



**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 07/16 – 01/09

Date de validation : 26.01.2009
Fin de validité : 26.01.2013

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 :

AL - méthode de recherche

Référence du protocole : AL protocole court / Gélose – V2
356-3695 / 356-4041
356-4042 / 356-4043

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 (février 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**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "JBESLIN", written over a horizontal line.

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

La méthode AL pour le dénombrement est basée sur un milieu de culture gélosé chromogénique, qui permet simultanément de détecter le genre *Listeria* par mise en évidence d'une coloration bleue à bleu-verte (activité β -D-glucosidase) et de différencier les *Listeria monocytogenes* par apparition d'un halo opaque autour de la colonie (activité phospholipase C). Le protocole se compose d'une étape d'enrichissement en bouillon Fraser 1/2 (incubé 24 h \pm 2h, à 30°C \pm 1°C), puis d'un étalement sur milieu AL (incubé à 37°C \pm 1°C). La lecture est réalisée après 24h (\pm 2h) (avec lecture possible après 48h).

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

- A partir des colonies isolées selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO en incluant l'étape de purification.
- 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).
- A partir d'une colonie isolée par repiquage par spot sur gélose RAPID'L. *Mono*, sans purification préalable.
- Par l'utilisation de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la gélose A.L. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

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

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 2008 sur 339 échantillons de produits dont 81 naturellement contaminés, 77 artificiellement contaminés et 181 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers (dont fromages au lait cru), produits végétaux, produits de la pêche (dont poissons fumés) et prélèvements d'environnement.

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

Incubation des géloses AL pendant 22 heures à 37°C

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 = 155 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 181 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

Incubation des géloses AL pendant 48 heures à 37°C

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 = 156 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 181 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(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 :

Incubation des géloses AL	Exactitude relative AC	Spécificité relative SP	Sensibilité relative SE
pendant 22heures à 37°C	99,1%	99,5%	98,7%
pendant 48heures à 37°C	99,4%	99,5%	99,4%

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) :

Incubation des géloses AL	Méthode alternative : (PA + PD) / (PA + PD + ND)	Méthode de référence : (PA + ND) / (PA + PD + ND)
pendant 22heures à 37°C	98,7%	99,4%
pendant 48heures à 37°C	99,4%	99,4%

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

Incubation des géloses AL pendant 22heures à 37°C

PD = 1, ND = 2 ; donc $Y = PD + ND = 3$; $Y \leq 6$; Aucun test statistique n'est disponible.

Incubation des géloses AL pendant 48heures à 37°C

PD = 1, ND = 1 ; donc $Y = PD + ND = 2$; $Y \leq 6$; Aucun test statistique n'est disponible.

Conclusion

Les deux méthodes sont considérées comme équivalentes.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2008, 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, 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	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,7 [0,4 – 1,1]	0,7 [0,4 – 1,1]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 4b	0,7 [0,4 – 1,1]	0,7 [0,4 – 1,1]
Mélange légumes crus	<i>L. monocytogenes</i> 4b	0,4 [0,2 – 0,5]	0,4 [0,2 – 0,5]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,4 [0,2 – 0,6]	0,4 [0,2 – 0,6]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	0,4 [0,2 – 0,6]	0,4 [0,2 – 0,6]

(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 se situe entre 0,2 et 1,1 UFC/25 g et est identique à celui de la méthode de référence.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 60 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 60 testées.
- L'étude de 18 souches non *Listeria* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.
L'étude de 19 souches de *Listeria non monocytogenes* a révélé un aspect caractéristique des *Listeria ivanovii* après 24 heures d'incubation, avec des halos de petite taille.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 4 jours (après confirmation sur Rapid'*L.mono*) ou jusqu'à 9 jours (après confirmation par les tests classiques) avec la méthode alternative contre 5 à 11 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 2 à 9 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 16 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 :

- 0 UFC/25 ml
- 3 UFC/25 ml
- 30 UFC/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	128	128	112	112	112	0	0
1	128	128	112	0	0	112	112
2	128	128	112	0	0	112	112

* Les résultats de 2 laboratoires n'ont pas été exploités : l'un pour réception hors délai des échantillons et l'autre pour cause de non contamination des échantillons par le laboratoire expert.

Calculs

- L'exactitude relative est : **AC = 100%**
- La spécificité est : **SP = 100%**
- La sensibilité est : **SE = 100%**

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	100%	100%	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	100%	100%	1,00
L1	100%	100%	1,00
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