



**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 – 03/02 – 04/95

Date de validation :	11.04.1995
Dates de reconduction*:	11.04.1999
	24.06.2003
	03.07.2007*
Fin de validité :	11.04.2011

\* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 lors de l'étude de reconduction

**La Société**      **OXOID**  
(siège social    6, Route de Paisy – BP 13  
et distributeur) 69671 DARDILLY CEDEX

**Site de**            **UNIPATH Ltd**  
**production**    Priory Business Park  
Bedford –  
Bedfordshire MK44 3 UP – U.K.

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

**Test Clearview *Listeria* OLRT : OXOID *Listeria* Rapid Test**

Référence des protocoles : X4899E, X4932E et X5126E

**DOMAINE D'APPLICATION**

Tous produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Cette méthode ne permet pas la détection de *Listeria grayi subsp grayi* et de *Listeria grayi subsp murrayi*.

**METHODE DE REFERENCE**

NF EN ISO 11290-1 (1997): Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Listeria monocytogenes* – Partie 1 : Méthode de recherche

**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](mailto:certification@afaq.afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

Le test, basé sur une immunochromatographie, est mis en œuvre après deux phases d'enrichissement (en Fraser demi, puis en bouillon BLEB).

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test Clearview doivent être confirmés à partir du bouillon BLEB 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) en réalisant des isollements sur les milieux Palcam ou Oxford, ou bien par isolement sur gélose chromogène OCLA pour la confirmation du genre puis par test d'hémolyse et test des glucides : galerie biochimique, à partir d'une colonie isolée, pour la confirmation de l'espèce. Le cas échéant, une vérification de la pureté de la souche pourra être mise en œuvre en réalisant en parallèle, un isolement sur gélose TSA.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR, ou bien par isolement sur gélose OCLA, le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

## NOTE

L'étude de reconduction de 2007, faisant l'objet de la présente attestation, a été réalisée selon la norme EN ISO 16140 avec la conservation des résultats d'inclusivité/exclusivité issus de l'étude de reconduction de 1994. Le champs d'application de la méthode est élargi aux échantillons d'environnement, les durées minimales d'incubation ont été revues (24 heures au lieu de 21 heures pour le Fraser ½ et le bouillon BLEB) et une nouvelle modalité de confirmation a été ajoutée.

La possibilité de conserver le bouillon BLEB non chauffé pendant 72 heures à 2-8°C avant la réalisation du test, a été testée lors de l'étude de reconduction de 2007, sur tous les échantillons positifs.

## 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 319 échantillons de produits dont 106 naturellement contaminés, 44 artificiellement contaminés et 169 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 NF EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 144 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 1 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 169 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon positif non confirmé

(3) dont 1 échantillon positif non confirmé

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

- Exactitude relative : **AC = 98,1%**
- Spécificité relative : **SP = 99,4%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 96,6%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,7\%$$

Méthode de référence :

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

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

PD = 1, ND = 5 donc Y = PD + ND = 6 ;  $6 \leq Y \leq 22$       m = 1, M = 0      donc m > M

### 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 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 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 :

		Niveau de détection relatif LOD <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes artisanales	<i>Listeria welshimeri</i>	0,4 [ 0,2 – 0,8 ]	0,4 [ 0,2 – 0,8 ]
Lait cru	<i>Listeria ivanovii</i>	0,4 [ 0,3 – 0,7 ]	0,4 [ 0,3 – 0,7 ]
Saumon fumé	<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	0,6 [ 0,4 – 0,9 ]	0,6 [ 0,4 – 0,9 ]
Mélange de légumes crus	<i>Listeria monocytogenes 4b</i>	0,8 [ 0,5 – 1,3 ]	0,8 [ 0,5 – 1,3 ]
Eau de process	<i>Listeria innocua</i>	0,5 [ 0,3 – 1,0 ]	0,5 [ 0,3 – 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 Used 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 est identique à celui obtenu pour la méthode de référence et se situe entre 0,2 et 1,3 UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE (1994)

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 48 souches de *Listeria* ont été détectées sur 50 testées. Deux souche de *Listeria grayi* n'ont pas été mises en évidence (cf. restriction d'emploi de la méthode)
- L'étude de 42 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 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 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 4 jours

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 12 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 / 25 ml
- 3 / 25 ml
- 30 / 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	96	96	88	88	88	0	0
1	96	96	88	0	1	88	87
2	96	96	88	0	0	88	88

\*les résultats d'un laboratoire n'ont pas été exploités suite à une température à réception des échantillons supérieure à 8°C

### Calculs

- L'exactitude relative est de 99,7 %
- La spécificité est de 100 %
- La sensibilité est de 99,5 %

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

## 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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,5\%$$

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	98%	97,8%	1,15
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 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