



**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 : BIO 12/14 – 04/05

Date de validation :	07.04.2005*
Dates d'extension :	14.09.2006
	14.12.2006*
	17.01.2008
	27.03.2008
Dates de reconduction :	26.03.2009
	29.03.2013
Fin de validité :	07.04.2017

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

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

bioMérieux
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

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

Gélose chromID™ Ottaviani Agosti (OAA)

Validée pour la détection des *Listeria monocytogenes* et des autres *Listeria* spp

Référence du protocole : Réf. 43 641 et 43 649 - 12695 version H

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-1 (Février 1997) et son **amendement A1** (Février 2005) : Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* – Partie 1 : Méthode de recherche.



**Directrice Générale
Florence MÉAUX**

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

www.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La gélose chromID™ Ottaviani Agosti (OAA) est composée d'une base nutritive associant différentes peptones et deux substrats dont un chromogène. Elle permet la croissance de l'ensemble des *Listeria* et la révélation des activités enzymatiques correspondantes. La différenciation de *Listeria monocytogenes* repose sur l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie (activité phospholipase C).

Après un enrichissement en bouillon Fraser demi, incubé 22 à 26 heures à 30°C, un isolement est réalisé sur la gélose chromID™ Ottaviani Agosti, suivi d'une incubation 22 à 26 heures à 37°C.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons présomptifs positifs de *Listeria monocytogenes* à l'issue de la méthode OAA doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- 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 isolées sur milieu chromogénique.
- Par les tests d'identification définis dans les méthodes normalisées, avec réalisation de la galerie API *Listeria*, sans purification préalable si les colonies sont suffisamment isolées (en vérifiant toutefois la pureté de la souche soumise à confirmation par isolement sur gélose au sang)
- Par le réactif AccuProbe *L.monocytogenes* réf. 39500, à partir de colonies isolées ou non, prélevées directement sur gélose chromID™ Ottaviani Agosti.
- A partir d'une colonie isolée sur gélose chromID™ Ottaviani Agosti, par réalisation de la galerie RAPIDEC® Lmono.
- Par la mise en oeuvre du test VIDAS® LMO2 directement à partir d'une suspension de colonies caractéristiques isolées ou non sur gélose OAA.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons présomptifs positifs de *Listeria non monocytogenes* à l'issue de la méthode OAA doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- Selon les tests classiques (gram, catalase et mobilité si nécessaire) décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), à partir des colonies isolées sur milieu chromogénique.
- Par la réalisation d'une coloration de gram et l'utilisation du réactif ID Color Catalase, en direct sur les colonies caractéristiques isolées sur gélose OAA.
- A partir d'une colonie isolée sur gélose OAA, par piqûre sur gélose PALCAM (jusqu'à 15 piqûres par gélose).

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

NOTE 1 : La certification porte sur l'utilisation de la méthode OAA en recherche avec le protocole court.

NOTE 2 (Historique de Validation)

1/ En septembre 2006, une étude d'extension a permis d'ajouter une option de confirmation supplémentaire (isolement sur gélose ALOA CONFIRMATION®, sur gélose RAPID'L.mono, ou sur gélose CHROMagar® Identification *Listeria*).

Des essais ont été réalisés en souches pures se développant sur chromID™ OAA et susceptibles de présenter des colonies caractéristiques :

- 150 souches de *Listeria monocytogenes* de sérotypes et d'origines variées ont été testées ;
- 100 souches non cibles (50 *Listeria* autres que *monocytogenes* et 50 souches non *Listeria*) ont été testées.

Les trois autres modes de confirmation proposés ont été testés systématiquement. Les résultats obtenus étaient conformes à ceux attendus.

2/ En décembre 2006, l'étude interlaboratoire a été entièrement refaite conformément aux exigences de la norme EN ISO 16140, ce qui a donné lieu à une extension de Validation.

3/ En janvier 2008, l'étude a permis l'intégration d'un nouveau cas de confirmation, le test RAPIDEC® Lmono. Des essais ont été réalisés en souches pures se développant sur chromID™ OAA et susceptibles de présenter des colonies caractéristiques :

- 150 souches de *Listeria monocytogenes* de sérotypes et d'origines variées ont été testées
- 100 souches non cibles (50 *Listeria* autres que *monocytogenes* et 50 souches non *Listeria*) ont été testées

Les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus, à l'exception pour une souche de *Listeria monocytogenes* sur les 150 testées. En outre, les résultats obtenus après conservation jusqu'à 72 heures après inoculation, des galeries RAPIDEC® Lmono à température ambiante, sont identiques à ceux obtenus après incubation.

4/ En mars 2008, une nouvelle étude d'extension a permis d'étendre la validation à la **recherche de toutes les *Listeria* spp.**

Le protocole court de la méthode n'a pas été modifié, seule la lecture change : la présence de colonie bleues sans halo présume de la présence de *Listeria* autres que *L. ivanovii* et *L. monocytogenes*.

Des compléments d'essais ont été réalisés en exactitude/spécificité/sensibilité relatives, ainsi que pour le niveau de détection relatif. Les résultats figurent dans la présente réédition de l'attestation.

5/ En mars 2009, le droit d'usage de la méthode a été reconduit, sans modification du protocole de validation et de la méthode de référence depuis la précédente validation.

En parallèle, une nouvelle option de confirmation par le test VIDAS LMO2 a été validée dans le cas de la recherche de *Listeria monocytogenes*, sur la base des résultats cités ci-après obtenus lors de précédentes études de validation :

- Résultats d'exactitude/sensibilité/spécificité relatives et de niveau de détection relatif obtenus en 2005 lors de l'étude de validation initiale de la méthode OAA et qui incluait la possibilité de confirmation par le test VIDAS LMO2.
- Résultats de spécificité obtenus en 2002 lors de la validation initiale de la méthode VIDAS LMO2 (BIO 12/09 - 07/02) :
 - 50 souches de *Listeria monocytogenes* avait été détectées sur 50 testées.
 - L'étude de 43 souches non *Listeria monocytogenes*, dont 28 n'appartenant pas au genre *Listeria*, n'avait pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

L'ensemble des résultats, conformes à ceux attendus, ne modifie pas les données de validation de la présente attestation.

6/ En mars 2013, la validation de la méthode Gélose ChromID™ Ottaviani Agosti a été reconduite sans complément d'essai tierce partie, puisque ni la méthode alternative, ni le protocole de validation, ni la méthode de référence n'ont été modifiés depuis la dernière étude de validation.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative

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

En 2004, des essais ont été effectués sur *Listeria monocytogenes* sur 335 échantillons de produits dont 121 naturellement contaminés, 31 artificiellement contaminés et 183 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, produits végétaux, échantillons d'environnement.

En 2008, des essais ont été effectués sur *Listeria* spp sur 373 échantillons de produits dont 87 naturellement contaminés, 76 artificiellement contaminés et 210 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers (dont 20 fromages au lait cru), produits de la mer (dont 20 poissons fumés), produits végétaux, échantillons 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) pour les *Listeria monocytogenes* :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ (PA) = 145 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- (PD) = 3 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ (ND) = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- (NA) = 183 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative (et par la méthode de référence), négatif après confirmation

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) pour les *Listeria spp* :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ (PA) = 156 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- (PD) = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ (ND) = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- (NA) = 210 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 9 échantillons présumés positifs par la méthode alternative (et 8 par la méthode de référence), négatifs après confirmation

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

	Exactitude relative AC	Spécificité relative SP	Sensibilité relative SE
Recherche de <i>L. monocytogenes</i>	97,9 %	98,4 %	97,3 %
Recherche de <i>L. spp</i>	97,9 %	98,9 %	96,9 %

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) =
Recherche de <i>L. monocytogenes</i>	97,4 %	98,0 %
Recherche de <i>L. spp</i>	96,9 %	98,8 %

Analyse des discordants (selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140)*Listeria monocytogenes*:PD = 3, ND = 4, Y = PD + ND = 7 ; $6 \leq Y \leq 22$, m = 3, M = 0 donc m > M*Listeria spp* :PD = 2, ND = 5, Y = PD + ND = 7 ; $6 \leq Y \leq 22$, m = 2, M = 0 donc m > M

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques, que ce soit pour la recherche des *Listeria* spp ou de *Listeria monocytogenes*.

Essais de conservation des géloses OAA pendant 48 h à 2-8°C

Au cours de l'étude d'exactitude, les géloses OAA ont été conservées à 2 – 8°C pendant 48 h avant d'effectuer une seconde lecture, ceci afin de pouvoir différer la lecture des boîtes si nécessaire. La conservation des géloses OAA pendant 48 h à 2 – 8°C n'a aucun impact sur le résultat.

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 combinaisons « produits alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la mer, échantillons 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 ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes artisanales	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	0,8 [0,4 – 1,5]	0,7 [0,4 – 1,3]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,4 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,3 – 0,7]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,4 [0,2 – 0,8]	0,4 [0,2 – 0,8]
Chou rouge	<i>L. monocytogenes</i> 4b	0,7 [0,5 – 1,1]	0,7 [0,5 – 1,1]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	0,5 [0,3 – 1,0]	0,5 [0,3 – 1,0]

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas. FDA. 2006. *Final Report and Executive Summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. Appendix K. Statistics Working Group (Tholen, D. W., D. S. Paulson, B. Jarvis, D. M. Mettler, B. Lombard, K. Newton, M. A. Mozola, and A. D. Hitchins.) Report Part 4a - LOD50.*

En 2008, le niveau de détection a été déterminé pour deux souches de *Listeria* autres que *monocytogenes*, et avec les combinaisons de produits figurant dans le tableau suivant :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes artisanales	<i>Listeria innocua</i>	0,6 [0,4 – 1,0]	0,6 [0,4 – 1,0]
Lait cru	<i>Listeria ivanovii</i>	0,7 [0,4 – 1,4]	0,7 [0,4 – 1,4]

(3) LOD₅₀ : cf. ci-dessus

Conclusion

Pour la recherche de *Listeria monocytogenes*, la limite de détection de la méthode alternative se situe entre 0,2 et 1,5 cellules par 25 grammes. Celle de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 1,3 cellules par 25 grammes.

Pour la recherche de *Listeria* autres que *monocytogenes*, les limites de détection des deux méthodes sont identiques et sont compris entre 0,4 et 1,4 cellules par 25 grammes.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

Etude 2005 (*L. monocytogenes*) :

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 18 souches non *Listeria* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.
- 16 souches de *Listeria* non *monocytogenes* se sont toutes développées en donnant des colonies bleues sans halo, à l'exception de 3 souches de *Listeria ivanovii* (sur 3 testées) qui ont donné des colonies caractéristiques avec halo.

Ces 3 souches ont également donné des colonies caractéristiques sur les milieux de la méthode de référence.

Etudes 2006 et 2007 (*L. spp*) :

Les résultats des souches de *Listeria* autres que *monocytogenes* qui figuraient dans l'étude d'exclusivité en 2005 ont été repris pour l'étude d'inclusivité. Egalement, un nombre important de souches autres que *Listeria* avaient été testées en exclusivité, lors de la première validation et lors des extensions en 2006.

- Au total, 62 souches de *Listeria* non *monocytogenes* dont 29 souches de *Listeria ivanovii* et 153 souches de *Listeria monocytogenes* ont été testées et ont toutes donné les résultats attendus.
- Parmi les 63 souches d'autres genres, quelques souches de *Bacillus* et d'*Enterococcus* ont donné des colonies bleues sur gélose chromID™ OAA, considérées comme négatives après l'étape de confirmation. Ces souches donnent aussi des résultats présomptifs positifs avec la méthode de référence.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 à 8 jours avec la méthode alternative (selon le mode de confirmation utilisé) contre 5 à 11 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 2 à 4 jours selon le mode de confirmation utilisé.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 16 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 :

- niveau 0 : 0 UFC / 25 ml
- niveau 1 : 3 UFC / 25 ml
- niveau 2 : 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	128	112	104	104	104	0	0
1	128	108	104	0	0	104	104
2	128	112	104	0	0	104	104

* Deux laboratoires ont reçu tardivement des échantillons et n'ont pas réalisé les analyses et un laboratoire n'a pas réalisé les analyses pour quatre échantillons car ils étaient fuités.

** Au final, les trois laboratoires ont été exclus.

Calculs

- L'exactitude relative est de 100 %
- 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) :

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

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 %	1,0
L1	100 %	100 %	1,0
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 identique 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