

Laboratoire de Touraine



AES Chemunex



**- RAPPORT DE SYNTHÈSE DES ÉTUDES  
PRÉLIMINAIRE ET COLLABORATIVE -**

**VALIDATION AFNOR DE LA MÉTHODE  
« ALOA COUNT™ »  
POUR LE DENOMBREMENT DE *Listeria  
monocytogenes*, DANS LES PRODUITS  
D'ALIMENTATION HUMAINE**

Réalisation de l'étude par : **Laboratoire de Touraine**

Unité vétérinaire et Agroalimentaire  
BP 67357  
37073 Tours cedex 2

Pour :

**Société AES Chemunex**

Route de Dol  
BP 54  
35270 COMBOURG

**N° attestation AFNOR : AES 10/5 – 09/06**

**(Date de validation\*: 15.09.2006 et Fin de validité : 15.09.2010)**

**\* Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre**

# SOMMAIRE

I – Introduction.....	page 4
- I - 1 - référentiel de validation .....	page 4
- I - 2 - protocole et principe de la méthode alternative .....	page 4
- I - 3 - Domaine d’application demandé .....	page 5
- I - 4 - Méthode de référence.....	page 5
- I - 5 - Historique de la validation.....	page 5
II – Etude comparative .....	page 6
- II - 1 - linéarité.....	page 6
- II - 2 - exactitude relative.....	page 8
- II - 3 - limite de détection et limite de quantification .....	page 12
- II - 4 - sensibilité relative.....	page 14
- II - 5 - spécificité / sélectivité .....	page 16
- II - 6 - praticabilité.....	page 16
III – Conclusion de l’étude préliminaire .....	page 19
IV –Etude collaborative.....	page 19
- IV - 1 - organisation de l’étude.....	page 19
- IV - 2 - contrôle des paramètres expérimentaux.....	page 22
- IV - 3 - résultats des analyses .....	page 22
- IV - 4 - définitions et calculs .....	page 24
- IV - 5 - compléments de praticabilité .....	page 27
- IV - 6 - conclusion de l’étude interlaboratoire.....	page 27
V – Conclusion générale .....	page 27

## ANNEXES

- Annexe 1 : Protocole analytique de la méthode Aloa Count™ ensemencement en profondeur .....	page 29
- Annexe 2 : Protocole analytique de la méthode Aloa Count™ ensemencement en surface.....	page 31
- Annexe 3 : Notices technique et d’utilisation .....	page 33
- Annexe 4 : Mode opératoire de la méthode NF EN ISO 11290-2/A1 .....	page 37
- Annexe 5 : Exactitude relative : données de contamination artificielle des échantillons.....	page 39

# VALIDATION AFNOR DE LA METHODE « ALOA COUNT™ » pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes*

**Fabricant** : AES CHEMUNEX  
Route de Dol  
BP 54  
35270 COMBOURG

**Laboratoire Expert** : Laboratoire de Touraine  
Unité vétérinaire et Agroalimentaire  
BP 67357  
37073 Tours cedex 2

**Méthode candidate à la validation** : ALOA COUNT™

## **Référentiels de validation** :

- Norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) :  
« Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives »
- Document AFNOR AFAQ Certification :  
« Exigences relatives aux études préliminaire et collaborative menées par un laboratoire expert » (projet au 20 mai 2005)

## **Méthode de référence** :

- NF EN ISO 11290-2 / A1 (février 2005) :  
« Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*, partie 2 : méthode de dénombrement – Amendement 1 »

**Domaine d'application** : Tous produits d'alimentation humaine

## I. INTRODUCTION

---

### I.1 Référentiel de validation

Cette étude préliminaire a été réalisée selon les termes du référentiel NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

### I.2 Protocole et principe de la méthode alternative

#### *Principe de la méthode.*

Le milieu gélosé ALOA™ est un milieu chromogène qui permet de détecter l'ensemble des *Listeria* par la mise en évidence de la bêta-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™. Le protocole analytique est le suivant :

Réalisation d'une suspension mère de X g (ou X ml) de prise d'essai dans 9 x X g (ou 9 x X ml) d'eau peptonnée tamponnée.

Revivification pendant 1 h (+/- 5 mn), à 20°C +/- 2°C

Ensemencement de la gélose ALOA™.

Deux modes d'ensemencement sont prévus par le fabricant (au choix de l'utilisateur) :

#### **- Ensemencement en surface**

\* *Etalement de 0,1 ml sur gélose ALOA™ de diamètre 90 mm (il est possible et prévu dans la fiche technique du fabricant d'étaler jusqu'à 1 ml réparti sur trois boîtes de diamètre 90 mm)*

\* *Etalement de 1 ml par boîte ALOA™ de diamètre 140 mm.*

#### **- Ensemencement en profondeur**

*Ensemencement en profondeur (simple couche) de 1 ml dans environ 15 ml de gélose ALOA™ dans une boîte de diamètre 90 mm.*

Quelque soit le mode d'ensemencement retenu, une seule boîte est ensemencée par dilution, sauf dans le cas d'un ensemencement de 1 ml sur trois boîtes pour une dilution donnée.

**Incubation à 37°C (+/-1°C).**

**Lecture** des boîtes après 24 H +/-3 H.

Les colonies typiques apparaissent bleues à bleu vert et sont entourées d'un halo opaque. Dans le cas d'une croissance faible ou si aucune colonie n'est observée après 24H +/-3H d'incubation, incuber de nouveau les boîtes pendant 24H +/-3H supplémentaires.

Confirmation d'une colonie positive selon les tests classiques des méthodes normalisées ou selon le protocole « ALOA CONFIRMATION™ ».

Dans le cadre de l'étude de validation, le laboratoire expert :

- a effectué toutes les analyses selon les deux modes d'ensemencement (surface et profondeur),
- a réalisé les confirmations selon les deux modes de confirmation prévus par le fabricant,
- a réalisé les dénombrements après 21H\* et 45H\* d'incubation (pour les deux modes d'ensemencement).

\* : durées d'incubation minimales prévues dans le protocole analytique du fabricant.

***Protocole d'utilisation de la méthode alternative sous forme de schéma.***

Les synoptiques du protocole d'utilisation de la méthode alternative sont présentés en [annexe 1](#) et [annexe 2](#).

***Projet de notices à jour.***

Le projet de notices d'utilisation figure en [annexe 3](#)

### **I.3 Domaine d'application demandé**

Le domaine d'application de la validation AFNOR de la méthode ALOA COUNT™ concerne tous les produits d'alimentation humaine, sans aucune exception.

### **I.4 Méthode de référence**

La méthode de référence à laquelle sera comparée la méthode alternative est la norme NF EN ISO 11290-2 / A1 (février 2005) intitulée Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* Partie 2 : Méthode de dénombrement. Le mode opératoire de la méthode ISO est présenté en [annexe 4](#).

### **I.5 Historique de la validation**

La validation AFNOR de la méthode ALOA COUNT™ dans les produits d'alimentation humaine est la première menée.

Par contre, la méthode ALOA ONE DAY qui repose sur le milieu chromogénique ALOA™ a fait l'objet de plusieurs évaluations en vue de sa validation. Ainsi et en accord avec le Bureau Technique, il a été décidé de reprendre les données Inclusivité / Exclusivité obtenue lors de la validation ALOA ONE DAY dans ce rapport d'étude préliminaire de validation de la méthode ALOA COUNT™.

## **II – ETUDE COMPARATIVE**

---

### **II.1. Linéarité**

#### **II.1.1 Définition**

Aptitude de la méthode, pour une matrice donnée, à fournir des résultats proportionnels à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon, c'est-à-dire qu'à une augmentation de l'analyte correspond une augmentation linéaire ou proportionnelle des résultats.

#### **II.1.2. Matrices utilisées et protocole de contamination**

Les 5 matrices alimentaires représentatives des 5 catégories d'aliments choisies sont :

- steak haché
- saumon fumé
- laitue
- lait cru
- œuf cru

Les 5 souches spécifiques aux 5 matrices sont les suivantes :

- *Listeria monocytogenes* 4b isolée de steak haché
- *Listeria monocytogenes* 4b isolée de saumon fumé
- *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée de salade
- *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée de lait cru
- *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée d'œuf liquide salé

Les niveaux cibles de contamination obtenus par dilutions des suspensions de *Listeria* étaient :

- 0 UFC/ gramme
- 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 matrices ont été artificiellement contaminées et le laboratoire expert a effectué 2 répétitions par niveau, par la méthode alternative (selon les 2 modes d'ensemencement prévus par le fabricant) et également par la méthode de référence.

Les lectures ont été faites à 45h pour la méthode alternative (selon les 2 modes d'ensemencement prévus par le fabricant) et 48h pour la méthode de référence.

#### **II.1.3. Interprétations statistiques**

Les interprétations statistiques sont effectuées conformément aux exigences de la norme ISO 16140.

Le choix de la méthode de régression linéaire se fait grâce au calcul du rapport R des écarts-types de répétabilité globale :

- Si  $R > 2$ , on utilise la régression linéaire par moindres carrés ordinaires (OLS) et l'axe x pour la méthode de référence.
- Si  $R < \frac{1}{2}$ , on utilise la régression linéaire par moindres carrés ordinaires (OLS) et l'axe y pour la méthode de référence.
- Si  $\frac{1}{2} < R < 2$ , on utilise la régression linéaire orthogonale (GMFR) et l'axe x pour la méthode de référence.

**Tableau 1 - Comparaison ALOA COUNT™ Profondeur / ISO 11290-1**

Matrice	R	Régression utilisée	Rob.F	Valeur critique	P%	Coefficient de corrélation	Droite de régression*
Steack haché	2,07	OLS	14,63	5,41	1%	0,9961	Log ALOA = -0,005+ 0,987 log ISO
Saumon	1,92	GMFR	8,61	5,41	2%	0,9968	Log ALOA = -0,034+ 1,006 log ISO
Laitue	1,07	GMFR	5,89	5,41	4%	0,9992	Log ALOA = 0,053+ 0,980 log ISO
Lait	0,71	GMFR	12,55	5,41	1%	0,9995	Log ALOA = 0,080+ 0,968 log ISO
Œuf	2,28	OLS	5,88	5,41	4%	0,9977	Log ALOA = -0,242+ 1,062 log ISO

\* le choix de l'abscisse et de l'ordonnée dépend du type de régression retenue.

Interprétation statistique : (test de non linéarité)

P > 5% : pas significatif

1% < P < 5% : significatif

P < 1% : très significatif

**Tableau 2 - Comparaison ALOA COUNT™ Surface / ISO 11290-1**

Matrice	R	Régression utilisée	Rob.F	Valeur critique	P%	Coefficient de corrélation	Droite de régression*
Steack haché	1,33	GMFR	6,36	5,41	4%	0,9990	Log ALOA = 0,164+ 0,935 log ISO
Saumon	1,42	GMFR	2,98	5,41	14%	0,9993	Log ALOA = -0,111+ 1,053 log ISO
Laitue	0,73	GMFR	3,03	5,41	13%	0,9998	Log ALOA = -0,031+ 1,004 log ISO
Lait	2,39	OLS	14,27	5,41	1%	0,9939	Log ALOA = -0,269+ 1,069 log ISO
Œuf	2,32	OLS	31,62	5,41	0%	0,9898	Log ALOA = -0,441+ 1,111 log ISO

\* le choix de l'abscisse et de l'ordonnée dépend du type de régression retenue.

Interprétation statistique : (test de non linéarité)

P > 5% : pas significatif

1% < P < 5% : significatif

P < 1% : très significatif

## II.1.4. Discussion

Pour deux matrices en ensemencement surface, les valeurs de P sont supérieures à 5%, le test de non-linéarité est donc non significatif, ce qui permet de conclure à la linéarité de la méthode.

Pour les autres cas, les coefficients de corrélation associés aux valeurs de P inférieures à 5%, obtenus par comparaison de la méthode ALOA COUNT™ à la méthode ISO 11290-1, sont supérieurs ou approximativement égaux à 0,99, valeurs élevées et satisfaisantes, pouvant mettre en défaut la robustesse du test de non-linéarité.

**La linéarité de la méthode ALOA COUNT™ apparaît donc satisfaisante.**

## II.2. Exactitude relative

### II.2.1 Définition

L'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

### II.2.2. Nombre et nature des échantillons : Protocole

Les catégories d'échantillons retenues dans cette étude sont au nombre de 5, avec pour chacune d'entre elles, 3 types comme suit :

- Viandes et charcuteries : Brut / Congelé / Traité à chaud
- Poissons et crustacés : Brut / Fumé / Congelé
- Produits à base de fruits et légumes : Brut / congelé / Produits transformés (4<sup>ème</sup> gamme par exemple)
- Produits laitiers : Brut / Congelé / Fermenté
- Œufs et dérivés : produits crus / produits traités thermiquement / produits transformés

Pour chaque catégorie, un minimum de 10 échantillons positifs exploitables sont analysés par la méthode alternative (selon les 2 modes d'ensemencement prévus par le fabricant) et par la méthode de référence, avec 2 répétitions à chaque fois.

Dans la mesure du possible, la contamination naturelle a été privilégiée. Toutefois, il a été nécessaire de recourir à la contamination artificielle, par mélange avec des produits naturellement contaminés ou par utilisation de souches isolées du même type d'aliment ayant subies un traitement stressant.

Pour chacune des 5 catégories, le nombre d'échantillons testés ainsi que le nombre de résultats exploités par l'une ou l'autre des méthodes sont renseignés dans les tableaux ci-dessous :

<b>Catégorie de produit</b>	<b>Echantillons naturellement positifs</b>	<b>Echantillons artificiellement positifs</b>	<b>TOTAL</b>
Produits carnés	19	11	30
Produits de la mer	0	35	35
Produits végétaux	1	14	15
Produits laitiers	1	25	26
Œufs et dérivés	0	18	18
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>103</b>	<b>124</b>

Les pourcentages d'échantillons naturellement et artificiellement contaminés sont respectivement de 16,8 % et 83,2 %.

**Nombre et nature des échantillons analysés  
ALOA COUNT™ surface / ISO 11290-2**

Catégorie de produit	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs	Nombre de résultats exploités*
		45H	45H
Produits carnés	64	30	18
Produits de la mer	70	35	32
Produits végétaux	47	15	13
Produits laitiers	50	26	24
Œufs et dérivés	48	18	15
<b>TOTAL</b>	<b>279</b>	<b>124</b>	<b>102</b>

**Nombre et nature des échantillons analysés  
ALOA COUNT™ profondeur / ISO 11290-2**

Catégorie de produit	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs	Nombre de résultats exploités*
		45H	45H
Produits carnés	64	30	21
Produits de la mer	70	35	33
Produits végétaux	47	15	14
Produits laitiers	50	26	22
Œufs et dérivés	48	18	16
<b>TOTAL</b>	<b>279</b>	<b>124</b>	<b>106</b>

\* : Le calcul de l'exactitude relative est réalisé selon la norme ISO 16140 par une analyse statistique comparative des valeurs des « Log UFC/g » obtenues selon la méthode de référence et selon la méthode alternative. Dans cette étude, de nombreux échantillons naturellement, et donc par nature, très faiblement contaminés, ont donné lieu à certains résultats de dénombrements qui étaient négatifs selon une méthode ou selon un des deux modes d'ensemencement, pour 1 ou 2 répétitions. Ces échantillons, qui ne peuvent pourtant pas être classés *sensu stricto* comme « aberrants » au sens de la norme ISO 16140, ont donc été exclus pour le calcul de l'exactitude relative.

### II.2.3. Contamination artificielle des échantillons

Le protocole utilisé pour les obtenir correspond à l'option 3 décrite dans l'annexe C du référentiel.

Différentes souches et différentes épreuves de stress ont été utilisées pour la contamination artificielle des échantillons. Le niveau de stress des souches est établi par la différence en Log

entre le dénombrement obtenu sur géloses non sélective et sélective. La synthèse des données concernant la contamination artificielle des échantillons est fournie en [annexe 5](#).

## II.2.4. Protocoles de confirmation

Les confirmations ont été réalisées à partir de :

1 à 5 colonies caractéristiques par boîte de gélose ALOA™ pour la méthode de référence.

1 colonie caractéristique par boîte de gélose ALOA™ pour la méthode alternative, selon ses deux modes d'ensemencement.

La confirmation des colonies caractéristiques a été réalisée selon les modalités de la méthode de référence et selon la méthode ALOA CONFIRMATION™, pour la méthode de référence et pour la méthode alternative (selon les deux modes d'ensemencement).

## II.2.5. Interprétations statistiques

Les interprétations statistiques sont effectuées conformément aux exigences de la norme ISO 16140.

### ALOA COUNT™ Profondeur / ISO 11290-2

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P %	
									Ordonnée à 0	Pente à 1
Fruits et Légumes	14	1,98	GMFR	-0,165	-1,791	1,060	0,902	2,179	10%	39%
Viande et Charcuterie	21	1,17	GMFR	0,041	0,442	0,988	0,273	2,093	66%	79%
Produits laitiers	22	0,86	GMFR	-0,336	-2,060	1,107	1,171	2,086	5%	26%
Œufs et dérivés	16	1,34	GMFR	0,096	1,485	0,970	0,770	2,145	16%	45%
Poissons et Crustacés	33	1,09	GMFR	0,125	1,888	0,961	1,917	2,040	6%	7%
Toutes catégories	106	1,21	GMFR	-0,010	-0,231	0,998	0,122	1,983	90%	82%

\* le choix de l'abscisse et de l'ordonnée dépend du type de régression retenue. a et b sont les coefficients de la droite de régression :  $\log \text{ALOA} = a + b \log \text{ISO}$ ,  $t(a) = \frac{|a|}{\sigma_a}$  et  $t(b) = \frac{|b-1|}{\sigma_b}$ , avec  $\sigma_a$  et  $\sigma_b$  les écart-types respectifs de a et de b.

#### Interprétation statistique :

P > 5% : pas significatif

1% < P < 5% : significatif

P < 1% : très significatif

Catégorie	Biais D	Limite de répétabilité	
		ISO	ALOA COUNT™
Fruits et Légumes	0,003	0,231	0,312
Viande et Charcuterie	0,000	0,250	0,292
Produits laitiers	0,027	0,236	0,285
Œufs et dérivés	-0,018	0,300	0,319
Poissons et Crustacés	0,011	0,135	0,299
Toutes catégories	0,000	0,224	0,300

### ALOA COUNT™ Surface / ISO 11290-2

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P %	
									Ordonnée à 0	Pente à 1
Fruits et Légumes	13	1,93	GMFR	-0,207	-0,982	1,117	0,776	2,201	35%	45%
Viande et Charcuterie	18	1,74	GMFR	0,055	0,431	0,970	0,523	2,120	67%	61%
Produits laitiers	24	1,91	GMFR	-0,103	-0,722	0,999	0,013	2,074	48%	99%
Œufs et dérivés	15	1,14	GMFR	-0,184	-1,163	1,080	0,843	2,160	27%	41%
Poissons et Crustacés	32	0,83	GMFR	0,138	2,809	0,960	2,700	2,042	9%	11%
Toutes catégories	102	1,27	GMFR	-0,031	-0,604	1,003	0,140	1,984	55%	89%

\* le choix de l'abscisse et de l'ordonnée dépend du type de régression retenue. a et b sont les coefficients de la droite de régression :  $\log \text{ALOA} = a + b \log \text{ISO}$ ,  $t(a) = \frac{|a|}{\sigma_a}$  et  $t(b) = \frac{|b-1|}{\sigma_b}$ , avec  $\sigma_a$  et  $\sigma_b$  les écart-types respectifs de a et de b.

#### Interprétation statistique :

P > 5% : pas significatif

1% < P < 5% : significatif

P < 1% : très significatif

Catégorie	Biais D	Limite de répétabilité	
		ISO	ALOA COUNT™
Fruits et Légumes	0,000	0,237	0,351
Viande et Charcuterie	0,014	0,243	0,391
Produits laitiers	0,058	0,305	0,499
Œufs et dérivés	-0,003	0,269	0,382
Poissons et Crustacés	-0,005	0,112	0,282
Toutes catégories	0,005	0,233	0,384

## II.2.6. Discussion

### II.2.6.1. Comparaison des résultats ALOA COUNT™ profondeur aux résultats de la méthode de référence ISO 11290-2

Les tests statistiques valident des ordonnées à l'origine proches de 0 et des pentes proches de 1 pour chacune des catégories étudiées ( $P \geq 5\%$ ).

Pour chacune des catégories étudiées, le biais entre les deux méthodes varie entre -0,018 et 0,027 Log UFC/g. Ces faibles valeurs montrent que la méthode Aloa Count™ profondeur ne manque pas d'exactitude par rapport à la méthode NF EN ISO 11290-2/A1.

Enfin, quelles que soient les catégories de matrices, les limites de répétabilité de la méthode de référence et de la méthode Aloa Count™ sont proches et satisfaisantes.

### II.2.6.2. Comparaison des résultats ALOA COUNT™ surface aux résultats de la méthode de référence ISO 11290-2

Les tests statistiques valident des ordonnées à l'origine proches de 0 et des pentes proches de 1 pour chacune des catégories étudiées ( $P > 5\%$ ).

Pour chacune des catégories étudiées, le biais entre les deux méthodes varie entre -0,005 et 0,058 Log UFC/g. Ces faibles valeurs montrent que la méthode Aloa Count™ surface ne manque pas d'exactitude par rapport à la méthode NF EN ISO 11290-2/A1.

Enfin, quelles que soient les catégories de matrices, les limites de répétabilité de la méthode de référence et de la méthode Aloa Count™ sont proches et satisfaisantes.

### II.2.6.3. Aloa Confirmation™

La méthode Aloa Confirmation™ semble appropriée à la confirmation de *Listeria monocytogenes*. Le laboratoire expert a noté une parfaite correspondance entre les résultats obtenus par et les tests normatifs de confirmation et par la méthode Aloa Confirmation™.

## II.3. Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

### II.3.1 Définitions

Le **niveau critique** (LC) est défini comme la plus petite quantité qui peut être détectée (non nulle), mais non quantifiée comme une valeur exacte. En dessous de cette valeur, il ne peut être assuré que la valeur vraie est nulle.

La **limite de détection** (LOD) est définie comme le niveau supérieur au niveau critique.

La **limite de quantification** (LOQ) est définie comme la plus petite quantité d'analyte (c'est-à-dire le plus petit nombre réel d'organismes) qui peut être mesurée et quantifiée avec une exactitude et une fidélité définies dans les conditions expérimentales de la méthode en cours de validation.

### II.3.2. Protocole

Le laboratoire expert a analysé, par la méthode alternative seulement (selon les 2 modes d'ensemencement prévus par le fabricant), des suspensions d'une souche *Listeria monocytogenes* 4b isolée de viande à six niveaux cibles différents et a réalisé six réplicats par niveau.

Les niveaux visés sont 0,1/ 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 3 bactéries par ml.

Pour chaque niveau de contamination, la valeur effective des inoculums a été établie par 10 dénombrements sur gélose TSAYE.

Une souche de *Listeria monocytogenes* a été numérotée. Plusieurs dilutions ont ensuite été effectuées à partir de cette suspension, afin de se rapprocher des niveaux de contamination demandés.

La contamination a été effectuée selon le protocole suivant :

\* 1 ml dans 100 ml d'EPT (sac)

\* 1mlensemencé sur 10 boîtes (0,1 ml par boîte)

A partir de la numération effectuée sur les 10 boîtes, le rapport de dilution au 1/100ème a été appliqué.

### II.3.3. Résultats

Les interprétations sont données dans les tableaux suivants :

#### ALOA COUNT™ surface

Niveau visé (UFC/g)	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type S0	Biais X0
0,10	0/6	/	/
0,25	1/6	0,408	0,000
0,5	2/6	0,837	0,000
0,75	3/6	0,983	0,500
1	4/6	1,169	1,000
5	6/6	1,366	4,000

La limite critique(LC), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées à partir des valeurs obtenues pour le niveau 0,75.

	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 * S0 + X0$	2,122
LOD	$3,3 * S0 + X0$	3,745
LOQ	$10 * S0 + X0$	10,332

### ALOA COUNT™ profondeur

Niveau	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type S0	Biais X0
0,10	0/6	/	/
0,25	1/6	0,408	0,000
0,5	3/6	1,169	0,500
0,75	4/6	0,753	1,00
1	5/6	0,632	1,000
5	5/6	2,639	3,500

La limite critique(LC), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées à partir des valeurs obtenues pour le niveau 0,5.

	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 * S0 + X0$	2,429
LOD	$3,3 * S0 + X0$	4,358
LOQ	$10 * S0 + X0$	12,190

#### II.4. Sensibilité relative

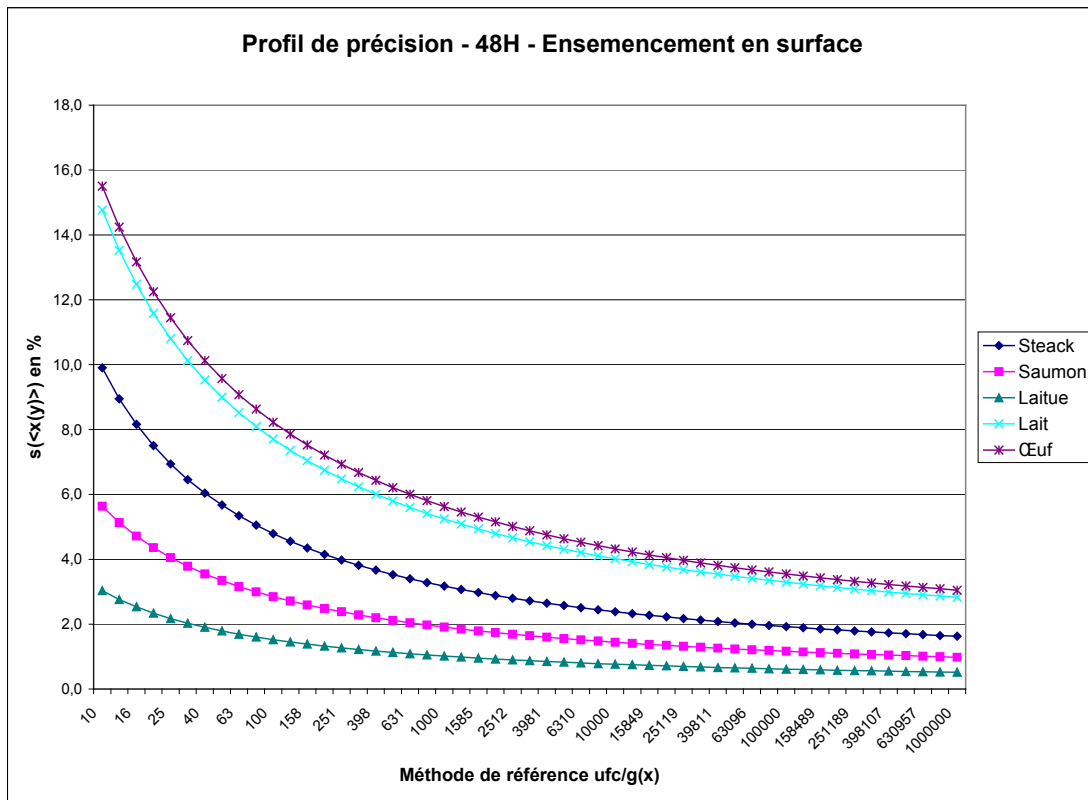
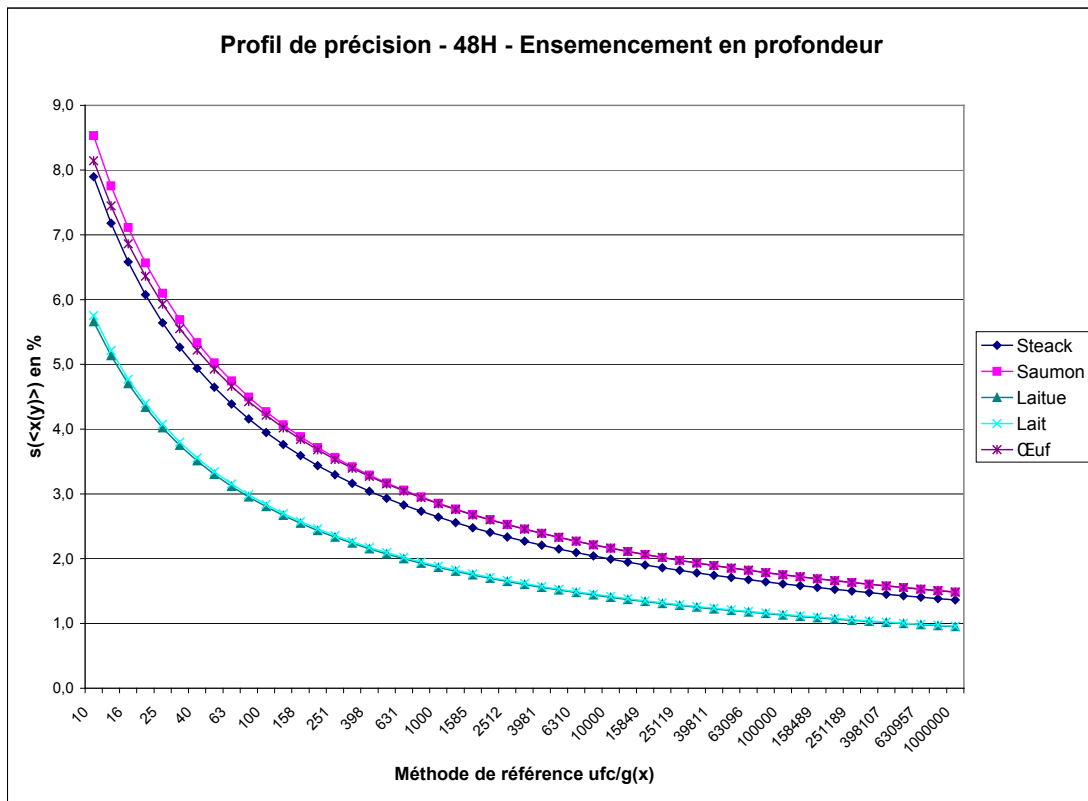
##### II.4.1 Définition

La sensibilité relative est définie comme la capacité de la méthode alternative à détecter deux quantités différentes d'analyte qui ont été mesurées avec la méthode de référence en utilisant une matrice donnée sur l'étendue de mesure. C'est la variation de quantité minimale (accroissement de la concentration d'analyte x) qui donne une variation significative du signal mesurée (réponse y).

##### II.4.2 Protocole

Les données sont intrinsèques à la méthode. Elles sont obtenues à partir des résultats obtenus dans l'étude de linéarité.

Les profils de précision obtenus pour les différentes matrices sont présentés ci-après :



## II.5. Spécificité/ Sélectivité

Cette partie a été traitée lors de la validation de l'ALOA ONE DAY™ pour la recherche de *Listeria monocytogenes*, aucun autre essai n'a été réalisé pour ces paramètres. Les résultats étaient les suivants :

- 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.

## II.6. Praticabilité

La praticabilité a été étudiée en fonction des 13 critères définis par le bureau technique.

### 1 - Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Les boîtes de gélose ALOA<sup>R</sup> sont conditionnées par paquet de 10 sous film plastique thermorétracté et expédiées par carton de 20 unités ou de 120 unités.

Le kit pour 1 litre « base + suppléments » est constitué de 5 flacons de 200 ml + suppléments (expédié par carton).

### 2 - Volume des réactifs

Chaque boîte de gélose ALOA<sup>R</sup> précoulée contient 16 ml de milieu sélectif (diamètre 90 mm) ou 60 ml de milieu sélectif (diamètre 140 mm).

Chaque flacon de gélose ALOA<sup>R</sup> a un volume de 200 ml.

### 3 - Conditions de stockage et péremption des produits non ouverts

La température de stockage des géloses ALOA<sup>R</sup> est celle mentionnée sur la notice technique du fabricant : 2 à 8° C.

La date limite d'utilisation est indiquée sur le fond des boîtes de gélose ALOA<sup>R</sup> (impression jet d'encre). Elle correspond à un délai de 10 semaines après fabrication.

Pour les flacons, la date limite d'utilisation est également mentionnée sur chaque flacon. Elle correspond à un délai de 1 an après fabrication.

Les boîtes coulées par le laboratoire utilisateur à partir de flacons prêts à l'emploi peuvent être conservées pendant une semaine entre 2 et 8°C.

### 4 - Modalités d'utilisation après première utilisation

Sans objet pour la gélose ALOA<sup>R</sup> en boîte précoulée.

Les modalités d'utilisation après première utilisation sont spécifiées dans la fiche technique du fabricant. En l'occurrence :

Les boîtes coulées par le laboratoire utilisateur à partir de flacons prêt à l'emploi peuvent être conservées pendant une semaine entre 2 et 8°C.

Par ailleurs, les flacons d'ALOA<sup>TM</sup> BASE non complétés peuvent subir deux cycles de régénération et de maintien en surfusion sans que la qualité analytique des résultats obtenus par la méthode alternative ne soit réduite.

### **5 - Equipements ou locaux spécifiques nécessaires**

La nature des équipements et les locaux nécessaires à la réalisation des analyses selon le mode d'emploi du fabricant de la méthode alternative sont du même niveau que ceux prescrits dans la méthode de référence.

### **6 - Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer**

Les boîtes de gélose ALOA<sup>R</sup> sont disponibles en prêt à l'emploi.

Les kits ALOA<sup>TM</sup> sont prévus pour la fabrication de 5 fois 200 ml, soit 1 litre de milieu prêt à l'emploi.

Le milieu est également disponible sous forme déshydratée plus suppléments.

### **7 - Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode**

½ journée

### **8 - Temps réel de manipulations et flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser**

#### **Cas de l'ensemencement en surface (pour un même volume analysé) :**

La méthode alternative présente l'avantage de ne nécessiter que l'ensemencement par étalement d'une seule boîte ALOA<sup>R</sup> par rapport aux 2 boîtes prévues dans la méthode de référence.

#### **Cas de l'ensemencement en profondeur (pour un même volume analysé):**

La méthode alternative présente l'avantage de ne nécessiter que l'ensemencement en profondeur d'une seule boîte ALOA<sup>R</sup> par rapport aux 6 boîtes prévues dans la méthode de référence.

Dans le cadre des confirmations des colonies caractéristiques, la méthode alternative permet de ne repiquer qu'une seule colonie au lieu des cinq mentionnées dans la méthode de référence. ALOA CONFIRMATION<sup>TM</sup> peut être utilisé à la place des tests normatifs, permettant de gagner jusqu'à 4 jours par rapport à la méthode de référence. Le gain financier de ce mode de confirmation est par ailleurs très notable pour le laboratoire utilisateur.

Il convient également de noter que la souplesse d'utilisation autorise l'induction de l'analyse le vendredi, avec étalement le samedi, pour une lecture finale le lundi, sans obligation pour le manipulateur, d'intervenir le dimanche. En effet, la notice prévoit un temps d'incubation de 24h à 48h.

Cet avantage majeur peut, bien entendu, se transposer sur la gestion des calendriers composés de jours fériés.

## **9 - Délai d'obtention des résultats**

- Cas des résultats négatifs :

**Méthode de référence NF EN ISO 11290-2** : 48 heures.

**Méthode alternative ALOA COUNT™** : 48 heures.

- Cas des résultats positifs :

**Méthode de référence NF EN ISO 11290-2**

Temps minimum de rendu de résultats : 4 jours

Lecture des géloses à 48h / Passage sur TSAYE : 24h / Tests normatifs probants à 24h

Temps maximum de rendu de résultats : 8 jours

Lecture des géloses à 48h / Passage sur TSAYE : 24h / Tests normatifs probants à 5j

**Méthode alternative ALOA COUNT™**

Temps minimum de rendu de résultats : 3 jours

Lecture de la gélose à 48h (colonies isolées) / Confirmation par Aloa confirmation™ : 24h

Temps maximum de rendu de résultats : 8 jours

Lecture de la gélose à 48h / Passage sur TSAYE : 24h / Tests normatifs probants à 5j

## **10 - Type de qualification de l'opérateur**

Il est identique au niveau requis pour la méthode de référence.

## **11- Étapes communes avec la méthode de référence**

Indépendamment des étapes éventuelles de confirmation, la méthode alternative et la méthode de référence se confondent parfaitement en terme d'étapes communes et de milieu.

La méthode alternative autorise un ensemencement en profondeur.

## **12 - Traçabilité éventuelle des résultats d'analyses**

Au même titre que la méthode de référence, la traçabilité des résultats d'analyses repose sur le relevé des numéros de lots de gélose ainsi que sur le suivi des fiches de contrôle qualité fournies par AES Chemunex et les épreuves de stérilité et de fertilité que le laboratoire peut gérer en interne dans le cadre de ses exigences Qualité.

## **13 - Maintenance par le Laboratoire**

Aucune.

### **III. CONCLUSION DE L'ETUDE PRELIMINAIRE**

---

Les résultats de cette étude préliminaire permettent de conclure que la méthode ALOA COUNT™ (dans ses protocoles « surface » et « profondeur ») :

- a une limite de répétabilité similaire à celles de la méthode de référence,
- démontre une linéarité satisfaisante pour toutes les catégories confondues quelque soient le mode d'ensemencement et le temps d'incubation
- démontre une exactitude relative satisfaisante pour toutes les catégories prises individuellement et pour toutes catégories confondues
- démontre une spécificité et une sélectivité analogues à celles de la méthode de référence.

La méthode AOLA COUNT™ offre, par ailleurs et à un niveau de performances analytiques équivalent à la méthode de référence (NF EN ISO 1290-2/A1 :2005), des gains très importants en termes :

- de réduction des coûts analytiques et des coûts de destruction des déchets contaminés associés pour les dénombrements de *Listeria monocytogenes* dans les aliments par rapport à la méthode de référence (main œuvre, coût et volumes de réactifs nécessaires),
- de réduction des coûts de confirmation si utilisation d'ALOA CONFIRMATION™. Une seule colonie est à confirmer quand cinq sont requises par la méthode de référence.
- de réduction des volumes d'incubation au sein du laboratoire utilisateur de la méthode (réduits par 6 par rapport à la méthode de référence / ALOA COUNT™ si ensemencement en profondeur),
- d'homogénéité analytique pour les laboratoires utilisateurs des méthodes ALOA ONE DAY™, ALOA COUNT™ et des méthodes de référence ISO 11290,
- de gestion des stocks de réactifs pour les laboratoires qui proposent à la fois les méthodes alternatives (ALOA ONE DAY™ et ALOA COUNT™) et les méthodes de référence ISO 11290-1 et ISO 11290-2. La gélose ALOA™ répond en effet aux différents référentiels.
- de formation des techniciens à la lecture des tests (lecture équivalente pour ALOA™ pour les méthodes ALOA ONE DAY™, ALOA COUNT™ mais aussi pour les méthodes ISO de référence).

### **IV. ETUDE COLLABORATIVE**

---

#### **IV.1 Organisation de l'étude**

##### **IV.1.1 Laboratoires collaborateurs et instructions**

Treize laboratoires ont participé à l'étude collaborative lors des envois n°1 et n°2.

Parmi ces treize laboratoires, neuf ont participé aux envois n°1, n°2, n°3.

Les laboratoires collaborateurs ont été choisis au regard de leur maîtrise d'utilisation de la gélose ALOA™.

#### IV.1.2 Modalités de préparation et de contamination des échantillons

La matrice Lait pasteurisé (avec une flore aérobie mésophile non nulle) a été retenue dans le cadre de cette étude. Les échantillons ont été contaminés à différents taux avec une souche de *Listeria monocytogenes* 4b isolée d'un produit laitier.

Les taux d'inoculation sont les suivants :

- < 10 UFC/ml
- 10 à 100 UFC/ml
- 100 à 1 000 UFC/ml
- 1000 à 10 000 UFC/ml
- 10 000 à 100 000 UFC/ml

Trois envois ont été réalisés au total.

En effet, lors de la préparation des échantillons pour l'envoi initial du colis, il s'est produit une erreur de manipulation, augmentant d'une puissance de 10 les taux visés. Ainsi, les laboratoires collaborateurs ont reçu des échantillons avec les niveaux suivants : <10 UFC/ ml, 100 à 1 000 UFC/ ml, 1000 à 10 000 UFC/ ml et 10 000 à 100 000 UFC/ ml. Un 5<sup>ème</sup> niveau a donc été testé : 10 000 à 100 000 UFC/ ml.

Un second envoi, **dans les mêmes conditions et avec les échantillons réservés à la numération des microorganismes aérobies à 30°C et à la prise de température**, a eu lieu la semaine suivante avec les échantillons contaminés avec un taux de 10 à 100 UFC/ ml.

Un troisième envoi a été effectué à la demande du Bureau Technique AFNOR, pour réaliser de nouveau l'étude sur uniquement deux niveaux de contaminations intermédiaires, en intégrant un ensemencement supplémentaire dans le protocole (0,1 ml de la suspension mère) : 100 à 1 000 UFC/ml et 1 000 à 10 000 UFC/ ml. Le troisième envoi n'a été réalisé que pour neuf laboratoires collaborateurs. Après examen de l'ensemble des résultats obtenus par ces derniers au cours du dernier envoi, il n'a été retenu que huit laboratoires pour l'interprétation statistique (élimination pour cause de non respect du protocole).

Chaque échantillon était constitué de 25 à 30 ml de matrice, contaminée ou non.

Pour chacun des niveaux visés, chaque laboratoire collaborateur a reçu deux échantillons.

Par ailleurs, chaque laboratoire a également reçu un échantillon pour la prise de température à réception (contenant également un enregistreur de température TOMPROBRE<sup>TM</sup>) de même qu'un échantillon pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile de la matrice retenue pour essai.

Au final :

- quatre laboratoires collaborateurs ont donc reçu un total de 10 échantillons contaminés ou non, ainsi que 4 échantillons (2 x 2 envois) pour la prise de température et la numération de la flore totale.
- neuf laboratoires collaborateurs ont donc reçu un total de 14 échantillons contaminés ou non (5 échantillons en double lors des 2ers envois et 2 échantillons en double lors du 3<sup>ème</sup> envoi), ainsi que 6 échantillons (2 x 3 envois) pour la prise de température et la numération de la flore totale.

### IV.1.3 Modalités d'expédition

Chaque échantillon a bénéficié d'un code unique (établi par le laboratoire Expert et à sa seule connaissance). Les échantillons ont été expédiés par voie express (24H maximum) dans des conteneurs isothermes contenant des blocs réfrigérants de manière à garantir la meilleure inertie thermique.

Les échantillons pour analyse devaient être reçus par les différents laboratoires dans un délai n'excédant pas 24H. La température à réception des échantillons devait être inférieure ou égale à 8°C. Les températures mesurées à réception, grâce à l'échantillon prévu à cet effet, ont été communiquées le jour même de réception au Laboratoire Expert.

Par ailleurs, l'analyse des données TOMPROBE™ (dispositifs retournés par les laboratoires collaborateurs) permettra au laboratoire Expert de vérifier que la température a été comprise entre 0 et 8°C pendant tout le transport.

Remarque : le laboratoire Expert a effectué également un envoi à son attention et dans les mêmes conditions afin de mesurer l'incidence du transport sur les résultats (analyse comparative d'échantillons équivalents avec et sans transport – suivi des températures durant le transport).

### IV.1.4 Analyses

Le jour même de réception des échantillons, les laboratoires collaborateurs et le laboratoire Expert ont effectué, pour chaque échantillon destiné au dénombrement de *Listeria monocytogenes*, les analyses selon les modalités de la méthode alternative ALOA COUNT™ et selon la méthode de référence.

Chaque laboratoire collaborateur a effectué par ailleurs un dénombrement de la flore aérobie mésophile totale sur l'échantillon prévu à cet effet.

Le laboratoire Expert a effectué l'analyse d'échantillons équivalents ayant ou n'ayant pas subis l'étape de transport.

Par ailleurs, le laboratoire Expert a effectué une étude de stabilité (sur trois jours) afin de vérifier que les niveaux de contamination en *Listeria monocytogenes* et en flore aérobie mésophile totale n'évoluent pas pour la matrice testée et dans les conditions retenues pour l'essai (maintien entre 0 et 8°C).

Après proposition du laboratoire Expert et acceptation du Bureau Technique, il a été défini que :

- un seul des deux protocoles d'ensemencement (« surface »/ « profondeur ») ne soit retenu lors de l'étude interlaboratoire. Le protocole « ensemencement en surface » étant le plus proche de la méthode de référence, le protocole « ensemencement en profondeur » a été le plus intéressant à expérimenter dans le cadre de cette étude collaborative.
- seul le protocole le plus innovant ne soit retenu pour la confirmation des positifs obtenus par la méthode alternative : confirmation avec la méthode ALOA CONFIRMATION™

En effet, la méthode alternative prévoit trois possibilités pour la confirmation de positifs (Cf. Fiche Technique fabricant, [annexe 3](#)).

- pour la méthode de référence (et compte tenu de la connaissance exhaustive des caractères phénotypiques de la souche de *Listeria monocytogenes* 4b contaminante retenue dans cette étude), les tests normatifs soient remplacés par la mise en œuvre d'une galerie biochimique identifiante, notamment « MICROGEN LISTERIA™ » qui intègre en particulier la mise en œuvre d'assimilation des sucres (dont rhamnose et xylose) de même que le caractère hémolytique de la souche testée

Les consommables ont été fournis par le fabricant.

Lors des envois, un dossier complet précisant les modalités de l'étude et les instructions à suivre a été transmis par le laboratoire Expert à chaque laboratoire collaborateur avant la réalisation des essais, ainsi qu'un tableau pré-établi et standardisé en vue du renseignement des résultats observés (température à réception, résultats dénombrements 24 et 48H, confirmations ...).

## **IV.2 Contrôle des paramètres expérimentaux**

Pour les trois envois, afin de vérifier la stabilité de la souche *Listeria monocytogenes* 4b, un dénombrement a été effectué le jour de l'inoculation et après 72 heures de conservation à 4°C. Aucune évolution de la souche dans la matrice au cours du temps n'est observée.

Une étude de stabilité de la flore totale a également été réalisée : un dénombrement a été effectué le jour de l'inoculation et après 72 heures de conservation à 4°C : Aucune évolution de la souche dans la matrice au cours du temps n'est observée.

Tous les colis ont été livrés à J1, en bon état.

Aucune anomalie n'a été observée pendant le transport, la température a bien été maintenue en dessous de 8°C .

## **IV.3 Résultats des analyses**

### **IV.3.1 Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs**

La synthèse des résultats est la suivante :

**Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs**  
**Méthode ALOA COUNT™ / NF ISO 11290-2/ A1**

Laboratoires	Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3				Niveau 4				Niveau 5			
	ISO		Aloa Count™		ISO		Aloa Count™		ISO		Aloa Count™		ISO		Aloa Count™		ISO		Aloa Count™	
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 1	Rép. 2
<b>A</b>	<1	<1	<1	<1	1,398	1,602	1,477	1,301	2,820	2,792	2,875	2,881	3,778	3,881	3,633	3,681	4,464	4,515	4,515	4,450
<b>B</b>	<1	<1	<1	<1	1,398	1,176	1,477	1,477	2,898	2,903	2,748	2,881	3,820	3,845	3,732	3,708	4,422	4,497	4,515	4,301
<b>C</b>	<1	<1	<1	<1	1,875	1,477	1,602	0,954	2,833	2,813	2,708	2,716	3,851	3,914	3,748	3,763	4,428	4,428	4,502	4,356
<b>D</b>	<1	<1	<1	<1	1,653	1,477	1,845	1,000	2,613	2,778	2,690	2,724	3,690	3,716	3,580	3,623	4,490	4,436	4,389	4,436
<b>E</b>	<1	<1	<1	<1	1,477	1,398	1,602	1,778	2,740	2,820	2,813	2,771	3,863	3,826	3,771	3,716	4,382	4,550	4,450	4,422
<b>F</b>	<1	<1	<1	<1	1,602	1,477	1,602	1,903	2,785	2,806	2,875	2,799	3,771	3,799	3,785	3,756	4,572	4,470	4,389	4,356
<b>G</b>	<1	<1	<1	<1	1,544	1,301	1,477	1,477	2,833	2,869	2,771	2,778	3,813	3,886	3,813	3,949	4,484	4,621	4,190	4,464
<b>H</b>	<1	<1	<1	<1	1,176	1,176	1,477	1,301	2,792	2,820	2,724	2,851	3,763	3,845	3,771	3,875	4,515	4,662	4,436	4,373
<b>I</b>	<1	<1	<1	<1	1,477	1,398	1,477	1,477	2,778	2,892	2,732	2,663	3,602	3,881	3,756	3,663	4,587	4,566	4,407	4,450
<b>J</b>	<1	<1	<1	<1	1,301	1,000	1,301	1,477	/	/	/	/	/	/	/	/	4,490	4,533	4,561	4,407
<b>L</b>	<1	<1	<1	<1	1,477	1,544	1,699	1,477	/	/	/	/	/	/	/	/	4,533	4,497	4,373	4,422
<b>L</b>	<1	<1	<1	<1	1,301	1,544	1,000	1,477	/	/	/	/	/	/	/	/	4,398	4,356	4,422	4,322
<b>M</b>	<1	<1	<1	<1	1,477	1,301	1,000	1,301	/	/	/	/	/	/	/	/	4,959	5,127	4,658	4,630

### IV.3.2 Commentaires

Quatre laboratoires (nommés J, K, L, M) ont été exclus pour non respect du protocole envoyé (envois 1 et 2). En effet, il a été demandé d'ensemencer 1 ml pour la suspension mère, puis 0,1ml pour les autres dilutions. Au vu des résultats bruts (nombre de colonies brutes) et après confirmation des laboratoires concernés, il s'avère que ces quatre laboratoires ont ensemencé 1 ml sur les dilutions suivant la suspension mère pour la méthode de référence.

Le troisième envoi n'a pas été effectué pour les laboratoires J, K, L, M.

Le laboratoire I a également été exclu pour non respect du protocole envoyé (envoi n°3). En effet, une seule boîte a été ensemencée avec 0,1 ml de la suspension mère, au lieu des deux demandées.

Au final, huit laboratoires collaborateurs ont été conservés pour l'étude statistique.

### IV.4 Définitions et calculs

*Exactitude* : « Etreteuse de l'accord entre un résultat d'essai et la valeur de référence acceptée ».

*Fidélité* : « Etreteuse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité stipulés ».

*Répétabilité* : « Etreteuse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec la même méthode en utilisant un matériau d'essai identique, dans des conditions identiques (appareillage, opérateur, laboratoires et intervalles de temps courts, c'est-à-dire des conditions de répétabilité) ».

*Limite de répétabilité* ( $r$ ) : « Valeur inférieure ou égale à laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essais obtenus dans des conditions de répétabilité est attendue avec une probabilité de 95% ».

*Reproductibilité* : « Etreteuse d'accord entre des résultats d'essai individuels effectués sur un matériau d'essai identique en utilisant la même méthode et obtenus par des opérateurs de différents laboratoires utilisant un équipement différent (c'est-à-dire dans des conditions de reproductibilité) ».

*Limite de reproductibilité* ( $R$ ) : « Valeur inférieure ou égale à laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus dans des conditions de reproductibilité est attendue avec une probabilité de 95% ».

## ① Exactitude relative

### Valeurs de t(d) obtenues par niveau pour le Test de Student

Niveau	Biais D	t(d)	T critique (5%)	Conclusion
1	/	/	/	/
2	0,12	1,596	2,365	Biais D non significatif
3	0,00	-0,103	2,365	Biais D non significatif
4	-0,10	-3,395	2,365	Biais D non significatif
5	-0,05	-2,298	2,365	Biais D non significatif

Quels que soient les niveaux, les biais sont non significatifs, ce qui permet de conclure que la méthode ALOA COUNT<sup>TM</sup> ne manque pas d'exactitude par rapport à la méthode de référence.

## ② Répétabilité

### Valeurs obtenues pour la limite de répétabilité et pour le Test F

Niveau	Limite de répétabilité		F calculé ou (1/F)*	F critique	P%
	Méthode de référence	Méthode alternative			
1	/	/	/	/	/
2	0,439	0,294	0,448	3,44	86%
3	0,118	0,187	2,500	3,44	11%
4	0,131	0,266	4,129	3,44	3%
5	0,160	0,105	0,430	3,44	87%

#### Interprétation statistique :

P > 5% : pas significatif

1% < P < 5% : significatif

P < 1% : très significatif

D'après les valeurs ci-dessus résultants des tests statistiques effectués avec un risque de 5%, les méthodes comparées ont une répétabilité égale pour les niveaux 2, 3 et 5.

Pour le 4<sup>ème</sup> niveau, on constate une différence de répétabilité significative au risque de 5% (0,131 contre 0,266 pour le niveau 3). Cependant, la valeur de F calculée n'est que légèrement supérieure à la valeur de F critique ; on remarque d'ailleurs qu'au risque de 2%, le test F accepte que les deux méthodes aient une répétabilité égale (valeur de F critique = 4,79).

On peut donc conclure que la répétabilité de la méthode ALOA COUNT<sup>TM</sup> ne diffère pas de la méthode de référence.

### ③ Reproductibilité

#### Valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité et pour le Test F

Niveau	Limite de reproductibilité		F calculé	F critique (5%)	P%
	Méthode de référence	Méthode alternative			
1	/	/	/	/	/
2	0,591	0,469	0,631	3,79	74%
3	0,131	0,203	2,401	3,79	12%
4	0,167	0,282	2,859	3,79	8%
5	0,244	0,169	0,480	3,79	84%

#### Interprétation statistique :

P > 5% : pas significatif

1% < P < 5% : significatif

P < 1% : très significatif

D'après les résultats ci-dessus résultants des tests statistiques effectués avec un risque de 5%, les méthodes comparées ont une reproductibilité égale quels que soient les niveaux.

#### Valeurs obtenues pour le Test F de dispersion homogène entre les laboratoires

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative	F critique (5%)
	F ou 1/F	F ou (1/F)*	
1	/	/	/
2	1,240	0,647	3,50
3	4,414	5,613	3,50
4	1,592	7,866	3,50
5	0,755	0,627	3,50

Niveau critique : F et 1/F < F critique.

Le tableaux ci-dessus permet de se rendre compte de l'homogénéité de la dispersion entre les laboratoires, en évaluant si les différences entre laboratoires sont ou non inférieures à la dispersion interne typique de détermination :  $F = 2(s_T/S_r)^2$ .

Les résultats du test F concluent à une bonne homogénéité de la dispersion entre les laboratoires pour les niveaux 2 et 5.

La dispersion est non homogène concernant la méthode de référence et la méthode alternative pour le niveau 3, et l'est également pour la méthode alternative pour le niveau 4 ( $F > F_{critique} = 3,50$ ).

## Rapport reproductibilité / répétabilité

Niveau	Limite de reproductibilité / Limite de répétabilité	
	Méthode de référence	Méthode alternative
1	/	/
2	1,344	1,595
3	1,107	1,085
4	1,276	1,062
5	1,525	1,611

Le rapport de reproductibilité / répétabilité doit être  $< 2$ .

Pour tous les niveaux testés, les valeurs du rapport R/r observé est systématiquement acceptable pour les 2 méthodes.

### IV.5 Compléments de praticabilité

Sans objet, l'ensemble des critères a été renseigné à la suite de l'étude préliminaire.

### IV.6 Conclusion de l'étude interlaboratoire

- De manière générale, les biais entre les deux méthodes apparaissent non significatifs, les limites de répétabilité et limites de reproductibilité sont comparables entre les deux méthodes.

## V. CONCLUSION GENERALE

**Les résultats de l'étude préliminaire** permettent de conclure que la méthode ALOA COUNT™ (dans ses protocoles « surface » et « profondeur ») :

- a une limite de répétabilité similaire à celles de la méthode de référence,
- démontre une linéarité satisfaisante pour toutes les catégories confondues quelque soient le mode d'ensemencement et le temps d'incubation
- démontre une exactitude relative satisfaisante pour toutes les catégories prises individuellement et pour toutes catégories confondues
- démontre une spécificité et une sélectivité analogues à celles de la méthode de référence.

La méthode ALOA COUNT™ offre, par ailleurs et à un niveau de performances analytiques équivalent à la méthode de référence (NF EN ISO 1290-2/A1 :2005), des gains très importants en termes :

- de réduction des coûts analytiques et des coûts de destruction des déchets contaminés associés pour les dénombrements de *Listeria monocytogenes* dans les aliments par rapport à la méthode de référence (main œuvre, coût et volumes de réactifs nécessaires),

- de réduction des coûts de confirmation si utilisation d'ALOA CONFIRMATION™. Une seule colonie est à confirmer quand cinq sont requises par la méthode de référence.
- de réduction des volumes d'incubation au sein du laboratoire utilisateur de la méthode (réduits par 6 par rapport à la méthode de référence / ALOA COUNT™ si ensemencement en profondeur),
- d'homogénéité analytique pour les laboratoires utilisateurs des méthodes ALOA ONE DAY™, ALOA COUNT™ et des méthodes de référence ISO 11290,
- de gestion des stocks de réactifs pour les laboratoires qui proposent à la fois les méthodes alternatives (ALOA ONE DAY™ et ALOA COUNT™) et les méthodes de référence ISO 11290-1 et ISO 11290-2. La gélose ALOA™ répond en effet aux différents référentiels.
- de formation des techniciens à la lecture des tests (lecture équivalente pour ALOA™ pour les méthodes ALOA ONE DAY™, ALOA COUNT™ mais aussi pour les méthodes ISO de référence).

**Les résultats de l'étude collaborative** permettent de conclure que, de manière générale, entre la méthode de référence et la méthode ALOA COUNT™ (dans son protocole « profondeur »), les biais apparaissent non significatifs, les limites de répétabilité et limites de reproductibilité sont comparables.

**Fait à TOURS, le 01/11/2006**

**Nicolas GAILLARD**  
Responsable section Hygiène Alimentaire

## **ANNEXE 1**

**Protocole analytique  
Méthode ALOA COUNT™  
ENSEMENCEMENT EN PROFONDEUR**

**DENOMBREMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LES ALIMENTS**  
**METHODE ALOA COUNT™**  
**PROTOCOLE ANALYTIQUE – ENSEMENCEMENT EN PROFONDEUR**

X g ou X ml de prise d'essai + 9 X ml d'EPT

↓  
**1 heure +/- 5 mn à 20°C +/- 2°C**

Ensemencement en profondeur de 1 ml  
dans environ 15 ml de gélose ALOA™ refroidie à 47 +/- 2°C \*

↓  
48H +/- 3H à 37°C +/- 1°C

colonies typiques ?

OUI →

Présomption  
*L. monocytogenes*

NON ↓

Moins de x  
*L. monocytogenes*  
par gramme de produit

↓  
**Confirmer une colonie**  
**ALOA CONFIRMATION™**  
OU  
TESTS NORMATIFS  
CLASSIQUES  
X LM / g de produit

\* : même mode d'ensemencement pour  
les dilutions successives (si nécessaire)  
– 1 seule boîte par dilution

## **ANNEXE 2**

**Protocole analytique  
Méthode ALOA COUNT™  
ENSEMENCEMENT EN SURFACE**

**DENOMBREMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LES ALIMENTS**  
**METHODE ALOA COUNT™**  
**PROTOCOLE ANALYTIQUE – ENSEMENCEMENT EN SURFACE**

X g ou X ml de prise d'essai + 9 X ml d'EPT

↓  
**1 heure +/- 5 mn à 20°C +/- 2°C**

0,1 ml étalement sur ALOA™ (diamètre 90 mm)\*  
1 ml étalement sur ALOA™ (diamètre 140 mm)\*

↓  
48H +/- 3H à 37°C +/- 1°C

colonies typiques ?

OUI →

Présomption  
*L. monocytogenes*

NON ↓

Moins de x  
*L. monocytogenes*  
par gramme de produit

↓  
**Confirmer une colonie**  
ALOA CONFIRMATION™  
OU  
TESTS NORMATIFS  
CLASSIQUES  
X LM / g de produit

\* : même mode d'ensemencement pour les dilutions successives (si nécessaire)  
– 1 seule boîte par dilution, sauf pour l'option 1 ml étalé sur 3 boîtes de diamètre 90 mm

## **ANNEXE 3**

**Notices techniques et d'utilisation**

## **DOCUMENT AES**

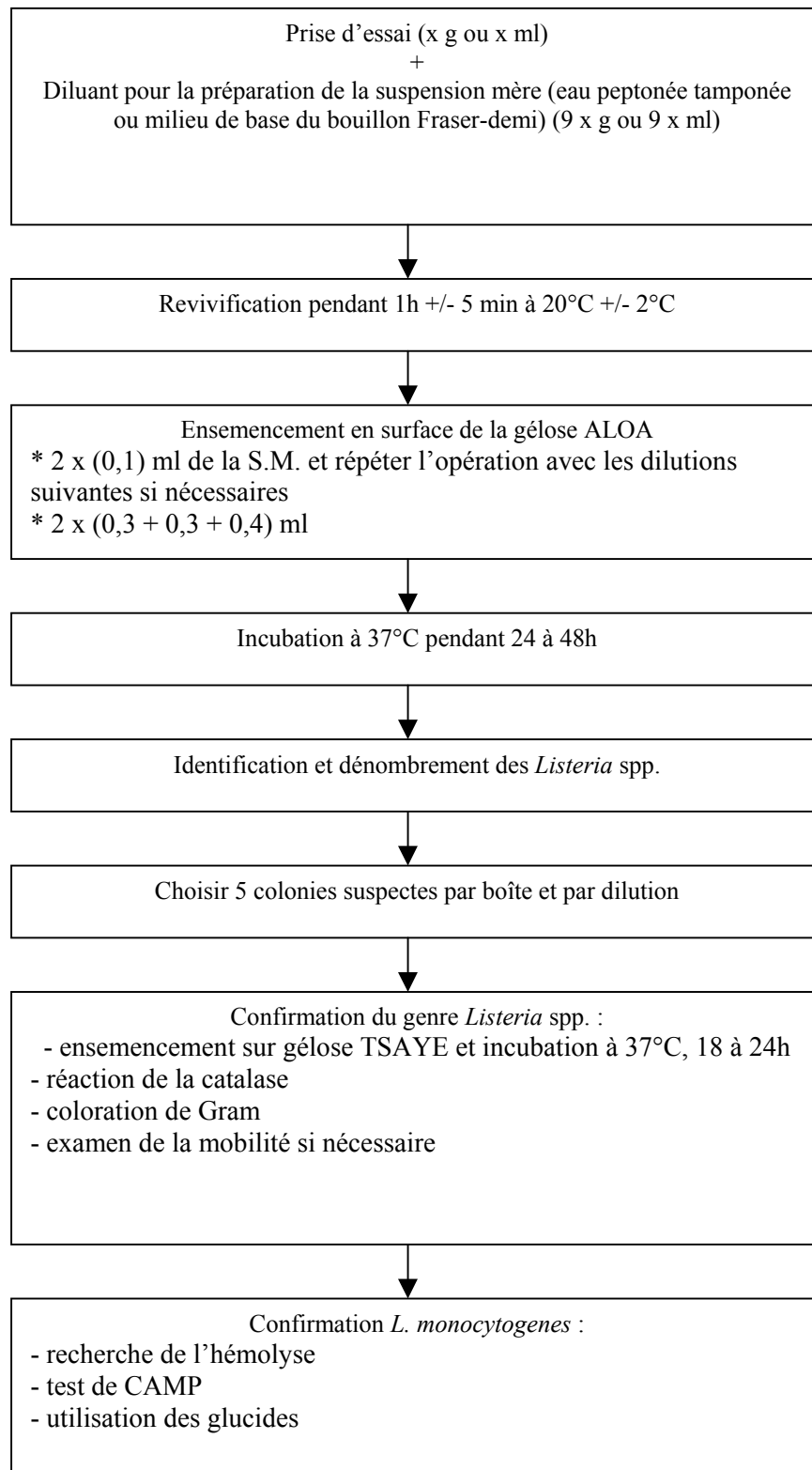
## **DOCUMENT AES**

## **DOCUMENT AES**

## **ANNEXE 4**

**Mode opératoire de la méthode  
NF EN ISO 11290-2/A1**

## MODE OPERATOIRE DE LA METHODE NF EN ISO 11290-2/A1



## **ANNEXE 5**

**Exactitude relative : données de contamination  
artificielle des échantillons**

## Données de contamination artificielle des échantillons

Réf. matrice	Matrice	Souche utilisée	Origine	Type de stress	delta log (Milieu sélectif / milieu non sélectif)
		L. mono lait	Lait cru	-18°C, 24h	0,81
38.6	Bâtonnet sorbet citron				
38.7	Bâtonnet giga noir				
38.8	Piccola mini				
38.9	Euro Ice cream				
38.10	Iso Cup vanille/ chocolat				
38.14	Bâtonnet giga blanc				
		L. mono viande	steak haché	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,66
49.13	Rillettes				
49.14	Terrine campagne				
50.18	Poire de Charolais				
50.22	Chipolatas				
50.23	Crépinette				
		L. mono ovoproduits	œuf liquide	55°C, 25 min	0,88
52.21	Mille-feuilles				
52.26	Gland vanille				
53.13	Blanc d'œuf				
		L. mono ovoproduits	œuf liquide	55°C, 15 min	0,79
52.19	Framboisier				
52.20	Tarte aux pommes				
53.12	Œufs durs				
		L. mono ovoproduits	œuf liquide	55°C, 15 min	0,78
52.8	Flan coco				
52.9	Mousse chocolat				
52.10	Crème brûlée				
		L. mono lait	Lait cru	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,79
42.11	Fromage de chèvre				
42.12	Fromage de chèvre				
42.13	Fromage de chèvre				
42.14	Fromage de chèvre				
42.15	Fromage de chèvre				
42.16	Fromage de chèvre				
42.19	Chaurce				
42.20	Gaperon				
42.22	Fromage à raclette				

<b>Réf. matrice</b>	<b>Matrice</b>	<b>Souche utilisée</b>	<b>Origine</b>	<b>Type de stress</b>	<b>delta log (Milieu sélectif / milieu non sélectif)</b>
		LM pêche	saumon fumé	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,65
35.9	Filet de saumon				
35.10	Filet de lieu noir				
35.11	Filet de perche				
		L. mono ovoproduits	œuf liquide	55°C, 15 min	0,81
52.11	Gratin de framboises				
52.12	Mangari				
52.13	Abricotier				
53.4	Blanc d'œuf				
53.5	Jaune d'œuf				
53.6	Œufs durs				
		L. mono ovoproduits	œuf liquide	55°C, 25 min	0,74
52.14	Tête de nègre				
52.15	Paris-Brest				
52.16	Gland				
52.17	Opéra café				
53.7	Blanc d'œuf				
53.8	Jaune d'œuf				
53.9	Œufs durs				
		LM végétaux	salade	-18°C, 24h	0,78
41.1	Mâche tendre				
41.2	Cœur de frisée				
41.3	Cœur de laitue				
41.4	Cœur de scarole				
41.5	Salade mélangée				
41.9	Salade de lentilles cuites				
41.10	Betteraves cubes cuites				
		LM végétaux	salade	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,88
41.8	Chou rouge émincé				
41.11	Betterave cuite vapeur				
51.6	Légumes pour ratatouille				
51.7	Epinards hachés portions				
51.8	Légumes aux pois gourmands				
		LM végétaux	salade	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,70
36.1	Salade verte				
36.2	Endives fraîches				
36.3	Salade mélange + carottes				

Réf. matrice	Matrice	Souche utilisée	Origine	Type de stress	delta log (Milieu sélectif / milieu non sélectif)
		LM végétaux	salade	-18°C, 24h	0,82
51.1	Petits pois extra fins				
51.2	Palets aux petits légumes				
51.3	Epinards en branche				
51.4	Haricots verts				
51.5	Légumes pour potage				
		LM végétaux	salade	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,56
40.3	Chou rouge				
		LM pêche	saumon fumé	-18°C, 24h	0,58
47.10	Blancs d'encornet				
47.11	Filet de cabillaud				
47.12	Pavé de saumon				
47.13	Dos de cabillaud				
47.14	Pavé de cabillaud				
		LM pêche	saumon fumé	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,69
48.8	Filet de hareng fumé				
48.9	Flétan noir				
48.10	Thon fumé sauvage				
		L. mono lait	Lait cru	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,72
42.1	Fromage de chèvre				
43.2	Lait de chèvre				
43.3	Lait de chèvre				
43.4	Lait de chèvre				
43.5	Lait de chèvre				
43.6	Lait de chèvre				
43.7	Lait de chèvre				
43.8	Lait de chèvre				
43.9	Lait de chèvre				
43.10	Lait de chèvre				
		L. mono ovoproduits	œuf liquide	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,60
46.6	Sauce tartare				
46.7	Sauce aïoli				
		LM pêche	saumon fumé	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,88
35.14	Filet de saumon				
35.15	Filet de perche				
48.11	Flétan noir fumé				
48.12	Thon fumé sauvage				

Réf. matrice	Matrice	Souche utilisée	Origine	Type de stress	delta log (Milieu sélectif / milieu non sélectif)
		L. mono ovoproduits	œuf liquide	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,60
45.8	Œufs gros coques				
45.9	Œufs bio				
45.6	Œufs de basse-cour				
45.5	Œufs bio				
		LM pêche	saumon fumé	-18°C, 24h / 55°C, 15 min	0,57
35.19	Pavé de truite				
35.20	Pavé de truite				
35.21	Pavé d'Eglefin				
35.22	Pavé d'Eglefin				
35.23	Filet de Sabre				
35.24	Filet de Sabre				
35.25	Pavé de truite				
47.18	Pavé de saumon				
47.19	Pavé de saumon				
47.20	Steak thon albacore				
47.21	Steak thon albacore				
47.22	Dos de cabillaud				
47.23	Dos de cabillaud				
47.24	Dos de cabillaud				
48.16	Saumon fumé 1er prix				
48.17	Saumon fumé 1er prix				
48.18	Thon fumé sauvage				
48.19	Thon fumé sauvage				
48.20	Haddock				
48.21	Haddock				

**Contamination artificielle par mélange  
avec un produit naturellement contaminé**

Réf. matrice	Matrice	Matrice naturellement contaminée utilisée
49.9	Boudin noir	Pâté de foie
49.10	Pâté de campagne	Pâté de foie
34.1	Rillettes pur porc	Pâté de foie
34.2	Rillettes du Mans	Pâté de foie
34.3	Rillettes volailles	Pâté de foie
49.4	Boudin noir antillais	Pâté de foie
45.4	Gros œufs coques	Pâté de foie