (Ref 357-8124)

Référence du protocole : 808464 – Rev.D

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et prélèvements 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**

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

Le test iQ-Check *Listeria monocytogenes* II repose sur l'amplification génique et les détections par la technique PCR en temps réel. Il utilise des amorces et une sonde d'ADN spécifiques de *Listeria monocytogenes*. Après les étapes de préenrichissement (et d'enrichissement si nécessaire), la lyse des bactéries libère l'ADN bactérien, puis les étapes d'amplification et de détection ont lieu dans un thermocycleur. A l'issue de la réaction, une fluorescence est émise et mesurée directement par le thermocycleur. Le logiciel associé à l'appareil analyse les résultats qui sont visualisés sous forme de courbes à interpréter.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode iQ-Check *Listeria monocytogenes* II doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou ISO (en incluant l'étape de purification), après isolement sur géloses sélectives telles que *Listeria* selon Ottaviani et Agosti ou des géloses PALCAM ou Oxford.
- En mettant en œuvre la méthode RAPID'L.mono à partir de l'étape d'enrichissement en bouillon Fraser demi ou en isolant sur gélose RAPID'L.mono à partir de l'étape d'enrichissement en bouillon LSB. En cas de colonies caractéristiques, le résultat iQ-Check sera considéré comme confirmé.
- En mettant en œuvre toute autre méthode certifiée AFNOR Validation de principe différent de la méthode iQ-Check *Listeria monocytogenes* II, et en respectant les instructions décrites dans la notice du test.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé au moyen d'une des trois 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)

1/ L'étude d'extension de décembre 2006 fait suite aux modifications suivantes apportées à la méthode iQ-Check *Listeria monocytogenes* :

- utilisation d'un bouillon spécifique d'enrichissement (bouillon LSB) pour permettre une meilleure revivification des *Listeria*
- introduction d'un protocole de lyse simplifié, s'affranchissant de la première étape de centrifugation.
- modification d'un fluorophore et du réactif de lyse.

Ces nouveaux protocoles sont des alternatives au protocole initialement validé, mettant en œuvre un enrichissement en bouillon Fraser ½ et un protocole de lyse standard.

Pour les produits d'alimentation humaine et les prélèvements d'environnement, une nouvelle étude préliminaire a été réalisée avec les 2 protocoles suivants :

- enrichissement en bouillon LSB puis mise en œuvre du protocole de lyse standard
- enrichissement en bouillon LSB puis mise en œuvre du protocole de lyse simplifié.

Pour les prélèvements d'environnement uniquement, un protocole alternatif supplémentaire a été testé pour la nouvelle étude préliminaire, afin de tenir compte des inhibitions liées à ces produits : enrichissement en bouillon Fraser demi puis bouillon TSB, suivi du protocole de lyse simplifié. Les résultats obtenus en 2004 avec le protocole Fraser demi suivi de la lyse standard ont été conservés.

L'étude interlaboratoire n'a pas été refaite. Elle avait été réalisée en 2005.

2/ Des essais internes complémentaires ont été réalisés en 2007 et examinés par le bureau technique AFNOR VALIDATION, en vue de comparer deux nouveaux thermocycleurs (iQ™5 et MiniOpticon™) avec l'un des thermocycleurs initialement acceptés (Chromo4™).

Ces essais ne sont pas détaillés dans la présente attestation.

Les quatre versions des thermocycleurs (Chromo4™, iCycler iQ™, iQ™5 et MiniOpticon™) sont à présent utilisables dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION.

3/ En janvier 2009, une nouvelle étude a permis d'étendre la validation à l'utilisation d'une nouvelle version du logiciel Opticon Monitor™ intégrant, en plus de la possibilité d'analyse manuelle, une option de retraitement automatique des résultats.

Des tests, effectués en interne et par tierce partie, ont été réalisés à partir du protocole d'enrichissement en bouillon LSB, suivi de la mise en œuvre du protocole de lyse standard. Par ailleurs, toutes les PCR ont été réalisées par Chromo4™, puis traitées en parallèle à la fois par analyse manuelle et par analyse automatique du logiciel Opticon Monitor™.

Les essais ont permis de démontrer que les traitements automatique et manuel des échantillons donnaient les mêmes résultats.

Pour plus de clarté, l'ensemble de ces résultats n'est pas détaillé dans la présente attestation.

4/ En mars 2009, la validation du Test iQ-Check *Listeria monocytogenes* II a été reconduite sans essai complémentaire, le test n'ayant pas été modifié depuis la dernière validation et la méthode de référence restant inchangée.

5/ En février 2010, les extensions suivantes ont été validées par le bureau technique AFNOR VALIDATION :

- Modifications de l'étape d'extraction, avec utilisation d'un nouveau format de consommable plastique « plaque Deepwell » (en plus du format « tube » déjà validé).

Des tests effectués en interne ont permis de conclure que ces modifications n'avaient pas d'impact sur les résultats rendus.

- Utilisation du thermocycleur CFX96™ et son logiciel CFX Manager™, et pilotage du MiniOpticon™ par le logiciel CFX Manager™.

Des essais réalisés en interne ont permis de conclure que les résultats obtenus avec ces nouveaux équipements étaient équivalents à ceux obtenus avec les automates et logiciels déjà validés.

L'ensemble de ces résultats n'apparaît pas dans la présente attestation.

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 2004 sur 343 échantillons de produits dont 123 naturellement contaminés, 38 artificiellement contaminés et 182 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits de la pêche, produits végétaux, prélèvements d'environnement (hors échantillons de production primaire).

Les essais ont été réalisés avec le protocole suivant : Fraser demi suivi d'une lyse standard.

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

Tableau de résultats obtenus avec le Fraser demi + protocole de lyse standard, pour toutes catégories

(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 = 155 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 182 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 9 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Des essais complémentaires ont été effectués en 2006 sur 328 échantillons de produits dont 141 naturellement contaminés, 30 artificiellement contaminés et 157 non contaminés, appartenant aux mêmes grandes catégories d'aliments.

Les essais ont été réalisés avec les deux nouveaux protocoles : bouillon LSB suivi, soit d'une lyse standard, soit d'un lyse avec protocole simplifié.

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

Tableau de résultats obtenus avec le bouillon LSB incubé 22h + protocole de lyse standard, pour toutes catégories

(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 = 138 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 22 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 11 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 157 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 7 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Tableau de résultats obtenus avec le bouillon LSB incubé 24h + protocole de lyse simplifié, pour toutes catégories

(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 = 135 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 21 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 14 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 158 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 4 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Tableau de résultats obtenus avec le bouillon Fraser demi + bouillon TSB + protocole de lyse simplifié, pour la catégorie prélèvements d'environnement

(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 = 30 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 0 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 31 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 2 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

Critères / protocole	Fraser demi + lyse standard	Bouillon LSB 22h + lyse standard	Bouillon LSB 24h + lyse simplifiée	Fraser ½ + TSB + lyse simplifiée
	Tous produits	Tous produits	Tous produits	Prélèvements d'environnement
Exactitude relative : AC	98,3%	89,9%	89,3%	100%
Spécificité relative : SP	98,9%	87,7%	88,3%	100%
Sensibilité relative : SE	97,5%	92,6%	90,6%	100%

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) :

Tous produits	Méthode alternative (PA + PD) / (PA + PD + ND) =	Méthode de référence (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
Fraser ½ + lyse standard	97,5%	98,6%
Bouillon LSB 22h + lyse standard	93,6%	87,1%
Bouillon LSB 24h + lyse simplifiée	91,8%	87,6%

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

Protocole avec Fraser demi + lyse standard

PD = 2, ND = 4, Y = PD + ND = 6

$6 \leq Y \leq 22$, m = 2, M = 0 donc m > M

Protocole avec Bouillon LSB 22h + lyse standard

PD = 22, ND = 11, Y = PD + ND = 33

Selon le test de Mc Nemar : d minimal = 12 ; d = 22-11 = 11

Protocole avec Bouillon LSB 24h + lyse simplifiée

PD = 21, ND = 14, Y = PD + ND = 35

Selon le test de Mc Nemar : d minimal = 12 ; d = 21-14 = 7

Conclusion

Pour les trois protocoles, les tests concluent à une équivalence de résultats entre les deux méthodes.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2004 et 2006, sur les 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits laitiers, produits de la pêche, produits végétaux, prélèvements d'environnement (hors échantillons de production primaire).

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus en 2004 sont les suivants, pour le protocole avec Fraser demi, avec le protocole de lyse standard :

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes artisanales	L. monocytogenes 1/2c	0,7 [0,4 – 1,2]	0,7 [0,4 – 1,2]
Lait cru	L. monocytogenes 1/2b	0,5 [0,3 – 0,8]	0,5 [0,3 – 0,8]
Filets de poisson fumé	L. monocytogenes 1/2a	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]
Produits végétaux crus 4ème gamme	L. monocytogenes 4b	0,9 [0,5 – 1,6]	0,9 [0,5 – 1,6]
Eau de process	L. monocytogenes 1/2c	0,6 [0,3 – 0,8]	0,6 [0,3 – 0,8]

Les résultats obtenus en 2006 sont les suivants, pour les deux protocoles avec bouillon LSB, quelque soit le protocole de lyse mis en oeuvre :

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>Listeria monocytogenes 1/2b</i>	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,9]
Lait cru	<i>Listeria monocytogenes 1/2b</i>	0,6 [0,4 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,8]
Saumon fumé	<i>Listeria monocytogenes 4b</i>	0,4 [0,2 – 0,8]	0,5 [0,3 – 0,8]
Mélange de légumes	<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	0,6 [0,3 – 1,2]	0,6 [0,3 – 1,1]
Eau de process	<i>Listeria monocytogenes 1/2c</i>	0,6 [0,3 – 1,2]	0,6 [0,3 – 1,1]

Les résultats obtenus en 2006 sont les suivants, pour le protocole « prélèvements d'environnement » avec bouillon Fraser ½ puis bouillon TSB, et protocole de lyse simplifié :

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Eau de process	<i>Listeria monocytogenes 1/2c</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 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

Pour le protocole avec Fraser demi suivi d'une lyse standard :

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,2 et 1,6 UFC/25 g. Il est identique à celui de la méthode de référence.

Pour les deux protocoles avec bouillon LSB, quel que soit le protocole de lyse mis en oeuvre :

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

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

Pour le protocole « prélèvements d'environnement » avec bouillon Fraser 1/2 et protocole de lyse simplifié

Le niveau de détection de la méthode alternative est identique à celui de la méthode de référence et se situe entre 0,3 et 1,1 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Essais 2004 avec le protocole Fraser demi + lyse standard :

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 33 souches non *Listeria monocytogenes* a montré une réaction avec une souche d'*Enterococcus faecium* cultivée en bouillon nutritif, mais le passage en bouillon sélectif ne confirme pas ce résultat.

Essais 2006 avec les deux protocoles suivants :

- bouillon LSB + protocole de lyse simplifié
- bouillon Fraser ½ + TSB + protocole de lyse simplifié
- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 36 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 2 jours avec la méthode alternative (après confirmation sur Rapid'L.mono) ou en 9 jours (après confirmation par les tests classiques) contre 9 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en un jour 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 2 jours (si isolement sur RAPID'L.mono) ou jusqu'à 11 jours (si confirmation par les tests classiques)
- **Formation du personnel :** pour les techniciens non formés à la technique PCR, une formation initiale de 4 à 5 jours paraît nécessaire. Dans le cas de techniciens formés aux techniques classiques de microbiologie et de PCR, deux jours de formation sont nécessaires.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2005 avec 15 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *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 pour chacun des laboratoires collaborateurs.

Pour la méthode iQ Check Listeria monocytogenes, le protocole testé est le protocole initialement validé, mettant en œuvre un enrichissement en bouillon Fraser ½ et une lyse standard.

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	111	111	1	1
1	120	112	112	1	2	111	110
2	120	112	112	0	0	112	112

* Un laboratoire n'a pas réalisé l'analyse suite à un problème d'organisation survenu le jour de la réception des échantillons

Calculs

- Exactitude relative : **AC = 99,7 %**
- Spécificité : **SP = 99,1 %**
Le pourcentage de spécificité obtenu est dû à un échantillon retrouvé positif dans un laboratoire par les deux méthodes (méthode de référence et méthode alternative), alors qu'il n'avait pas été contaminé par le laboratoire organisateur.
- Sensibilité : **SE = 99,1 %**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,6\%$$

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	98	98,2	1,00
L1	97	96,5	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	98	98,2	1,00
L1	98	98,2	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 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