



**Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire
Performances analytiques certifiées**

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME EN ISO 16140 : 2003**

N° attestation : TRA – 02/10 – 12/07

Date de validation : 04.12.2007

Fin de validité : 04.12.2011

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

BIOCONTROL SYSTEMS
12822 SE 32nd Street
Bellevue, WA 98005, USA

Correspondant

BioControl Systems SAS
8, rue Saint jean de Dieu
69007 Lyon, France

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

TRANSIA STRIP *Listeria*

Référence du protocole : 55072F.R001.022008

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et prélèvements d'environnement

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

Norme EN ISO 11290-1 incluant l'amendement **A1 (2004)** : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : Méthode de recherche - (février 1997).

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFAQ AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France
Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40
certification@afaq.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test TRANSIA STRIP *Listeria* est un test immuno-chromatographique de type sandwich en une étape, qui utilise un anticorps marqué à l'or colloïdal comme traceur et une membrane de nitrocellulose sur laquelle est immobilisée un autre anticorps anti-*Listeria* (anticorps spécifique d'antigènes flagellaires de *Listeria*), comme phase solide.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir du bouillon Fraser complet non chauffé, de l'une des manières suivantes :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification)
- par isolement sur gélose chromogène *Listeria* selon Ottaviani & Agosti, suivi d'une galerie biochimique, sans purification préalable si la colonie suspecte de *Listeria* est bien isolée.
- Par isolement sur gélose ALOA[®], suivi d'une confirmation sur gélose ALOA[®] Confirmation si la colonie suspecte est caractéristique de *L. monocytogenes* (confirmation de l'espèce *monocytogenes*), ou suivi d'une confirmation à l'aide des tests Gram et catalase (confirmation du genre *Listeria*)
- En utilisant toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode TRANSIA STRIP *Listeria*. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble (Cf. notice du fabricant)

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

NOTE

La conservation du bouillon Fraser non chauffé pendant 72 heures à 2-8°C avant la réalisation du test TRANSIA STRIP *Listeria* a été testé pendant cette étude.

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 321 échantillons de produits dont 91 naturellement contaminés, 69 artificiellement contaminés et 161 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**.

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 151 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 161 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 8 échantillons positifs non confirmés

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

- Exactitude relative : **AC = 97,2%**
- Spécificité relative : **SP = 98,8%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 95,6%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 95,6\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,8\%$$

Conclusion

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

$$PD = 2, ND = 7 \text{ donc } Y = PD + ND = 9 ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 2, M = 1 \quad \text{donc } m > M$$

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas statistiquement différentes.

Etude de la conservation des bouillons Fraser pendant 72 heures à 2-8°C

Les échantillons positifs ont tous été retestés après conservation des bouillons Fraser pendant 72 heures à 2-8°C.

Les résultats sont équivalents à ceux obtenus directement après incubation : un échantillon faux négatif devient positif et deux échantillons positifs deviennent négatifs après conservation du Fraser.

Les identifications réalisées après conservation sont identiques à celles réalisées sans conservation du Fraser.

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 cinq 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 :

		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	<i>L. welshimeri</i>	0,7 [0,4 – 1,2]	0,7 [0,4 – 1,2]
Lait cru	<i>L. ivanovii</i>	0,6 [0,3 – 1,1]	0,6 [0,3 – 1,1]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes 1/2a</i>	0,6 [0,3 – 1,0]	0,6 [0,3 – 1,0]
Mélange de légumes crus	<i>L. monocytogenes 4b</i>	0,8 [0,5 – 1,3]	0,8 [0,5 – 1,3]
Eau de process	<i>L. innocua</i>	0,4 [0,2 – 0,8]	0,4 [0,2 – 0,8]

(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

Les niveaux de détection de la méthode alternative et de la méthode de référence sont identiques et se situent entre 0,2 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 30 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**, pour le **genre *Listeria***, se fait en 3 jours (si confirmation avec A.L.O.A.) ou 4 jours (si confirmation par tests classiques) avec la méthode alternative, contre 3 à 6 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **positifs**, pour l'espèce ***L. monocytogenes***, se fait en 4 jours (si confirmation avec A.L.O.A.) à 9 jours (si confirmation par tests classiques) avec la méthode alternative, contre 9 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 4 jours avec la méthode alternative contre 3 à 6 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en deux jours avec la méthode alternative contre cinq 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 4 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec quatorze 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 :

- 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	112	104	80	80	0	0	
1	112	104	80	13	14	67	66
2	112	104	80	0	0	80	80

*Deux laboratoires ont reçu les échantillons à J+2 et un autre laboratoire a reçu les échantillons avec une température à réception supérieure à 8,4°C.

**Un laboratoire a reçu un colis très endommagé avec certains flacons détruits.

Calculs

- L'exactitude relative est de 99,6%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 91,3%

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,3\%$$

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	74%	70,8%	1,20
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	75%	72,5%	1,16
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, théoriquement contaminés, se sont révélés négatifs (ces résultats étaient pour la plupart concordants entre la méthode TRANSIA STRIP Listeria et la méthode de référence)

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 AFAQ AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition
un document de synthèse des études préliminaire et collaborative