



**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 : RAY 32/03-07/10

Date de validation : 01.07.2010

Fin de validité : 01.07.2014

**La Société**  
**RAYAL LTD**  
Mansfield i-centre  
Oakham Business Park  
Hamilton Way Mansfield  
NG18 5BR, England, UK

**Site de production**  
**BIOLINE ApS**  
Fredericiavej 414  
7080 BORKOP  
Denmark

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

**RAYAL Listeria**

Référence du protocole : RayAl Listeria – QCF35 – Issue 1

**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 (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 RAYAL *Listeria*, basée sur une réaction immuno-enzymatique de type sandwich en deux étapes, permet la détection des *Listeria*. Le test est composé d'une plaque de microtitration sur les puits de laquelle sont greffés des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes flagellaires de *Listeria* et des réactifs prêts à l'emploi permettant le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

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

- Isolement (à partir du tube RELM non thermisé conservé à 30°C ou 2-8°C) sur gélose sélective des *Listeria* et mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonie(s) en incluant l'étape de purification.
- Isolement (à partir du tube RELM non thermisé conservé à 30°C ou 2-8°C) sur gélose selon Ottaviani et Agosti ou Rapid' L.mono, puis réalisation des tests de confirmation du genre (Gram et catalase). Il est possible de réaliser les tests de confirmation sans purification supplémentaire si les colonies sont suffisamment isolées.

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

## 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 316 échantillons de produits dont 116 naturellement contaminés, 43 artificiellement contaminés et 157 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, 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 = 152 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 3 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 157 <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 = 97,8%
- Spécificité relative : SP = 98,1%
- Sensibilité relative : SE = 97,4%

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 :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,5\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,1\%$

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

PD = 3, ND = 4, Y = PD + ND = 7 ;  $6 \leq Y \leq 22$  ; m = 3 et M = 0 donc m > M

### Conclusion

Les méthodes ne sont pas différentes en terme statistique.

### Conservation des bouillons 72 heures à 2-8°C

Les résultats obtenus après conservation des bouillons RELM à 2-8°C pendant 72 heures ont été comparés à ceux obtenus immédiatement après incubation.

La conservation des bouillons ne modifie pas le résultat observé immédiatement après incubation.

## 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 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments :

Produits carnés, produits laitiers, 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 :

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. welshimeri</i>	0,4 [0,2 – 0,7]	0,4 [0,2 – 0,7]
Lait cru	<i>L. ivanovii</i>	0,5 [0,3 – 1,0]	0,5 [0,3 – 1,0]
Chou rouge râpé	<i>L. monocytogenes</i>	0,4 [0,2 – 0,9]	0,4 [0,2 – 0,9]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i>	0,3 [0,2 – 0,4]	0,3 [0,2 – 0,4]
Eau de process	<i>L. innocua</i>	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]

(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 est identique à celui de la méthode de référence et se situe entre 0,2 et 1,0 UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 51 souches de *Listeria* ont été détectées sur 51 testées.
- L'étude de 30 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 5 à 7 jours avec la méthode alternative comme pour la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 3 à 7 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 5 à 7 jours.
- **Autres :** L'intérêt de la méthode réside dans la possibilité de trier les échantillons négatifs des échantillons suspects et d'alléger l'étape de confirmation, ainsi que dans le gain de temps de manipulation lorsqu'il s'agit d'analyser des séries d'échantillons.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Listeria monocytogenes* 1/2b aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml
- 3 UFC/25 ml
- 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	112	96	80	80	80	0	0
1	112	96	80	0	0	80	80
2	112	96	80	0	0	80	80

\* Deux laboratoires n'ont pas réalisés les essais

\*\* Les résultats de deux laboratoires ont été exclus car les conditions de réception des échantillons n'étaient pas conformes

### 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 :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$

### 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** 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)