



**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 07/12 – 12/06

Date de validation :	15.12.2006
Extension le :	29.03.2007
Reconduction le :	01.07.2010
Fin de validité :	15.12.2014

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

BIO-RAD
3 Bld 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'Listeria spp

Référence du protocole : Rapid'Listeria spp/Gélose (356-3950 et 356-4744) V2

DOMAINE D'APPLICATION

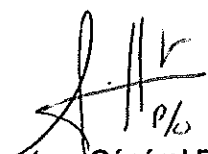
Produits d'alimentation humaine et prélèvements d'environnement.

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**

PRINCIPE DE LA METHODE

Le milieu RAPID'*Listeria* spp est un milieu de culture gélosé, sélectif des *Listeria*. Ce milieu permet de mettre en évidence les *Listeria* spp grâce à la détection de l'activité β -Dglucosidase par un substrat chromogénique. Les colonies caractéristiques sont bleues à bleu vert. La sélectivité du milieu est obtenue par l'action combinée du Chlorure de Lithium et du mélange antibiotique.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs (colonies bleues) à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés, à raison d'au moins une colonie par boîte :

Pour *Listeria monocytogenes* :

- Par les tests décrits dans les méthodes normalisées, sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée (GRAM et catalase).
- Par piqûre sur gélose RAPID'*L.mono* à partir d'une colonie isolée, en parallèle avec une coloration de GRAM et un test catalase.
- Par piqûre sur gélose PALCAM à partir d'une colonie isolée.
- En mettant en œuvre toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode RAPID'*Listeria* spp, et en respectant les instructions décrites dans la notice du test.

Pour *Listeria* spp :

- Par les tests décrits dans les méthodes normalisées, sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée (CAMP test, hémolyse, xylose et rhamnose) ou par l'utilisation d'une galerie miniaturisée.
- Par piqûre sur gélose RAPID'*L.mono* pour confirmer la présence de *Listeria monocytogenes* à partir d'une colonie isolée, lorsque le spot est bleu.
- En mettant en œuvre toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode RAPID'*Listeria* spp, et en respectant les instructions décrites dans la notice du test.

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

NOTE 1

Les géloses RAPID'*Listeria* spp. ont été lues directement après incubation, après prolongation de cette incubation pendant 24 heures supplémentaires, afin de pouvoir proposer une lecture dès 22 heures, mais aussi jusqu'à 48 heures d'incubation.

D'autre part, les bouillons Fraser 1/2 ont été conservés 72 heures à 3°C +/- 2°C, puis re-testés sur milieu RAPID'*Listeria* spp. Ces isollements ont été réalisés sur les échantillons positifs testés lors de l'étude d'exactitude.

En outre, les géloses ont été conservées pendant 48 heures à 3°C +/- 2°C et à nouveau interprétées.

NOTE 2 (historique de validation)

L'étude d'extension réalisée en 2007 a porté sur la validation du test de confirmation par piqûre sur gélose PALCAM pour la confirmation du genre *Listeria*. Cette option de confirmation a été testée pendant l'étude préliminaire et l'étude interlaboratoire de validation. Les compléments d'essais ont été réalisés sur des souches β -D-glucosidase positive non *Listeria* (exclusivité). Les géloses PALCAM ont été interprétées après 24 heures d'incubation à 37°C.

La reconduction de la méthode RAPID'*Listeria* spp 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

Des essais ont été effectués en 2006 sur 360 échantillons de produits dont 143 naturellement contaminés, 49 artificiellement contaminés et 168 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

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

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

Les géloses RAPID'*Listeria* spp. ont été lues directement après incubation, après prolongation de cette incubation pendant 24 heures supplémentaires, afin de pouvoir proposer une lecture dès 22 heures, mais aussi jusqu'à 48 heures d'incubation.

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(22H) = 187 ⁽¹⁾ PA(48H) = 189 ⁽¹⁾	Déviati on positive A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative A- / R+ ND(22H) = 4 ⁽²⁾ ND(48H) = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 168 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont deux échantillons douteux, non confirmés

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

Incubation RAPID' <i>Listeria</i> spp pendant 22H	Incubation RAPID' <i>Listeria</i> spp pendant 48H
Exactitude relative : AC = 98,6%	Exactitude relative : AC = 99,2%
Spécificité relative : SP = 99,4%	Spécificité relative : SP = 99,4%
Sensibilité relative : SE = 97,9%	Sensibilité relative : SE = 99,0%

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) :

Protocole avec incubation des géloses RAPID'*Listeria* spp pendant 22 heures :

Méthode alternative :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,9\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,5\%$

Protocole avec incubation des géloses RAPID'*Listeria* spp pendant 48 heures :

Méthode alternative :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,0\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,5\%$

Conservation des bouillons Fraser 1/2 pendant 72 heures à 3°C +/- 2°C

Suite à la conservation des bouillons Fraser 1/2 pendant 72 heures à 3°C +/- 2°C, des isolements ont été réalisés sur les échantillons positifs testés lors de l'étude d'exactitude.

Les résultats sont équivalents à ceux de la méthode de référence.

Conservation des géloses RAPID' *Listeria* spp pendant 48 heures à 3°C +/- 2°C

Aucune évolution des géloses n'a été observée après conservation de celles-ci pendant 48 heures à 3°C +/- 2°C.

Conclusion

Les performances de la méthode RAPID'*Listeria* spp sont équivalentes à celles de la méthode de référence.

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, 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	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes artisanales	<i>L. welshimeri</i>	0,4 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,2 – 0,6]
Lait cru	<i>L. monocytogenes 1/2b</i> ,	0,8 [0,5 – 1,2]	0,8 [0,5 – 1,2]
	<i>L. ivanovii</i>	0,8 [0,5 – 1,4]	0,8 [0,5 – 1,4]
Produits végétaux crus	<i>L. seeligeri</i>	0,7 [0,4 – 1,1]	0,6 [0,4 – 1,0]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes 1/2a</i>	0,6 [0,3 – 1,1]	0,6 [0,3 – 1,1]
Prélèvements d'environnement	<i>L. innocua</i>	0,9 [0,5 – 1,5]	0,9 [0,5 – 1,5]

(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 et de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 1,5 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE**Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement**

- Sur 50 souches testées (dont 25 de *Listeria monocytogenes* et 25 de *Listeria* autres que *Listeria monocytogenes*), 49 ont été détectées et une souche de *L. ivanovii* n'a pas répondu. Trois autres souches de *L. ivanovii* ont répondu dès 22 heures d'incubation des géloses RAPID'*Listeria* spp.
- Parmi les 66 souches non *Listeria* spp testées (30 souches lors de l'étude de validation, dont 23 β-D-glucosidase positive et 36 souches β-D-glucosidase positive supplémentaires lors du complément d'étude) :

Deux souches ont donné des **traces** bleues après 22 heures d'incubation sur gélose RAPID'*Listeria* spp. mais pas de colonies clairement isolées caractéristiques de *Listeria*, même après 48 heures d'incubation. Il s'agit :

- d'une souche d'*Enterococcus faecalis* qui après coloration de GRAM n'est pas typique de *Listeria* et qui après spot sur PALCAM ou RAPID'*L.mono* donne des colonies jaunes, non typiques de *Listeria*.
- d'une souche de *Jonesia denitrificans* qui ne donne aucune colonie après spot sur PALCAM et RAPID'*L.mono*.

Deux souches d'*Enterococcus faecium* ont donné des **colonies bleues**, mais après 48 heures d'incubation, ressemblant à des colonies de *Listeria* : les tests de confirmation (coloration de GRAM ou spots sur PALCAM et RAPID' *L.mono*) se sont révélés négatifs.

Une souche de *Bacillus* a donnée des **traces** bleues, mais après 48 heures d'incubation et ne ressemblant pas à des colonies de *Listeria* : les tests de confirmation se sont révélés négatifs.

Une souche d'*Enterococcus durans* a donné des **colonies bleues**, mais après 48 heures d'incubation, ressemblant à des colonies de *Listeria* : les tests de confirmation (coloration de GRAM ou spots sur PALCAM et RAPID' *L.mono*) se sont révélés négatifs.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :

- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 à 4 jours (si confirmation par tests miniaturisés et spot sur RLM) ou 2 à 10 jours (si confirmation par les tests de la méthode de référence) avec la méthode alternative contre 3 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.
- Dans le cas de résultats présumés positifs par la méthode alternative, mais rendus négatifs après confirmation, les résultats négatifs sont obtenus en 3 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 sérotype *Listeria innocua* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0 / 25 ml
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (3 / 25 ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 / 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	120	112	112	112	0	0	
1	120	112	112	3	5	109	107
2	120	112	112	0	0	112	112

*Exclusion des résultats d'un laboratoire pour cause de réception tardive des échantillons

Calculs

- L'exactitude relative est de 99,4 %
- La spécificité est de 100 %
- La sensibilité est de 98,7%

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

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 :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,1\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$

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	95%	91,2%	1,83
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	96%	94,7%	1,34
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