



**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 : UNI 03/04 - 04/05**

Date de validation :	08.04.2005*
Dates d'extension :	15.09.2006 29.03.2007
Date de reconduction :	24.09.2009*
Fin de validité :	08.04.2013

*\* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2005 pour l'étude préliminaire (validation initiale) et en 2009 pour l'étude interlaboratoire (reconduction)*

**La Société**      **OXOID Ltd**  
Wade Road  
RG24 8 PW BASINGSTOKE  
UK

**Distributeur**    **OXOID Thermo Fisher Scientific**  
6 route de Paisy – BP 13  
69571 DARDILLY CEDEX  
France

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

**Listeria Precis™  
(méthode de recherche)**

Référence du protocole : **OCLA-R3 08/2009**

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine et prélèvements de l'environnement.

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

**NF EN ISO 11290-1** (février 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**

---

**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 Listeria Precis™ comprend une incubation en bouillon de préenrichissement sélectif spécifique, suivie d'un isolement sur un milieu chromogène dénommé Brilliance™ Listeria, utilisé pour la différenciation et l'isolement de *Listeria monocytogenes*.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATON, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode Listeria Precis™ doivent être confirmés selon l'un des deux cas suivants:

- à partir des colonies isolées sur milieu chromogénique, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) ;
- à partir des colonies caractéristiques, isolées sur gélose Brilliance™ Listeria, selon le test OBIS MONO.

En cas de résultat discordant (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 1 : Protocoles validés dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION**

La méthode Listeria Precis™ présente deux protocoles distincts :

- Un protocole toutes matrices sauf produits carnés
- Un protocole produits carnés

Les deux méthodes (alternative et référence) utilisent des bouillons d'enrichissement différents, ce qui peut introduire un risque de discordance supplémentaire au niveau des résultats de l'étude.

### **NOTE 2 : Historique de validation**

#### **1/ Extension de la validation aux prélèvements de l'environnement**

Une étude d'extension a été menée en 2006 afin d'étendre le domaine d'application de la validation aux prélèvements de l'environnement. L'étude d'exactitude/spécificité/sensibilité relative et l'étude du niveau de détection relatif ont été complétées pour cette nouvelle catégorie de produits, en respectant le protocole de la norme EN ISO 16140. La présente attestation intègre les nouveaux résultats.

#### **2/ Etude d'extension (mars 2007)**

L'étude d'extension menée en mars 2007 avait pour objet d'ajouter une option de confirmation supplémentaire : la méthode OBIS MONO.

Des essais ont été réalisés à partir de souches cultivées en bouillon nutritif et isolées en parallèle sur gélose Brilliance™ Listeria et sur gélose TSA-YE :

- 150 souches de *Listeria monocytogenes* de sérotypes et d'origines variées ont été testées
- 100 souches non cibles (autres que *monocytogenes*) ont été testées.

Les résultats obtenus étaient conformes à ceux attendus.

#### **3/ Modification de la référence commerciale (février 2008)**

La méthode alternative anciennement dénommée OCLA a été renommée Listeria Precis™. Le milieu chromogène OCLA a changé de dénomination pour devenir Brilliance™ Listeria.

#### **4/ Etude de reconduction (septembre 2009)**

Lors de l'étude de reconduction de 2009, l'étude interlaboratoire a été entièrement refaite selon le protocole EN ISO 16140. Les résultats sont intégrés à 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 2004 sur 337 échantillons de produits dont 99 naturellement contaminés, 68 artificiellement contaminés et 170 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, ovoproduits, produits laitiers, produits de la pêche, produits végétaux.

Des essais ont été menés en 2006 sur 69 échantillons de prélèvements d'environnement (siphons, surfaces, résidus et poussières) dont 25 naturellement contaminés, 14 artificiellement contaminés et 30 non contaminés.

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 = 174 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 14 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 18 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 200 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) (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 :

- Exactitude relative : **AC = 92,1 %**
- Spécificité relative : **SP = 93,4 %**

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

- Sensibilité relative : **SE = 90,6%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 91,2 \%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 93,2 \%$$

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

$$PD = 14, \quad ND = 18, \quad Y = PD + ND = 32, \quad Y > 22, \quad d = PD - ND = 4, \quad d^2/Y = 16/32 = 0,5 < 3,841$$

### Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas 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 2004, sur les 5 premières combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous. Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits de la pêche, produits végétaux, produits laitiers et ovoproduits.

Des essais complémentaires ont été réalisés en 2006, sur la sixième catégorie (prélèvements de l'environnement) pour le couple matrice souche figurant dans le tableau.

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	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>L. monocytogenes</i> 4e	0,9 [ 0,5 – 1,7 ]	0,2 [ 0,05 – 0,7 ]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,5 [ 0,2 – 1,3 ]	0,1 [ 0,03 – 0,5 ]
Salade	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,3 [ 0,1 – 1,2 ]	0,2 [ 0,03 – 0,8 ]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,4 [ 0,1 – 1,4 ]	0,6 [ 0,6 – 0,6 ]
Crème anglaise	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,3 [ 0,1 – 0,9 ]	1,1 [ 0,7 – 1,6 ]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,8 [ 0,2 – 3,0 ]	0,4 [ 0,1 – 1,4 ]

(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 **0,1** et **3,0** UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre **0,03** et **1,6** UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 48 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées, après 24 h d'incubation du bouillon d'enrichissement. Les deux souches n'ayant pas donné de réaction positive sont des souches de collection de sérotype 3a et 4e.
- L'étude de 30 souches non *Listeria monocytogenes* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

## PRATICABILITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- L'obtention des résultats **positifs** confirmés se fait en 4 à 8 jours ou en 5 à 9 jours (produits carnés) avec la méthode alternative contre 7 à 11 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours ou 3 jours (produits carnés) avec la méthode alternative contre 3 à 5 jours avec la méthode de référence, dans le cas où aucune colonie caractéristique n'est présente sur les géloses sélectives.

- Si des colonies caractéristiques sont présentes sur les géloses sélectives, l'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 à 4 jours ou 2 à 5 jours (produits carnés) 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 4 à 8 jours ou en 5 à 9 jours (produits carnés)

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2009 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* 4b 153 aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml
- 1 – 10 UFC/ 25 ml
- 5 – 50 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	104	96	96	96	0	0	
1	104	96	96	1	0	95	96
2	104	96	96	0	0	96	96

\* Un laboratoire ayant reçu les échantillons hors délai n'a pas réalisé les analyses.

### Calculs

- L'exactitude relative est de **99,7%**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **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) :

$$\begin{aligned} & \text{Méthode alternative :} \\ & (PA + PD) / (PA + PD + ND) = \mathbf{100\%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Méthode de référence :} \\ & (PA + ND) / (PA + PD + ND) = \mathbf{99,5\%} \end{aligned}$$

### 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** :

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	97,8	97,9	1,00
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](http://www.afnor-validation.org)