



**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 07/13 – 05/07

Date de validation :	24.05.2007
Extensions les :	28.09.2007
	26.01.2009
	05.02.2010
Fin de validité :	24.05.2011

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* spp (Ref 357-8113)

Référence du protocole : 808465 – Rev.C

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 (2005) : 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* spp 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*. Après l'étape d'enrichissement en bouillon spécifique LSB, 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* spp 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 du bouillon d'enrichissement sur géloses sélectives telles que Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti ou Palcam et Oxford.
- Par isolement sur gélose Rapid'*Listeria* spp ou sur gélose RAPID'*L.mono* à partir de l'étape d'enrichissement. En cas de colonies caractéristiques, le résultat iQ-Check sera considéré comme confirmé.

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 oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE (Historique de validation)

1/ Les deux protocoles ont été testés lors de l'étude de validation en 2007:

1. Enrichissement en bouillon LSB suivi d'un protocole de lyse standard
2. Enrichissement en bouillon LSB suivi d'un protocole de lyse simplifiée

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 (iQTM5 et MiniOpticonTM) avec l'un des thermocycleurs initialement acceptés (Chromo4TM).

Ces essais ne sont pas détaillés dans la présente attestation.

Les quatre versions des thermocycleurs (Chromo4TM, iCycler iQTM, iQTM5 et MiniOpticonTM) 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 MonitorTM 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 oeuvre du protocole de lyse standard. Par ailleurs, toutes les PCR ont été réalisées par Chromo4TM, puis traitées en parallèle à la fois par analyse manuelle et par analyse automatique du logiciel Opticon MonitorTM.

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 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 CFX96TM et son logiciel CFX ManagerTM, et pilotage du MiniOpticonTM par le logiciel CFX ManagerTM.

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 2007 sur 363 échantillons de produits dont 182 naturellement contaminés, 30 artificiellement contaminés et 151 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers (dont fromages au lait cru), produits carnés, produits végétaux, produits de la pêche, prélèvements d'environnement (hors échantillons de production primaire).

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 = 177 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 22 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 13 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 151 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 2 échantillons présumés positifs par la méthode alternative avec le protocole de lyse standard, négatifs après confirmation

(3) dont 8 échantillons présumés positifs par la méthode alternative avec le protocole de lyse standard, négatifs après confirmation et dont 6 échantillons présumés positifs par la méthode alternative avec le protocole de lyse simplifié, négatifs après confirmation

Les résultats finaux sont identiques quel que soit le protocole de lyse utilisé.

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

- Exactitude relative : **AC = 90,4%**
- Spécificité relative : **SP = 87,3%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 93,2%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 93,9\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 89,6\%$$

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

PD = 22 , ND = 13 donc Y = PD + ND = 35 ; d minimal = 12 ; d = 22-13 = 9

Conclusion

Les deux méthodes sont équivalentes en termes statistiques.

Le nombre de résultats discordants peut être lié à la prise d'essai différente pour les deux méthodes, puisqu'elles utilisent un bouillon d'enrichissement différent. Il faut également préciser que le pourcentage d'échantillons naturellement contaminés qui ont été testés est important (86%).

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2007, 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 végétaux, produits de la pêche, 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, identiques quel que soit le protocole de lyse utilisé, sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes artisanales	<i>L. welshimeri</i>	0,3 [0,2 – 0,5]	0,4 [0,2 – 0,6]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,9 [0,6 – 1,5]	0,7 [0,4 – 1,3]
Crudités 4 ^{ème} gamme	<i>L. seeligeri</i>	0,7 [0,3 – 1,4]	0,6 [0,3 – 0,9]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,6 [0,3 – 1,2]	0,6 [0,3 – 1,1]
Eau de process	<i>L. innocua</i> 1/2c	0,6 [0,3 – 1,1]	0,6 [0,4 – 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

Le niveau de détection de la méthode alternative, pour les deux protocoles de lyse, se situe entre 0,2 et 1,5 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Les 50 souches de *Listeria monocytogenes* et les 34 souches de *Listeria* autre que *monocytogenes* ont été détectées.
- L'étude de 32 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 :
 - Pour *Listeria* genre : en 2 jours avec la méthode alternative (en incluant la confirmation) contre 3 jours avec la méthode de référence.
 - Pour l'espèce : en 2 à 9 jours avec la méthode alternative (selon le mode de confirmation) contre 3 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 5 à 11 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 confirmation par isolement sur gélose RAPID'*L.mono* ou RAPID'*Listeria* spp) 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 2007 avec 13 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 cellules / 25 ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 cellules / 25 ml)

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 48 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	104	104	80	80	80	0	0
1	104	104	80	1	1	79	79
2	104	104	80	0	0	80	80

* Deux laboratoires ont reçu les échantillons hors délai et à une température supérieure aux exigences. Un laboratoire a rencontré des difficultés avérées lors de la mise en œuvre de la méthode alternative. Ces trois séries de résultats n'ont donc pas été exploitées.

Calculs

- L'exactitude relative est de **99,2%**
- La spécificité est de **100 %**
- La sensibilité est de **98,8%**

Interprétation

Les valeurs obtenues lors de l'étude collaborative sont plus élevées que celles obtenues lors de l'étude préliminaire. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une seule matrice artificiellement contaminée est étudiée

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 :

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

Méthode de référence :

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

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 :

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

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%	1,00
L1	98%	97,5%	1,15
L2	100%	100%	1,00

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