



**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 : GEN 25/08 – 07/10

Date de validation : 02.07.2010

Fin de validité : 02.07.2014

**La Société**

**Pall GeneSystems**  
Centre d'affaires CICEA  
1, rue du Courtil  
F-35170 BRUZ

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

**GeneDisc *Listeria monocytogenes***  
**Détection des *Listeria monocytogenes***

Référence du protocole :

Extraction Pack FOOD 1 : PFOOD1100\_LIS01.FR  
GeneDisc *Listeria* DUO : GLISDUO\_01.FR  
GeneDisc *Listeria monocytogenes* : GLISTMON\_02.FR

**DOMAINE D'APPLICATION**

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

**RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI**

Aucune

**METHODE DE REFERENCE**

**EN ISO 11290-1 (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**

## PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode de recherche GeneDisc *Listeria* DUO est une méthode rapide et simple d'utilisation qui permet la **détection de *Listeria monocytogenes*** et de *Listeria spp* par amplification génique par PCR en temps réel. Des sondes TaqMan<sup>®</sup> marquées par un fluorophore permettent de détecter les séquences nucléiques spécifiques de *Listeria spp* ou de *Listeria monocytogenes*. Le signal est ensuite mesuré optiquement par le GeneDisc<sup>®</sup> Cycler.

Les GeneDisc *Listeria* existent en 6 ou 12 secteurs d'analyse et permettent l'analyse de *Listeria spp* et *Listeria monocytogenes* simultanément ou séparément.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les **échantillons *Listeria monocytogenes* positifs** à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir de colonie selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification). La confirmation est réalisée à partir du bouillon d'enrichissement (Fraser demi) après isolement sur gélose sélective de formulation Ottaviani et Agosti (cf. instruction de la notice technique).

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

**Note 1** : Trois protocoles d'extraction sont proposés : par lyse manuelle avec des billes Chelex (Lyse A) ; par utilisation de l'automate Gene Extract (Lyse B) ; par la technique Precellys (Lyse C).

**Note 2** : Trois protocoles de recherche de *Listeria monocytogenes* sont validées dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION :

- 1) protocole en 25h±1h avec prise d'essai de 50µl avec lyse A et B (ou 200µl si lyse C) pour tous produits d'alimentation humaine et prélèvements d'environnement (hors produits laitiers)
- 2) protocole en 25h±1h avec prise d'essai de 100µl avec lyse A et B (ou 200µl si lyse C) pour les produits laitiers
- 3) protocole 20h±2h avec prise d'essai de 100µl avec lyse A et B (ou 200µl si lyse C) pour les laits crus

## 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 2010 sur 444 échantillons de produits dont 111 naturellement contaminés, 55 artificiellement contaminés et 278 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits végétaux et divers, produits de la mer et prélèvements d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**. Les trois protocoles d'extraction (Lyse A, B et C) ont été testés.

#### Protocole d'extraction « Lyse A »

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 = 116 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 28 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 20 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 280 <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 3 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

**Protocole d'extraction « Lyse B »**

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 = 112 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 28 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 22 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 282 <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 5 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

**Protocole d'extraction « Lyse C »**

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 = 116 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 27 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 20 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 281 <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 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

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

	Lyse A	Lyse B	Lyse C
Exactitude relative : AC (%)	89,2	88,7	89,4
Spécificité relative : SP (%)	90,9	91,0	91,2
Sensibilité relative : SE (%)	85,3	83,6	85,3

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifsLa **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)
Lyse A	87,8%	82,9%
Lyse B	86,4%	82,7%
Lyse C	87,7%	83,4%

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

<b>Lyse A</b>	Y = PD + ND ; Y = 20 + 28 = 48 ; Y ≥ 22 ; Test de Mc Nemar : d =  PD-ND  : d = 8 ; x <sup>2</sup> = d <sup>2</sup> /Y : x <sup>2</sup> = 1,33 ; x <sup>2</sup> < 3,841
<b>Lyse B</b>	Y = PD + ND ; Y = 22 + 28 = 50 ; Y ≥ 22 Test de Mc Nemar : d =  PD-ND  : d = 6 ; x <sup>2</sup> = d <sup>2</sup> /Y : x <sup>2</sup> = 0,72 ; x <sup>2</sup> < 3,841
<b>Lyse C</b>	Y = PD + ND ; Y = 20 + 27 = 47 ; Y ≥ 22 Test de Mc Nemar : d =  PD-ND  : d = 7 ; x <sup>2</sup> = d <sup>2</sup> /Y : x <sup>2</sup> = 1,04 ; x <sup>2</sup> < 3,841

### Conclusion

Les méthodes ne sont pas différentes en terme statistique.

### Conservation des bouillons Fraser ½ pendant 72 heures à 4°C

Les résultats obtenus après conservation des bouillons Fraser ½ à 4°C pendant 72 heures ont été comparés à ceux obtenus immédiatement après incubation. Les essais de comparaison ont été réalisés sur le protocole de lyse A de la méthode GeneDisc LDUO.

Le stockage au froid des bouillons a permis d'obtenir 11 tests PCR positifs en *Listeria monocytogenes* pour lesquels le résultat était négatif directement après incubation. Un test PCR positif directement après incubation devient négatif après conservation du bouillon au froid.

### NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2010, sur les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits carnés, produits laitiers, produits végétaux et divers, produits de la mer et prélèvements d'environnement.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination. Les trois protocoles d'extraction (Lyse A, B et C) ont été testés.

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
Rillettes	<i>L. monocytogenes</i>	0,4 [0,2 ; 1,2]	0,4 [0,1 ; 1,3]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i>	0,7 [0,2 ; 2,0]	0,7 [0,2 ; 1,8]
Fromage frais de chèvre	<i>L. monocytogenes</i>	0,1 [0,1 ; 0,3]	0,7 [0,2 ; 2,1]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i>	0,4 [0,1 ; 1,5] Lyses A et B 0,3 [0,1 ; 1,3] Lyse C	0,4 [0,1 ; 1,3]
Epinards surgelés	<i>L. monocytogenes</i>	0,3 [0,1 ; 1,0]	0,6 [0,2 ; 1,7]
Eau de lavage	<i>L. monocytogenes</i>	0,6 [0,2 ; 1,5]	0,6 [0,2 ; 1,8]

(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. 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.*

## Conclusion

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

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Le protocole de lyse A a été utilisé.

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 62 souches non *Listeria monocytogenes* dont 32 souches de *Listeria* spp autres que *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 avec la méthode alternative contre 11 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 jours.
- **Formation du personnel :** Une formation d'au moins deux jours est recommandée pour les techniciens non formés aux pratiques liées à l'analyse par PCR.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de fromage, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25g
- 1 – 10 UFC/25g
- 5 – 50 UFC/25g

Les laboratoires ont testé, par la **méthode alternative** (utilisation du protocole d'extraction A) et par la **méthode de référence**, 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	104	104	96	96	96	0	0
1	104	104	96	0	0	96	96
2	104	104	96	0	0	96	96

\* Un laboratoire a réalisé les essais hors délais, ses résultats n'ont pas été pris en compte.

## 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.

### 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 :

$$\text{COR} = \frac{\text{degré d'accord} \times (100 - \text{concordance})}{\text{concordance} \times (100 - \text{degré d'accord})}$$

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode alternative** et 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 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](http://www.afnor-validation.org)