



**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 : QUA 18/05-07/08**

**Date de validation : 01.07.2008  
Date d'extension : 26.01.2009  
Fin de validité : 01.07.2012**

**La Société** OXOID Thermofisher Scientific  
6, route de Paisy – BP13  
69571 DARDILLY cedex  
FRANCE

**Site de production** DuPont Qualicon  
ESL Building 400  
PO Box 80400  
Route 141 & Henry Clay Road  
Wilmington DE 19880-0400 USA

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

**BAX® System PCR Assay *Listeria monocytogenes* 24E  
(QB8125C)**

Référence du protocole :

Guide de l'utilisateur : 2CQ-049.4-0307/FR0908-2 (BAX Q7)  
Schéma explicatif : 2C-058-1207 FR0109 (BAX Q7)  
Notice technique : Rev 25C-006-1207 FR0409  
Version du logiciel : 2.4 (BAX Q7)

**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** (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

Le système BAX<sup>®</sup> pour la détection de *Listeria monocytogenes* est un kit pratique de détection utilisant la technologie PCR (Polymerase Chain Reaction). Il se compose d'un protocole en 3 étapes : préparation de l'ADN, amplification et détection. Après l'étape de lyse, le thermo-cycleur/détecteur du système BAX<sup>®</sup> effectue à la fois l'amplification et la détection automatique.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les résultats positifs doivent être confirmés, au plus tard dans les 24 heures suivant la fin de l'incubation à partir du dernier bouillon conservé à 4°C, de l'une des manières suivantes :

- soit selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO ( en incluant la purification) ;
- soit par isolement de 10 microlitres d'enrichissement 24 LEB sur gélose Brilliance<sup>™</sup> *Listeria*, incubée à 37°C pendant 24-48 heures.

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

### Note 1

La méthode est certifiée AFNOR Validation pour les protocoles suivants :

- 1) Protocole général (pour produits d'alimentation humaine, sauf poissons fumés et charcuteries crues, et prélèvements d'environnement) : enrichissement pendant 26 heures  $\pm 2h$  à 37°C  $\pm 1^\circ C$  en bouillon BAX 24 LEB.
- 2) Protocole spécifique (pour poissons fumés et charcuteries crues, et applicable aux charcuteries cuites) : Enrichissement pendant 26 heures  $\pm 2h$  à 37°C  $\pm 1^\circ C$  en bouillon BAX 24 LEB, supplémenté d'un additif non sélectif, puis agitation des sachets d'enrichissement avant prélèvement pour l'étape de lyse.

### Note 2 : Historique de validation

En 2009, le champ d'application a été étendu aux poissons fumés et aux charcuteries crues par la validation d'un nouveau protocole spécifique (voir ci-dessus), également applicable aux charcuteries cuites.

En conséquence, l'étude préliminaire a été complétée pour la partie exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative, ainsi que pour le niveau de détection relatif. Les résultats ont été 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 2008 sur 368 échantillons de produits dont 88 naturellement contaminés, 75 artificiellement contaminés et 205 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**.

**Pour le protocole général** (hors poissons fumés et charcuteries crues)

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

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
<b>Méthode alternative positive (A+)</b>	Accord positif A+ / R+ PA = 140 <sup>(1)</sup>	Déviations positive A+ / R- PD = 10 <sup>(1)</sup>
<b>Méthode alternative négative (A-)</b>	Déviations négative A- / R+ ND = 13 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 205 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon positif par la méthode alternative, non confirmé

(3) dont 5 échantillons positifs par la méthode alternative, non confirmés

De nouveaux essais ont été réalisés en 2009, mettant en oeuvre le protocole spécifique, sur 78 échantillons de produits dont 41 naturellement contaminés, aucun artificiellement contaminés et 37 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits de la pêche et produits carnés.

**Pour le protocole spécifique** (poissons fumés et toutes charcuteries) :

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

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
<b>Méthode alternative positive (A+)</b>	Accord positif A+ / R+ PA = 26 <sup>(1)</sup>	Déviations positive A+ / R- PD = 12 <sup>(1)</sup>
<b>Méthode alternative négative (A-)</b>	Déviations négative A- / R+ ND = 3 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 37 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon positif par la méthode alternative, non confirmé

(3) dont 4 échantillons positifs par la méthode alternative, non confirmés

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

	Protocole général	Protocole spécifique
Exactitude relative : <b>AC</b>	93,4 %	80,8 %
Spécificité relative : <b>SP</b>	94,9 %	75,5 %
Sensibilité relative : <b>SE</b>	91,5 %	89,7 %

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) :

	Méthode alternative : (PA + PD) / (PA + PD + ND) =	Méthode de référence : (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
<b>Protocole général</b>	92,0%	93,9%
<b>Protocole spécifique</b>	92,7 %	70,7%

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

		Conclusion
<b>Protocole général</b>	Discordants : PD = 10 , ND = 13 ; Y = PD + ND = 23 ; donc Y > 22 Test de McNemar : D minimal = 10 ; d =  PD - ND  = 3 ; donc d ≤ D minimal	Equivalence
<b>Protocole spécifique</b>	Discordants : PD = 12 , ND = 3 ; Y = PD + ND = 15 ; donc Y < 22 ; M=3 ; m=3	Non équivalence*

\* Les résultats du test statistique sont dus à un nombre important de résultats supplémentaires confirmés par la méthode alternative.

## NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2008 (lors de la validation initiale et lors de l'extension de validation) sur les sept combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments :

- Pour le protocole général : Produits laitiers, produits carnés (hors charcuteries crues), produits végétaux, produits de la pêche (hors poissons fumés) et prélèvements d'environnement.
- Pour le protocole spécifique : Charcuteries (cuites et crues) et poissons fumés.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants avec le protocole général (applicable aux produits d'alimentation humaine, hors poissons fumés et charcuteries crues) :

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
Viand hachée	<i>L.monocytogenes 1/2b</i>	0,3 [ 0,2 – 0,4 ]	0,4 [ 0,3 – 0,6 ]
Lait cru	<i>L.monocytogenes 1/2b</i>	0,5 [ 0,3 – 0,7 ]	0,6 [ 0,4 – 0,9 ]
Poisson cru	<i>L.monocytogenes 1/2a</i>	0,6 [ 0,3 – 1,3 ]	0,4 [ 0,2 – 0,9 ]
Mélange légumes crus	<i>L.monocytogenes 4b</i>	0,7 [ 0,4 – 1,2 ]	0,8 [ 0,6 – 1,2 ]
Eau de process	<i>L.monocytogenes 1/2c</i>	0,4 [ 0,2 – 0,6 ]	0,3 [ 0,2 – 0,4 ]

(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"

Les résultats obtenus sont les suivants, pour le **protocole spécifique** (applicable aux poissons fumés et toutes charcuteries) :

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
Rillettes	<i>L.monocytogenes</i>	0,6 [ 0,4 – 1,0 ]	0,6 [ 0,4 – 0,9 ]
Saumon fumé	<i>L.monocytogenes 1/2a</i>	0,4 [ 0,3 – 0,6 ]	0,5 [ 0,3 – 0,8 ]

### Conclusion

Pour le protocole général (produits d'alimentation humaine, hors poissons fumés et charcuteries crues) :

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

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

Pour le protocole spécifique (poissons fumés et toutes charcuteries) :

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,4 et 1,0 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,3 et 0,9 UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 60 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 60 testées.
- L'étude de 30 souches non *Listeria* et de 32 souches de *Listeria non 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 deux à trois jours (si confirmation sur gélose Brilliance™ *Listeria*) avec la méthode alternative contre quatre à sept jours avec la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en un jour 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 deux à trois jours.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC / 25ml
- 3 UFC / 25ml
- 30 UFC / 25ml

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	80	80	80	0	0	
1	104	80	80	0	1	80	79
2	104	80	80	0	0	80	80

\*Trois laboratoires ont reçu les échantillons hors délai.

**Calculs**

- L'exactitude relative est de 99,6%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 99,4%

**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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,6\%$$

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 répliqués 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 répliqués 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%	1,0
L1	98%	97,2%	1,3
L2	100%	100%	1,0

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

**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)