



**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 : EUR 15/03 – 12/05**

<b>Date de validation*</b> :	<b>09.12.2005</b>
<b>Extension le*</b> :	<b>15.12.2006</b>
<b>Reconduction le</b> :	<b>04.12.2009</b>
<b>Fin de validité</b> :	<b>09.12.2013</b>

*\* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2005 et 2006 pour l'étude préliminaire et en 2006 pour l'étude interlaboratoire*

**La Société**            **EUROPROBE SA**  
(siège social)        Le Gemellyon Nord  
57, Bd Vivier Merle  
F- 69429 LYON Cedex 03

Distributeur        **EURALAM**  
Le Gemellyon Nord  
57, Bd Vivier Merle  
F – 69429 LYON Cedex 03

**Site de**                **INGENETIX GmbH**  
**production**        Simmeringer Hauptstrasse 24  
A – 1110 VIENNE

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

**LUMIPROBE 24 *Listeria monocytogenes***

Références du protocole : FTLMT-V-12/09 (TUBE)  
FTLMP-V-12/09 (MICROPLAQUE)

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine (hors fromages de type "cantal" et "salers") 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](mailto:certification@afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode *LUMIPROBE 24 Listeria monocytogenes* est un test associant un enrichissement en milieux de culture spécifiques et une hybridation de sondes nucléiques en phase solide, permettant la détection rapide et spécifique des *Listeria monocytogenes*. L'ARNr de la bactérie cible, libéré par lyse, capturé par un oligonucléotide et immobilisé sur un support coaté, est hybridé avec un deuxième oligonucléotide marqué. La formation des hybrides est révélée par une réaction de chemiluminescence.

Dans le cadre de la marque AFNOR Validation, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode Lumiprobe doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- à partir du bouillon d'enrichissement (bouillon RM) selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- à partir du bouillon RM, par isolement sur une gélose chromogénique de formulation Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti, ou sur une gelose chromogénique issue d'une méthode bénéficiant de la marque AFNOR VALIDATION (les milieux chromogènes ALOA® et RLM ont été utilisés pour l'étude de validation).

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.

### Note (historique de validation)

**1/ L'étude d'extension de décembre 2006** concerne la modification du protocole d'enrichissement pour tous produits non laitiers non crus et l'étendue du champ d'application de la méthode à tous produits d'alimentation humaine (hors fromages de type "cantal" et "salers") et prélèvements d'environnement, ce qui fait l'objet de la présente attestation.

Les résultats présentés tiennent compte des résultats de l'étude préliminaire de 2005. L'étude interlaboratoire d'extension a été réalisée selon la norme EN ISO 16140.

Deux protocoles ont été testés : un protocole général et un protocole spécifique pour les produits crus.

**2/ Dans le cadre de l'étude de reconduction de 2009**, aucun essai complémentaire n'a été réalisé. Depuis la dernière validation, le protocole de la méthode *LUMIPROBE 24 Listeria monocytogenes* n'a pas été modifié. La méthode de référence et le protocole de validation sont inchangés.

### **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 2005 sur 62 échantillons de produits dont 15 naturellement contaminés, 15 artificiellement contaminés et 32 non contaminés, appartenant à la catégorie «produits laitiers».

Des essais complémentaires ont été réalisés en 2006 sur 242 échantillons de produits dont 60 naturellement contaminés, 63 artificiellement contaminés et 119 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits végétaux, produits de la mer 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 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 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 7 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 11 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 151 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

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

- Exactitude relative : **AC = 94%**

- Spécificité relative : **SP = 96%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 92%**

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 :

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

Méthode de référence :

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

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

PD = 7 , ND = 11 donc Y = PD + ND = 18 ;  $6 \leq Y \leq 22$  m = 5 , M = 2 donc m > M

### Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas significativement différentes en termes statistiques.

### NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2005, sur la combinaison produits laitiers / *Listeria monocytogenes* issue de lait cru. Ce produit représente la catégorie « produits laitiers ».

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

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits végétaux, produits carnés, 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 <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Produits laitiers	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,9 [ 1,0 – 3,6 ]	0,5 [ 0,4 – 0,8 ]
Saumon fumé	<i>Listeria monocytogenes 3a</i>	2,2 [ 1,4 – 3,5 ]	1,3 [ 0,8 – 2,1 ]
Rillettes	<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	0,9 [ 0,6 – 1,5 ]	0,6 [ 0,4 – 0,9 ]
Mélange de crudités	<i>Listeria monocytogenes 1/2c</i>	0,6 [ 0,4 – 2,0 ]	0,5 [ 0,3 – 0,8 ]
Eau de rinçage	<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	0,7 [ 0,6 – 0,9 ]	0,6 [ 0,4 – 0,9 ]

(3) **LOD<sub>50</sub>** : 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 10<sup>th</sup> December, 2003"

### Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,6 et 2,2 UFC/25 g.  
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,5 et 1,3 UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- En 2006, 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude en 2005 de 34 souches non *Listeria monocytogenes* 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 (dans le cas de résultat Lumiprobe 24 positif confirmé en 24 heures sur gelose chromogène) à 9 jours avec la méthode alternative contre 4 à 12 jours avec la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 2 à 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 5 jours.

## ETUDE INTERLABORATOIRE (selon la norme EN ISO 16140)

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 11 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de pâté contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes 1/2b* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0 UFC / 25 g
- niveau 3 UFC / 25 g
- niveau 30 UFC / 25 g

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	88	88	80	80	80	0	0
1	88	88	80	0	1**	80	79**
2	88	88	80	0	0	80	80

\*Un laboratoire a été exclu car des échantillons négatifs ont été donnés positifs par la méthode de référence et l'hypothèse d'intercontamination a été vérifiée.

\*\*Un laboratoire a obtenu un résultat inférieur à la valeur seuil pour un échantillon correspondant au taux de contamination le plus faible.

#### Calculs

- L'exactitude relative est de 99 %
- La spécificité est de 100 %
- La sensibilité est de 99 %

#### 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 :

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

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
L1	98%	97%	1,52
L2	100%	100%	1

tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1
L1	100%	100%	1
L2	100%	100%	1

### 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](http://www.afnor-validation.org)