



**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 : AES 10/05 – 09/06

Date de validation :	15.09.2006
Fin de validité :	15.09.2010

La Société **AES laboratoire**
(siège social) **rue Maryse Bastié**
 Ker Lann / CS 17219
 35172 BRUZ CEDEX

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

ALOA COUNT™

Référence du protocole : 520080 30/06/08-S

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 11290-2 / A1 (février 2005) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* – Partie 2 : méthode de dénombrement / amendement 1.

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

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 - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode comprend un milieu gélosé chromogène (ALOA™) qui permet de détecter l'ensemble des *Listeria* par la mise en évidence de la β -glucosidase et de distinguer *Listeria monocytogenes* par la formation d'un halo franc de précipitation des phospholipides clivés par sa phospholipase spécifique.

La méthode ALOA COUNT™ repose sur l'utilisation du milieu chromogénique ALOA™ ensemencé (en surface ou en profondeur) à partir de la suspension revivifiée, suivie d'une incubation à 37°C \pm 1°C. Le résultat final du dénombrement est obtenu après 48 h \pm 3h.

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

- à partir des colonies isolées sur la gélose ALOA selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification).
- Par la technique ALOA Confirmation™ en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique du fabricant
- par toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode ALOA COUNT™, en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique du fabricant.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées, ou par une autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE

Les deux protocoles d'ensemencement proposés ont été testés.

LINEARITE et EXACTITUDE relative

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

Etude de linéarité :

Des essais ont été effectués en 2006 sur les 5 combinaisons produit alimentaire/souche et dans les catégories d'aliments figurant dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**, aux 5 niveaux de contamination artificielle suivants :

- 10 à 50 UFC/ gramme
- 50 à 100 UFC/ gramme
- 100 à 500 UFC/ gramme
- 500 à 1 000 UFC/ gramme
- 1 000 à 10 000 UFC/ gramme

Les résultats obtenus sont les suivants :

Avec le protocole ALOA COUNT™ ensemencement en profondeur :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Steak haché / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,987 X - 0,005$
Produits de la mer	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 1,006 X - 0,034$
Produits végétaux	Salade / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	$Y = 0,980 X + 0,053$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	$Y = 0,968 X + 0,080$
Œufs et dérivés	Œuf cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	$Y = 1,062 X - 0,242$

Y = log(N méthode alternative)

X = log(N méthode de référence)

Avec le protocole ALOA COUNT™ ensemencement en surface :

Catégorie d'aliments	Couple matrice/souche	Droite de régression
Produits carnés	Steak haché / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 0,935 X + 0,164$
Produits de la mer	Saumon fumé / <i>Listeria monocytogenes</i> 4b	$Y = 1,053 X - 0,111$
Produits végétaux	Salade / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	$Y = 1,004 X - 0,031$
Produits laitiers	Lait cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	$Y = 1,069 X - 0,269$
Oeufs et dérivés	Oeuf cru / <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	$Y = 1,111 X - 0,441$

Etude d'exactitude :

Avec le protocole ALOA COUNT™ ensemencement en profondeur :

Des essais ont été effectués en 2006. L'exploitation statistique a porté sur 106 résultats interprétables provenant de 15 échantillons naturellement contaminés et 91 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits de la mer, produits végétaux, produits laitiers, œufs et dérivés.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**.

A titre indicatif, les domaines de contamination (concentration) étaient les suivants :

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	1 – 4,1
Produits de la mer	1 – 5,2
Produits végétaux	1 – 2,8
Produits laitiers	1 – 3,7
œufs et dérivés	1 – 3,2

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, est la suivante :

$$\text{Equation de la droite : } Y = 0,998 X - 0,010$$

$Y = \log(N \text{ méthode alternative})$

$X = \log(N \text{ méthode de référence})$

Avec le protocole ALOA COUNT™ ensemencement en surface :

Des essais ont été effectués en 2006. L'exploitation statistique a porté sur 102 résultats interprétables provenant de 12 échantillons naturellement contaminés et 90 artificiellement contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits de la mer, produits végétaux, produits laitiers, œufs et dérivés.

Les échantillons ont été analysés **en double** par chacune des **deux méthodes**.

A titre indicatif, les domaines de contamination (concentration) étaient les suivants :

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	1 – 4,1
Produits de la mer	1 – 5,2
Produits végétaux	1 – 2,8
Produits laitiers	1 – 3,7
œufs et dérivés	1 – 3,2

L'équation de la droite de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence, toutes catégories confondues, est la suivante :

$$\text{Equation de la droite : } Y = 1,003 X - 0,031$$

Y = log(N méthode alternative)
X = log(N méthode de référence)

La répétabilité pour les deux méthodes et le biais entre les deux méthodes ont été déterminés selon le mode de calcul utilisé pour l'étude collaborative (Cf. §6.3.5 et §6.3.6 de la norme NF EN ISO 16140). Ces résultats apportent une information complémentaire pour le critère exactitude.

Avec le protocole ALOA COUNT™ ensemencement en profondeur :

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode alternative est de 0,300
La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,224

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :
p = 0 si l'on prend la médiane ou D = 0 si on prend la moyenne des biais individuels.

Avec le protocole ALOA COUNT™ ensemencement en surface :

La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode alternative est de 0,384
La limite de répétabilité (en log) obtenue pour la méthode de référence est de 0,233

Le biais (en log) entre les deux méthodes (alternative – référence) est le suivant :
p = 0 si l'on prend la médiane ou D = 0,01 si on prend la moyenne des biais individuels.

Conclusion pour la linéarité et l'exactitude relative :

Les études de linéarité et d'exactitude montrent que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

SELECTIVITE (INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Cette étude a été réalisée en 2004 lors de la validation de la méthode ALOA ONE DAY™.

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 30 souches non *Listeria monocytogenes* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées. Il convient de signaler que certaines colonies de *Listeria ivanovii* présentent un aspect typique avec halo fin au terme des 24 premières heures d'incubation.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 jours (si confirmation avec ALOA Confirmation™) ou 8 jours (si confirmation selon les tests classiques) jours avec la méthode alternative contre 4 à 8 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 48 heures avec la méthode alternative comme avec la méthode de référence.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* 4b aux 5 niveaux suivants :

- < 10 UFC/ml
- 10 à 100 UFC/ml
- 100 à 1 000 UFC/ml
- 1 000 à 10 000 UFC/ml
- 10 000 à 100 000 UFC/ml

Les laboratoires ont testé, par chacune des **deux méthodes**, **deux réplicats par niveau** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Niveau de contamination	Nombre de laboratoires donnant des résultats exploitables*	Méthode de référence		Méthode alternative		
		Répétabilité r	Reproductibilité R	Répétabilité r	Reproductibilité R	Biais
Niveau 1	8	0,439	0,591	0,294	0,469	0,12
Niveau 2	8	0,118	0,131	0,187	0,203	0,00
Niveau 3	8	0,131	0,167	0,266	0,282	-0,10
Niveau 4	8	0,160	0,244	0,105	0,169	-0,05

* 5 laboratoires ont été exclus de l'interprétation statistique pour non respect du protocole.

Conclusion

L'étude interlaboratoire montre que les résultats obtenus avec la méthode alternative sont comparables à ceux obtenus avec 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