

# **ASEPT**<sup>SAS</sup>

**L'Hygiène dans la Qualité**

Laboratoire, Formation, Conseil, Expertise

VALIDATION AFNOR DE LA MÉTHODE OCLA  
pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes*

Rapport de synthèse

Ce document comporte 31 pages.

ASEPT SAS - Rue des Docteurs Calmette et Guérin – BP 2047 – 53020 Laval Cedex 9  
Tél. 02 43 49 22 22 Fax 02 43 53 36 53 E-mail : [asept@asept.fr](mailto:asept@asept.fr) Internet : <http://www.asept.fr>

Rédacteur : Muriel COIGNARD

Référence : RS/UNI-03/5-09/06

Date de rédaction : 15/05/2007

## SOMMAIRE

ETUDE COMPARATIVE .....	3
1 Introduction .....	3
1.1 Référentiel de validation .....	3
1.2 Protocole et principe de la méthode alternative .....	3
1.3 Domaine d'application demandé .....	3
1.4 Méthode de référence .....	3
2 Etude comparative .....	5
2.1 Linéarité .....	5
2.2 Exactitude relative .....	9
2.3 Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) .....	15
2.4 Sensibilité relative .....	16
2.5 Spécificité / Sélectivité .....	16
2.6 Praticabilité .....	17
2.7 Conclusion .....	18
ETUDE INTERLABORATOIRE .....	19
1 Organisation de l'étude .....	19
1.1 Généralités .....	19
1.2 Modalités d'expédition .....	19
1.3 Éléments nécessaires à la réalisation des essais par les laboratoires collaborateurs .....	20
2 Contrôle des paramètres expérimentaux .....	21
2.1 Taux de contamination avant ensemencement, taux obtenus après contamination artificielle et stabilité des échantillons .....	21
2.2 Températures à réception .....	22
2.3 Conclusion .....	22
3 Résultats .....	23
3.1 Dénombrement de la flore aérobie mésophile .....	23
3.2 Résultats obtenus par le laboratoire expert .....	23
3.3 Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs .....	23
3.4 Conclusion .....	25
4 Calculs .....	26
4.1 Calcul des trois valeurs de consensus .....	26
4.2 Calcul du biais .....	27
4.3 Calcul de la répétabilité .....	28
4.4 Calcul de la reproductibilité .....	29
4.5 Dispersion entre les laboratoires .....	30
5 Conclusion .....	31

# ETUDE COMPARATIVE

## 1 Introduction

L'étude de validation de la méthode OCLA pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* a été confiée par la Société Oxoïd à la SAS ASEPT :

Oxoïd 6 route de Paisy – BP 13 69571 DARDILLY CEDEX Tél. 04 72 52 33 70 Fax : 04 78 66 03 76 M. Christophe Emonard	ASEPT SAS Rue des Docteurs Calmette et Guérin BP 2047 53020 LAVAL Cedex 9 Tél. 02 43 49 22 22 Fax : 02 43 53 36 53 Mme Muriel Coignard
---	--

L'étude comparative des méthodes selon le référentiel NF EN ISO 16140 a été réalisée du 20 septembre 2005 au 07 avril 2006. Un complément d'étude a été réalisé d'avril à juin 2006. Une étude d'extension a été réalisée en février 2007 afin de valider un second mode de confirmation des échantillons positifs.

### 1.1 Référentiel de validation

Les essais pour la validation ont été réalisés conformément au référentiel NF EN ISO 16140.

### 1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

La méthode OCLA pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* est une méthode incluant un diluant et un milieu chromogène pour la détection spécifique de *Listeria monocytogenes*.

### 1.3 Domaine d'application demandé

La validation est demandée pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* sur tous produits d'alimentation humaine et pour les prélèvements d'environnement.

### 1.4 Méthode de référence

La méthode de référence utilisée pour les essais est la méthode NF EN ISO 11290 2/A1 (2004). Le schéma 1 présente le mode opératoire de la méthode alternative.

### Schéma 1 : Protocole de la méthode alternative

Dilution de  $y$  g d'échantillon dans  $9 * y$  ml de bouillon EPT

Revivification  $1 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$  à  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$



Étalement de 0,1 ml sur 1 boîte de gélose OCLA

Incubation  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  à  $48 \text{ h}$  à  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

(Pour les taux faibles, ensemencement de 1 ml sur trois boîtes de Petri contenant la gélose OCLA)



Purification d'au moins une colonie présentant un aspect caractéristique (colonies bleues, de diamètre inférieur à 3 mm, à bords réguliers et avec halo blanc) et confirmation par les tests classiques des méthodes normalisées

Ou

Réalisation du test OBISmono directement à partir d'une colonie bien isolée (dans le cas d'absence de colonies bien isolées, réaliser un nouvel isolement sur gélose OCLA avant de réaliser le test OBISmono)

## 2 Etude comparative

### 2.1 Linéarité

#### 2.1.1 Matrices utilisées

Six couples « matrice – souche » ont été utilisés pour cette étude :

- ✓ Rillettes - *Listeria monocytogenes* 4e isolée de rillettes,
- ✓ Lait cru - *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée de lait cru,
- ✓ Laitue - *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée de salade,
- ✓ Saumon fumé - *Listeria monocytogenes* 1/2b isolée de saumon fumé,
- ✓ Ovoproduit cru - *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée de jaune d'oeuf liquide,
- ✓ Eau de process – *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée de siphon de sol.

#### 2.1.2 Protocole de contamination

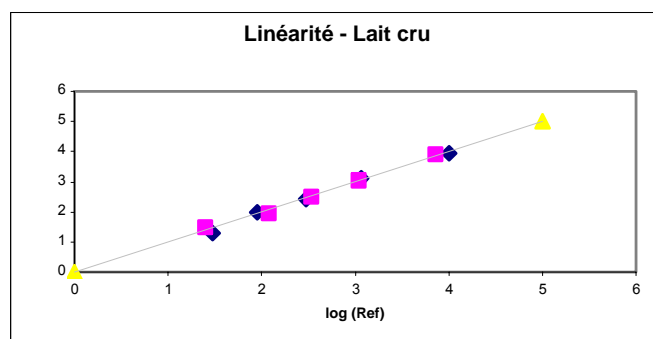
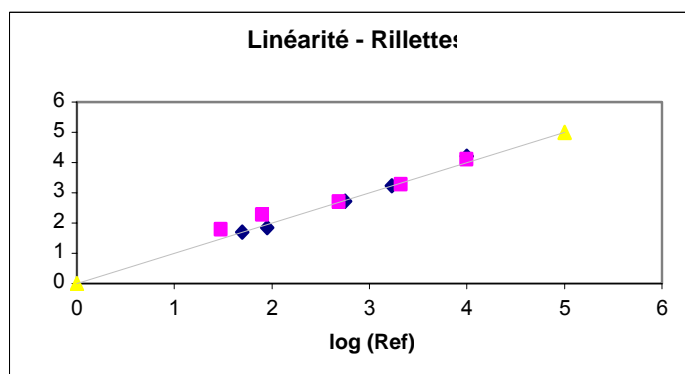
Les niveaux de contamination étudiés ont été les suivants :

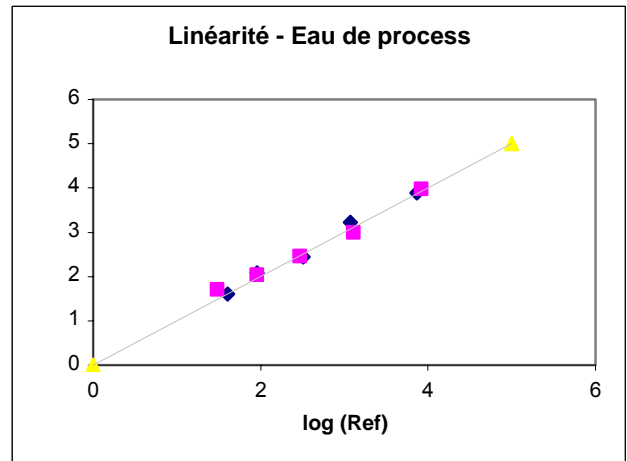
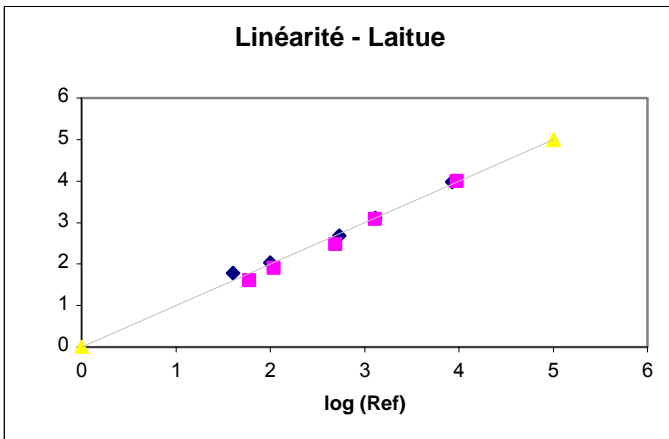
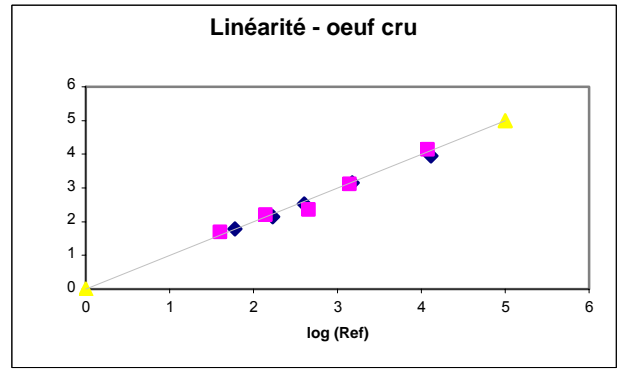
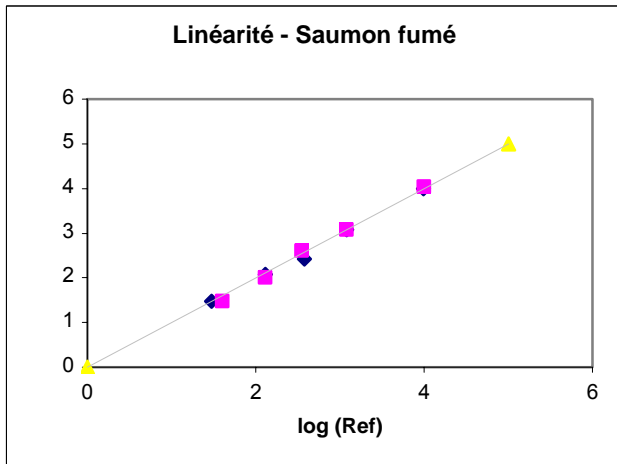
- ✓ 10 à 50 ufc par gramme,
- ✓ 50 à 100 ufc par gramme,
- ✓ 100 à 500 ufc par gramme,
- ✓ 500 à 1 000 ufc par gramme,
- ✓ 1 000 à 10 000 ufc par gramme.

Les échantillons ont été contaminés individuellement par la souche bactérienne, et analysés en double, par la méthode alternative et par la méthode de référence.

#### 2.1.3 Résultats bruts

Les graphiques bi-dimensionnels présentant les valeurs de chaque échantillon, avec en abscisse la valeur en log obtenue par la méthode de référence et en ordonnée la valeur en log obtenue par la méthode alternative, sont présentés ci-dessous. Les droites sont les premières bissectrices.





## 2.1.4 Interprétation statistique

Le tableau 1 présente une synthèse des calculs statistiques réalisés.

**Tableau 1**

Matrice	R	Régression utilisée	Rob. F	Valeur critique	p%	Coefficient de corrélation	Droite de régression *
Rillettes	1,80	GMFR	6,09	5,41	<b>4</b>	0,9960	$\log(\text{Alt})=0,9887\log(\text{Ref})+ 0,1141$
Laitue	1,08	GMFR	0,00	5,41	100	0,9992	$\text{Log}(\text{Alt})=1,0081\log(\text{Ref})-0,0257$
Lait cru	1,02	GMFR	0,00	5,41	100	0,9997	$\text{Log}(\text{Alt})=1,0188\log(\text{Ref})-0,0737$
Saumon fumé	10,48	OLS1	1,806	5,41	26,3	0,9984	$\text{Log}(\text{Alt})=1,0406\log(\text{Ref})-0,1418$
Oeuf cru	1,30	GMFR	5,48	5,41	4,9	0,9958	$\text{Log}(\text{Alt})=0,9775\log(\text{Ref})-0,0161$
Eau de process	1,84	GMFR	0,079	5,41	96,9	0,9985	$\text{Log}(\text{Alt})=0,9680\log(\text{Ref})+0,1317$

GMFR : régression linéaire orthogonale

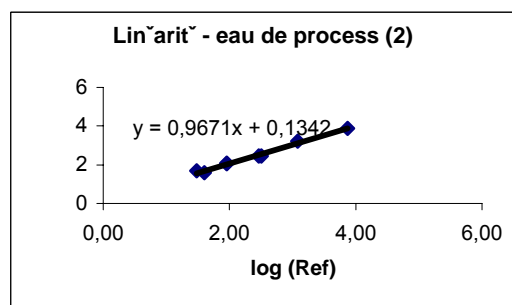
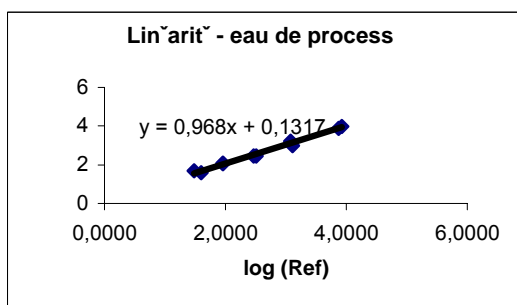
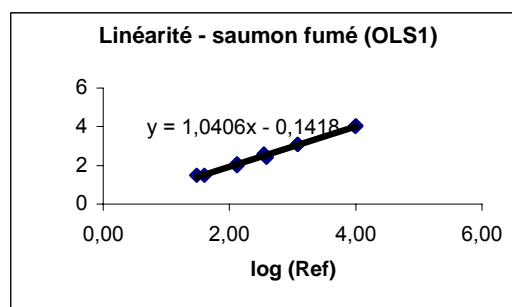
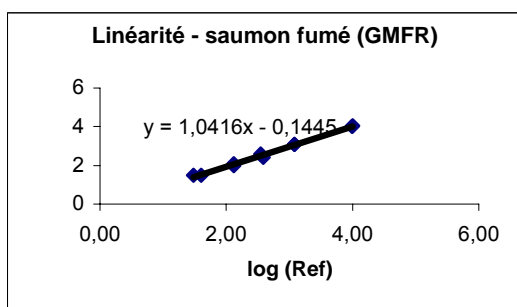
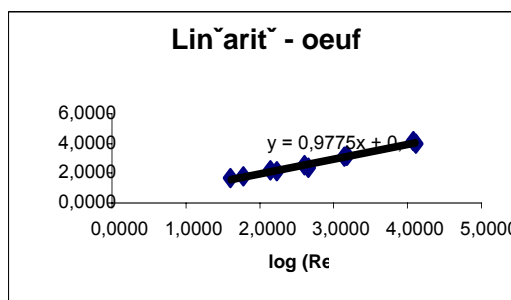
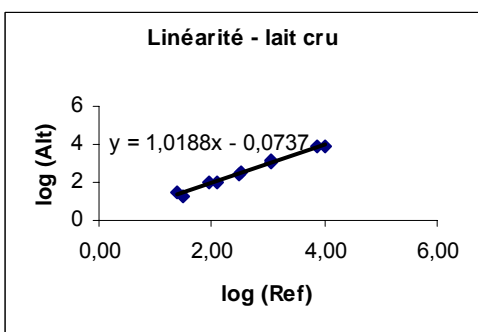
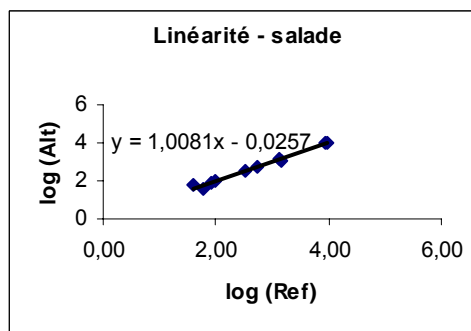
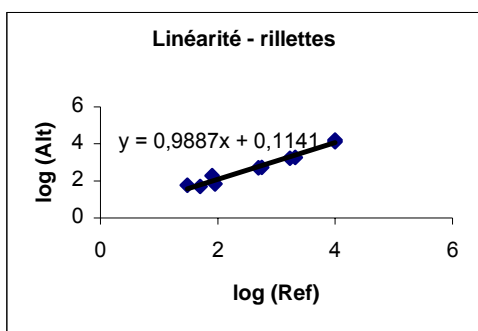
OLS : régression linéaire par moindres carrés ordinaires (OLS1 lorsque l'axe des x correspond aux valeurs de la méthode de référence et OLS2 lorsque l'axe des x correspond aux valeurs de la méthode alternative).

Une valeur de p% inférieure à 5 % indique une non linéarité au risque  $\alpha = 5 \%$ .

Pour les matrices laitue, saumon fumé, œuf cru, eau de process (régression GMFR) et lait cru la relation entre les deux méthodes étudiées est linéaire au risque  $\alpha = 5 \%$ .

Pour les matrices rillettes et eau de process (régression OLS1), la relation est non linéaire au risque 5 % mais linéaire au risque  $\alpha = 1 \%$  ( $p = 4 \%$ ) et les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,99.

Les graphes ci-dessous présentent les droites de régression pour chaque matrice.



En conclusion, tous les coefficients de corrélation obtenus sont supérieurs à 0,99.

La linéarité de la méthode alternative apparaît satisfaisante.

## 2.2 Exactitude relative

### 2.2.1 Nature des échantillons

Des échantillons issus de cinq matrices alimentaires et de prélèvements d'environnement et divisés en 3 types ont été analysés par les deux méthodes en parallèle et en double. Le tableau 2 présente la répartition des échantillons analysés en fonction des catégories (seuls figurent les échantillons pour lesquels au moins un résultat par l'une des deux méthodes présentait des colonies typiques : de nombreux autres échantillons ont été analysés afin de trouver des échantillons naturellement contaminés mais ont donné un résultat inférieur au seuil de détection par les deux méthodes ; les lignes grisées dans le tableau en annexe 5 indiquent les résultats non exploités statistiquement).

**Tableau 2**

Catégories	Types	Nombre d'échantillons	
		Analysés	Exploités (1)
Produits carnés	Viandes crues	6	4
	Produits carnés transformés à cuire	4	2
	Charcuteries prêtes à consommer	10	4
	<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>10</b>
Produits laitiers	Fromages au lait cru	7	4
	Laits crus	4	3
	Autres produits laitiers	5	5
	<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>12</b>
Produits de la pêche	Poissons crus	5	4
	Poissons transformés	7	2
	Produits prêts à consommer	6	4
	<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>10</b>
Produits végétaux	Végétaux crus	5	4
	Végétaux surgelés	3	3
	Salades, crudités	5	5
	<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>12</b>
Ovoproduits	Oeufs crus	5	5
	Pâtisseries	3	3
	Ovoproduits pasteurisés	4	3
	<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>11</b>
Prélèvements d'environnement	Prélèvements de surfaces	8	4
	Eaux de process	3	3
	Poussières et résidus	3	3
	<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>10</b>
<b>TOTAL</b>		<b>93</b>	<b>65</b>

(1) Les résultats non exploités sont issus d'échantillons pour lesquels au moins une des valeurs est inférieure au seuil de détection de la méthode.

## 2.2.2 Contamination artificielle des échantillons

Des contaminations artificielles ont été réalisées sur toutes les catégories de produits. Les stress utilisés et les origines des souches sont précisés dans le tableau 3. Les valeurs obtenues pour l'évaluation du stress sont précisées dans le tableau de résultats bruts en annexe 5 (les échantillons notés en italique en annexe 5 ont été contaminés artificiellement).

**Tableau 3**

<b>Stress N°</b>	<b>Nature du stress</b>	<b>Souche utilisée</b>	<b>Origine</b>
A	45 min à 50 °C	48 LM-H123 LM-H170	Saumon fumé Salade Salade
B	30 min à 50 °C et 2 h à -20°C	18 43 LM-O1	Lait cru, environnement Environnement Ovoproduit
C	30 min à 55°C	18 48 LM-H123	Lait cru Saumon fumé Salade
D	30 min à 50°C et 2h à -80°C	34 LM-H171 LM-O1	Rillettes Salade Ovoproduit
E	30 min à 60 °C	LM-O1	Ovoproduit

Le nombre d'échantillons contaminés artificiellement par rapport au nombre d'échantillons positifs est de 56 sur 93, soit 60,2 %. Parmi les résultats positifs exploités, 53 échantillons sur 65 sont artificiellement contaminés, soit un pourcentage de 81,5 %.

Le nombre d'échantillons naturellement contaminés et positifs pour au moins un résultat est de 37. Parmi les résultats exploités, 12 échantillons sont naturellement contaminés, soit un pourcentage de 18,5 %.

## 2.2.3 Protocole de confirmation

Pour les deux méthodes, les confirmations ont été réalisées par les tests décrits dans la méthode ISO 11290-2/A1. Seul le nombre de colonies confirmées diffère, pour la méthode alternative, une seule colonie par échantillon a été confirmée.

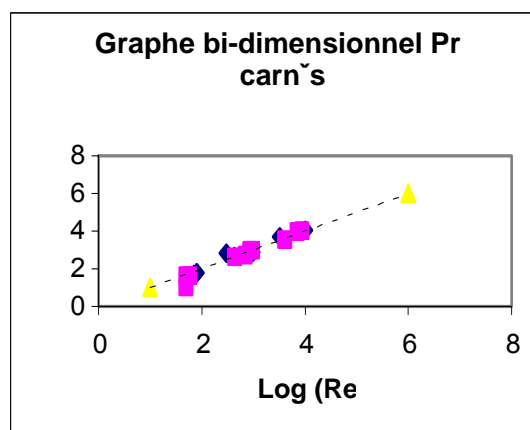
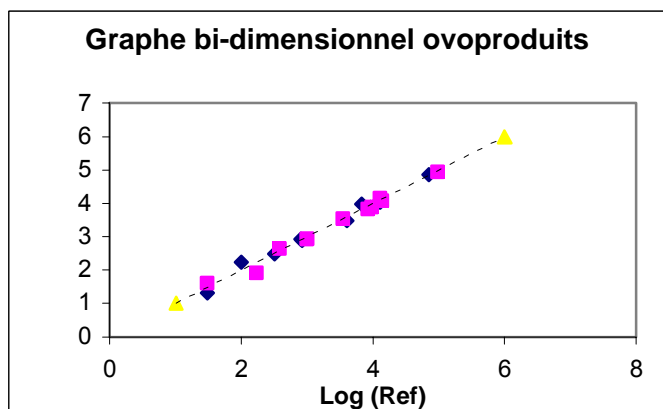
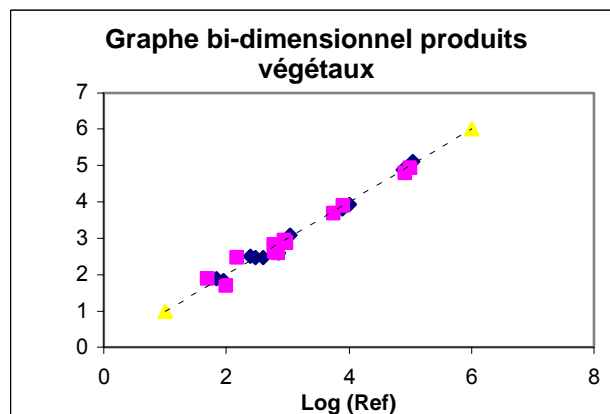
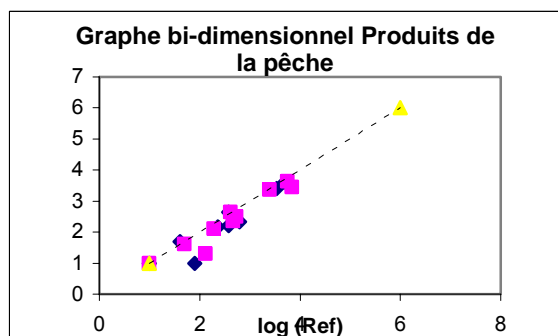
## 2.2.4 Résultats bruts

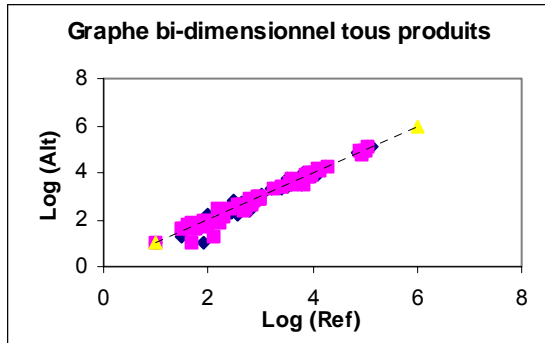
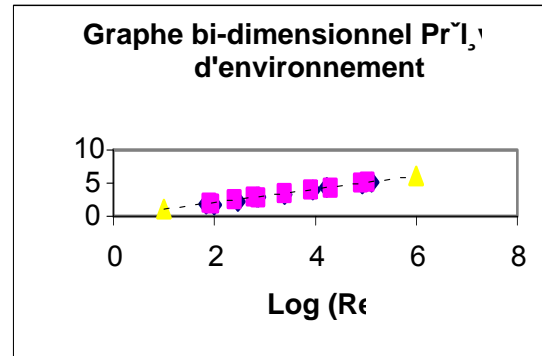
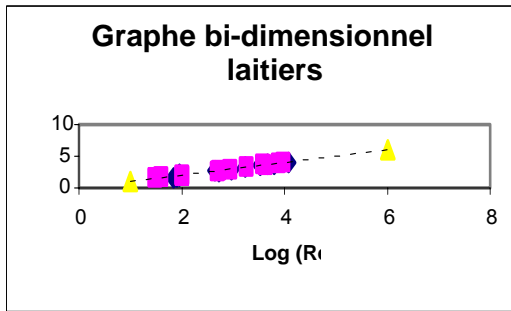
Le tableau 4 présente les domaines de contamination exprimés en logarithme pour chaque catégorie d'aliments.

Tableau 4

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	1,00 – 4,04
Produits laitiers	1,48 – 4,08
Produits de la pêche	1,00 – 3,84
Produits végétaux	1,70 – 5,11
Ovoproduits	1,30 – 4,99
Prélèvements d'environnement	1,70 – 5,11
<b>Toutes catégories</b>	<b>1,00 – 5,11</b>

Les graphiques bi-dimensionnels présentant les valeurs de chaque échantillon, avec en abscisse la valeur en log obtenue par la méthode de référence et en ordonnée la valeur en log obtenue par la méthode alternative, sont présentés ci-dessous. Les droites sont les premières bissectrices.





## 2.2.5 Interprétation

Le tableau 5 présente une synthèse des calculs statistiques.

**Tableau 5**

Catégorie	n	R	Régression	a	t(a)	b	t(b)	Tcrit	p%	
									Sur b	Sur a
Produits carnés	10	1,58	GMFR	-0,455	3,321	1,15	3,123	2,306	0,01	0,01
Produits laitiers	12	0,65	GMFR	-0,027	0,385	1,002	0,108	2,228	0,92	0,71
Produits de la pêche	10	1,30	GMFR	-0,305	1,024	1,034	0,312	2,306	0,76	0,34
Produits végétaux	12	0,86	GMFR	-0,015	0,128	0,993	0,191	2,228	0,85	0,90
Ovoproduits	11	1,58	GMFR	-0,038	0,866	1,001	0,090	2,262	0,93	0,41
Prélèvements d'environnement	10	1,76	GMFR	-0,139	2,65	1,034	2,31	2,306	0,05	0,03
Tous produits	65	1,18	GMFR	-0,182	3,042	1,040	2,145	2,000	0,04	0,00
Tous produits Nombres estimés	20	1,15	GMFR	-0,367	1,51	1,138	1,141	2,101	0,27	0,15
Tous produits résultats non estimés	45	1,26	GMFR	-0,143	2,01	1,029	1,438	2,021	0,16	0,05

GMFR : régression linéaire orthogonale

Les cases en grisé pour la colonne p% indiquent des valeurs inférieures à 5 %.

Le tableau 6 présente les valeurs du biais (moyen et médian) entre les deux méthodes et les répétabilités pour les deux méthodes.

**Tableau 6**

Catégorie	Biais		Répétabilité			
	Moyen	médian	r		Rob. r	
			Ref.	Alt.	Ref.	Alt.
Produits carnés	-0,042	0,008	0,313	0,494	0,314	0,343
Produits laitiers	-0,020	-0,031	0,289	0,187	0,136	0,130
Produits de la pêche	-0,216	-0,133	0,196	0,255	0,220	0,214
Produits végétaux	-0,037	-0,041	0,358	0,309	0,180	0,319
Ovoproduits	-0,025	-0,026	0,198	0,313	0,219	0,206
Prélèvements d'environnement	-0,023	-0,007	0,135	0,238	0,198	0,119
Tous produits	-0,060	-0,032	0,264	0,311	0,196	0,215

Toutes les régressions utilisées étant des régressions linéaires orthogonales, l'axe des abscisses représente les valeurs obtenues par la méthode de référence pour toutes les catégories.

## 2.2.6 Conclusion

Les biais entre les deux méthodes varient, en valeur moyenne de -0,216 à -0,020 et en valeur médiane de -0,133 à +0,008 : il n'y a pas de biais systématique entre les deux méthodes, la valeur moyenne globale du biais étant de -0,060 et la valeur médiane de -0,032. Les limites de répétabilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence, avec des valeurs ne dépassant pas 0,343 en valeurs robustes.

Concernant les pentes et ordonnées à l'origine, les hypothèses,  $b=1$  et  $a=0$  sont vérifiées pour toutes les catégories, à l'exception de la catégorie « produits carnés », pour laquelle les  $p\%$  sont respectivement de 1 et 1 % et pour les prélèvements d'environnements pour lesquels le  $p\%$  sur  $a$  est de 3%. Pour les autres catégories, les  $p\%$  sont tous supérieurs à 5 %.

Pour l'ensemble des catégories, le  $p\%$  sur l'ordonnée à l'origine est de 0% et le  $p\%$  sur la pente de 4%.

En observant le graphe bi-dimensionnel, il apparaît une différence selon le niveau de contamination et donc le nombre de colonies dénombrées sur les boîtes (résultats estimés ou non). Les calculs ont donc été refaits pour deux types de résultats (nombres estimés ou non estimés) : les  $p\%$  sont alors supérieurs à 5%.

En ce qui concerne la catégorie « produits carnés », il est à noter que le test de linéarité avec une valeur de  $F$  de 0,663 (ou rob.  $F = 2,719$ ) est accepté et que le coefficient de corrélation est élevé (0,9935).

La méthode OCLA pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* présente une exactitude satisfaisante.

## 2.3 Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

### 2.3.1 Protocoles d'essai

La souche de *Listeria monocytogenes* 18 isolée de lait cru a été cultivée en bouillon nutritif et utilisée pour ensemercer les boîtes de gélose OCLA, tel que décrit dans la notice de la méthode OCLA. 1 ml a été ensemençé sur trois boîtes de gélose et 0,1 ml sur une boîte, les niveaux étant faibles. Les dénombrements de la suspension contaminante ont été réalisés sur dix boîtes de gélose PCA (Plate Count Agar). Trois niveaux d'inoculation ont été étudiés, avec six réplicats pour chaque niveau.

### 2.3.2 Résultats

Les données sont intrinsèques à la méthode alternative.

Les tableaux 7 et 8 présentent les résultats obtenus.

La valeur de  $s_o$  est calculée à partir de la médiane récursive des valeurs individuelles obtenues, tel qu'indiqué en annexe Q de la norme ISO 16140. Le biais correspond à la médiane des valeurs individuelles obtenues.

**Tableau 7 : ensemençement de 1 ml sur 3 boîtes**

Niveau (UFC/ml)	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type $s_o$	Biais $x_o$
0,7	4/6	1,7889	1,5
1,5	5/6	1,1926	1,5
3,7	6/6	2,3852	3,5

**Tableau 8 : ensemençement de 0,1 ml sur 1 boîte**

Niveau (UFC /ml)	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type $s_o$	Biais $x_o$
4,4	1/6	0	0
9,2	2/6	0	0
31,5	6/6	1,1926	3

Les valeurs de LC, LOD et LOQ sont ensuite calculées et présentées dans le tableau 9.

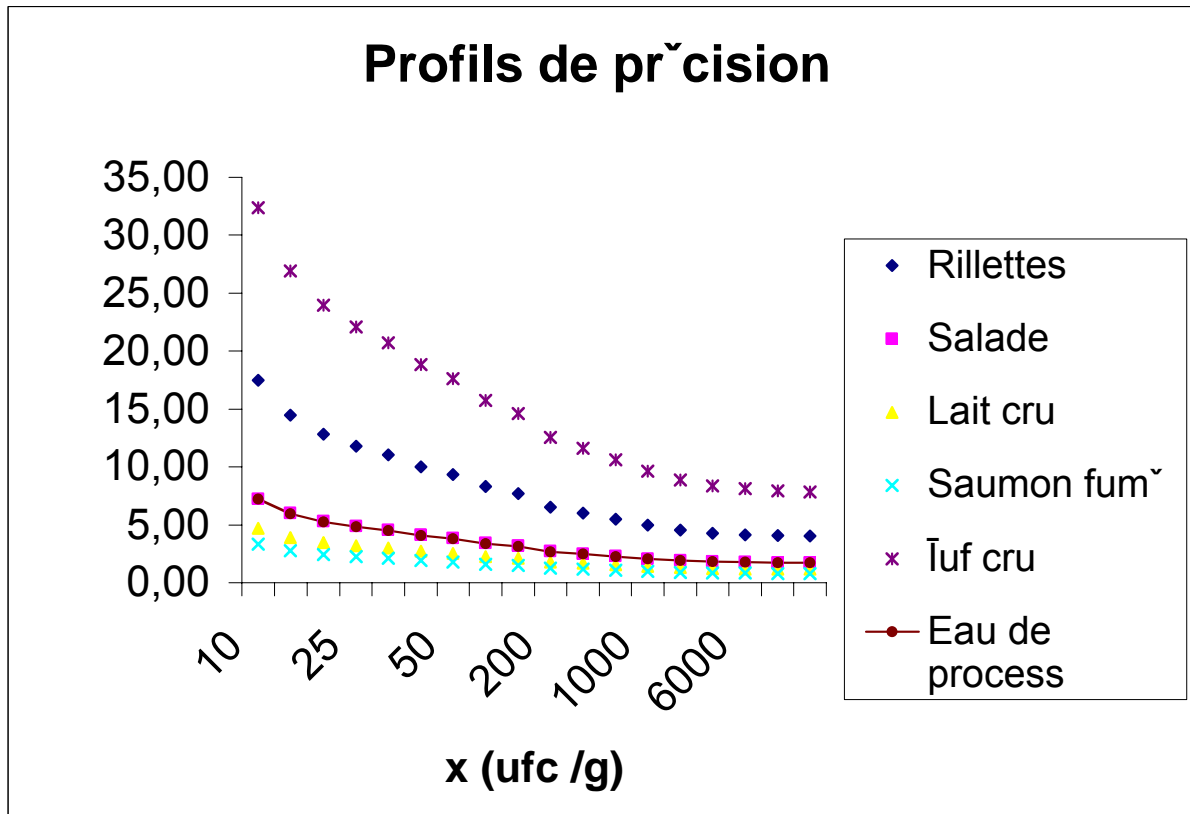
**Tableau 9**

	Formule	Valeur obtenue (1 ml sur 3 boîtes)	Valeur obtenue (0,1 ml sur 1 boîte)
LC	$1,65 + x_o$	4,45	4,97
LOD	$3,3 s_o + x_o$	7,45	6,97
LOQ	$10 s_o + x_o$	19,40	14,93

## 2.4 Sensibilité relative

Les données sont intrinsèques à la méthode et sont obtenues à partir des données de l'étude de linéarité. Les calculs ayant servi au tracé du profil sont présentés en annexe 9.

Les profils de précision sont présentés sur le graphe suivant pour chaque matrice.



## 2.5 Spécificité / Sélectivité

La spécificité et la sélectivité de la méthode alternative n'ont pas été étudiées, compte-tenu de la validation de la méthode pour la recherche de *Listeria monocytogenes*.

## 2.6 Praticabilité

Les 13 critères définis dans les exigences du bureau technique sont renseignés dans le tableau 10.

**Tableau 10**

<b>Critère</b>	<b>Données</b>
1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode	La gélose OCLA est disponible en conditionnement de 10 boîtes en pré-coulé.
2. Volume des réactifs	Sans objet.
3. Conditions de stockage des éléments et péremption des produits non ouverts	La température de stockage indiquée sur les coffrets est 6-12°C à l'abri de la lumière. La péremption est indiquée sur les coffrets et sur les boîtes. Environ 3 mois.
4. Modalités d'utilisation après première utilisation	Sans objet
5. Equipements ou locaux spécifiques	Equipements : étuve à 37°C. Locaux classiques de laboratoire recherchant des <i>Listeria monocytogenes</i> .
6. Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer	Boîtes prêtes à l'emploi.
7. Durée de formation de l'opérateur non initié à la technique	0,5 jour.
8. Temps réel de manipulation	<u>Méthode de référence</u> : 9 min pour un échantillon ; 55 min pour 10 échantillons <u>Méthode alternative</u> : 7 min pour un échantillon ; 35 minutes pour une série de 10 échantillons
9. Délai d'obtention des résultats d'essais réalisés à Jo	<u>Résultats négatifs</u> : Méthode de référence : J2 Méthode alternative : J2 <u>Résultats négatifs après confirmation ou résultats positifs</u> : Méthode de référence : J4 à J7 Méthode alternative : J4 à J7
10. Type de qualification de l'opérateur	Identique à celle nécessaire pour réaliser la méthode de référence.
11. Etapes communes avec la méthode de référence	Préparation de la suspension mère, revivification, réalisation des dilutions décimales.
12. Traçabilité des résultats d'essais	Sans objet
13. Maintenance par le laboratoire	Sans objet

## 2.7 Mode de confirmation des positifs

L'étude réalisée en février 2007 a porté sur 150 souches de *Listeria monocytogenes* et 100 souches d'autres genres et espèces que *Listeria monocytogenes*. Ces souches ont été cultivées en parallèle sur gélose OCLA et TSA-YE puis les souches donnant des colonies caractéristiques sur gélose OCLA ont été testées par OBIS mono.

Toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ont donné un résultat *Listeria monocytogenes* par le test OBIS mono et les souches autres présentant un aspect caractéristique sur gélose OCLA ont donné un résultat non *Listeria monocytogenes* par le test OBIS mono.

## 2.8 Conclusion

La méthode OCLA pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* a été comparée à la méthode de référence NF EN ISO 11290-2/A1. Les résultats permettent de conclure à :

- ✓ une bonne linéarité,
- ✓ une exactitude relative satisfaisante,
- ✓ une limite de détection d'environ 7 cellules,
- ✓ une praticabilité similaire à celle de la méthode de référence, avec un nombre de boîtes à ensemercer divisé par deux et un nombre de colonies à confirmer plus faible.

# ETUDE INTERLABORATOIRE

## 1 Organisation de l'étude

### 1.1 Généralités

Douze laboratoires ont participé à l'étude.

La matrice utilisée est un mélange de 50 % de lait pasteurisé demi-écrémé et de 50 % de lait entier pasteurisé.

Le lait a été contaminée par une souche de *Listeria monocytogenes* 1/2a isolée de lait cru.

Huit échantillons ont été préparés pour chaque laboratoire. Un témoin de lait non contaminé était joint au colis pour dénombrement de la flore totale aérobie mésophile. Un flacon de lait non contaminé était joint au colis pour prise de température à réception ; il contenait le thermobouton, pour enregistrement de la température durant le transport.

Modalités de préparation et de contamination des échantillons

Le lait mélangé et homogénéisé a été réparti à raison de 10 ml par flacon stérile. Les taux visés d'inoculation étaient :

- ✓ < 10 / ml
- ✓ 50 / ml
- ✓ 500 / ml
- ✓ 5 000 / ml

Deux flacons ont été préparés pour chaque taux.

### 1.2 Modalités d'expédition

Les flacons d'échantillons de lait ont été placés dans des boîtes isothermes en polystyrène, et ont été accompagnés de blocs froids, d'un flacon de lait pour prise de température à réception, d'un flacon de lait pour le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile et d'un thermobouton. La boîte isotherme a été placée dans un carton contenant une enveloppe pour le retour du thermobouton au laboratoire organisateur.

Les cartons ont été expédiés par transporteur le lundi 29/05/2006.

### **1.3 Éléments nécessaires à la réalisation des essais par les laboratoires collaborateurs**

Les réactifs nécessaires à la réalisation de l'étude ont été fournis par le fabricant ; ils ont été envoyés une semaine avant l'étude.

Le laboratoire expert a adressé aux laboratoires collaborateurs les instructions pour la réalisation des essais ainsi qu'un fichier Excel pour le rendu des résultats.

## 2 Contrôle des paramètres expérimentaux

### 2.1 Taux de contamination avant ensemencement, taux obtenus après contamination artificielle et stabilité des échantillons

Le laboratoire organisateur a vérifié l'absence de *Listeria monocytogenes* dans les laits utilisés avant ensemencement.

Les niveaux de contamination sont présentés dans le tableau 11.

Taux visés (bactéries / ml)	Echantillons N°	Taux réels (bactéries / ml)
0	1 - 8	0
50	5 - 6	45
500	3 - 7	440
5000	2 - 4	4 500

Tableau 11 : niveaux de contamination des échantillons

Le niveau de contamination par *Listeria monocytogenes* des échantillons a été mesuré le jour de préparation des laits par le laboratoire organisateur, et le lendemain de la préparation. Les résultats sont reportés dans le tableau 12.

Jour	Niveau visé dans 1 ml	Résultat du dénombrement par la méthode ISO 11290-2/A1 dans 1 ml (UFC)	Résultat du dénombrement par la méthode ISO 11290-2/A1 dans 1 ml (log)
29/05/2006	50	45	1,65
	500	440	2,64
	5 000	4 500	3,65
30/05/2006	50	60	1,78
	500	430	2,63
	5 000	4 900	3,69

Tableau 12 : stabilité des échantillons

Les échantillons présentent des niveaux de contamination proches de ceux attendus et sont stables sur deux jours.

## 2.2 Températures à réception

Les températures obtenues par les laboratoires collaborateurs à réception du colis et les températures indiquées par le thermobouton sont présentées dans le tableau 13.

Code du Laboratoire	Jour de réception	Heure de réception	Température à réception (°C) mesurée par le laboratoire	Températures (°C) indiquées par le thermobouton (mini-à réception)
A	30/05/2006	10h45	8,2	0 ; 3
B		10h15	5,5	0 ; 3
C		11h15	4,5	-1 ; 3
D		10h00	6,3	0 ; 3
E		09h30	6,0	0 ; 4
F		8h30	6,2	-1 ; 4
G		11h50	8,1	0 ; 5
H		10h00	3,8	0 ; 4
I		08h30	4,8	0 ; 1
J		14h45	-	Thermobouton jeté
K		08h30	1,4	0 ; 5
L		09h45	6,7	-1 ; 3
M		08h45	7,6	0 ; 4

Tableau 13 : températures à réception des colis

Pour tous les laboratoires collaborateurs, la température était conforme car inférieure à 8,4 °C.

Tous les laboratoires ont reçu leur colis le lendemain de l'envoi soit le 30/05/2006 avant 14 h, à l'exception du laboratoire J qui a reçu le colis après 14 h et avec plusieurs flacons cassés et/ou fuités. Le laboratoire B a réalisé une pesée de chaque quantité de lait (inférieure à 10 ml) et a dilué cette quantité au 10<sup>ème</sup> avec l'eau peptonée tamponnée.

Trois autres laboratoires ont reçu quelques flacons fuités mais ont tout de même réalisé les essais (laboratoire B, D et L).

Le laboratoire I a identifié en première intention des *Listeria ivanovii*.

Tous les laboratoires ont réalisé les essais sur les 8 flacons de lait le mardi 30/05/2006.

## 2.3 Conclusion

Le laboratoire J est exclu car il n'a pas réalisé les analyses en raison des flacons cassés et/ou fuités. Les laboratoires B, D et L sont maintenus car ils ont pu réaliser les essais en suivant le protocole.

### 3 Résultats

#### 3.1 Dénombrement de la flore aérobie mésophile

Les laboratoires collaborateurs et le laboratoire organisateur ont effectué le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile selon la méthode ISO 4833.

Les dénombrements varient entre  $9,4 \cdot 10^2$  / ml et  $3,3 \cdot 10^3$  / ml avec une moyenne de  $1,8 \cdot 10^3$  / ml. Les laboratoires I et K n'ont pas transmis de résultats.

#### 3.2 Résultats obtenus par le laboratoire expert

Le tableau 14 présente une synthèse des résultats obtenus.

Taux visé	Méthode de référence ISO 11290-2		Méthode alternative OCLA numération	
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2
< 10	< 10	< 10	< 10	<10
50	50 (Ne)	60 (Ne)	50 (Ne)	30 (Ne)
500	470	390	490	500
5 000	4 700	5 100	5 900	3 400

Tableau 14 : résultats du laboratoire expert

Les résultats obtenus sont conformes aux résultats attendus pour les trois niveaux contaminés.

#### 3.3 Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs

Les résultats détaillés de chaque laboratoire collaborateur sont présentés en annexe 5.

Les tableaux 15, 16, et 17 présentent une synthèse des résultats obtenus pour les laits contaminés (en gras sont indiquées les valeurs s'éloignant des résultats attendus). En ce qui concerne le niveau non contaminé, tous les laboratoires ont trouvé les résultats attendus.

Laboratoire	Méthode de référence ISO 11290-2		Méthode alternative OCLA numération	
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2
A	40	40	70	40
B	40	15	40	20
C	50	20	20	70
D	40	60	40	40
E	50	40	50	20
F	60	20	60	50
G	70	35	<b>120</b>	50
H	<b>110</b>	40	<b>100</b>	90
I	35	30	40	<b>&lt;10</b>
K	50	20	10	<b>210</b>
L	35	60	20	40
M	45	45	30	40

Tableau 15 : résultats des laboratoires collaborateurs – niveau 1

Laboratoire	Méthode de référence ISO 11290-2		Méthode alternative OCLA numération	
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2
A	480	410	210	340
B	350	300	360	450
C	440	430	480	450
D	490	460	600	540
E	490	520	530	560
F	370	250	300	<b>130</b>
G	440	390	570	370
H	520	440	450	540
I	290	290	850	450
K	320	340	290	510
L	390	390	170	380
M	450	490	550	410

Tableau 16 : résultats des laboratoires collaborateurs – niveau 2 (calculs réalisés en prenant en compte les résultats obtenus sur les trois boîtes inoculées avec la suspension mère)

Laboratoire	Méthode de référence ISO 11290-2		Méthode alternative OCLA numération	
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2
A	<b>1000</b>	300	400	300
B	350	650	800	600
C	300	650	300	500
D	250	450	600	<b>1000</b>
E	750	550	400	200
F	300	350	600	300
G	450	550	700	700
H	<b>150</b>	650	300	300
I	300	300	700	300
K	450	650	300	500
L	650	350	800	200
M	400	550	800	<b>180</b>

Tableau 16bis : résultats des laboratoires collaborateurs – niveau 2 (calculs réalisés en prenant en compte les résultats obtenus sur la (ou les) boîte(s) inoculée(s) avec 0,1 ml de la suspension mère)

Laboratoire	Méthode de référence ISO 11290-2		Méthode alternative OCLA numération	
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2
A	4900	4600	4900	5100
B	4100	4700	5100	3700
C	4600	5400	4600	5000
D	4900	4900	4400	4600
E	5400	4500	4100	5400
F	4400	4700	4900	5900
G	5000	4500	4000	4400
H	4200	4700	5600	4800
I	3900	4400	3800	3400
K	3400	4200	<b>600</b>	4100
L	5300	4600	5600	5900
M	4900	4900	6400	4800

Tableau 17 : résultats des laboratoires collaborateurs – niveau 3

### 3.4 Conclusion

Trois laboratoires ont eu des difficultés à voir les halos après 24 h d'incubation sur les géloses OCLA (laboratoires B, E et I), dont un laboratoire qui a eu des difficultés à voir les halos pour la méthode alternative et la méthode de référence (laboratoire B). Le laboratoire I a identifié en première intention *Listeria ivanovii* sur toutes les colonies au lieu de *Listeria monocytogenes*: après réalisation de galeries biochimiques d'identification d'une autre marque, les identifications étaient conformes.

Le laboratoire K n'a pas réalisé les confirmations sur gélose O&A par isolement des colonies typiques sur gélose OCLA.

Deux laboratoires sont exclus de l'interprétation, les laboratoires I et K en raison du non respect du protocole et d'une valeur non exploitable (<10) pour le laboratoire I.

## 4 Calculs

### 4.1 Calcul des trois valeurs de consensus

Les données brutes des laboratoires sont transformées en logarithmique de base 10 pour chacune des deux méthodes étudiées.

Les trois valeurs de consensus suivantes sont calculées :

- l'estimation du centre global par le calcul de la médiane,
- l'estimation de la dispersion entre les moyennes des duplicats par le calcul de  $S_b$  basé sur la médiane récursive  $S_n$ ,
- l'estimation de la dispersion interne de chaque méthode par le calcul de l'écart-type de répétabilité dérivé de la médiane des écarts-types des duplicats.

Les synthèses des résultats obtenus pour chaque niveau sont présentées dans les tableaux 18, 19 et 20.

Estimateur	Formule utilisée	Valeur pour la méthode de référence	Valeur pour la méthode alternative
Médiane	Médiane (Mi)	1,652	1,588
Médiane récursive	$S_n =$ Médiane(Médiane des écarts des Mi)	0,090	0,136
Ecart-type de répétabilité	$S_r = 1,4826 *$ Médiane (si)	0,280	0,285
Ecart-type de reproductibilité	$S_R =$ Racine carrée ( $S_b^2 + S_r^2 / 2$ ) $S_b = 1,1926 * S_n$	0,226	0,259

Tableau 18 : Estimateurs calculés pour le niveau 1.

Estimateur	Formule utilisée	Valeur pour la méthode de référence	Valeur pour la méthode alternative
Médiane	Médiane (Mi)	2,643	2,665
Médiane récursive	$S_n =$ Médiane(Médiane des écarts des Mi)	0,050	0,084
Ecart-type de répétabilité	$S_r = 1,4826 *$ Médiane (si)	0,047	0,118
Ecart-type de reproductibilité	$S_R =$ Racine carrée ( $S_b^2 + S_r^2 / 2$ ) $S_b = 1,1926 * S_n$	0,068	0,130

Tableau 19 : Estimateurs calculés pour le niveau 2.

Estimateur	Formule utilisée	Valeur pour la méthode de référence	Valeur pour la méthode alternative
Médiane	Médiane (Mi)	2,675	2,595
Médiane récursive	$S_n = \text{Médiane}(\text{Médiane des écarts des } M_i)$	0,081	0,150
Ecart-type de répétabilité	$S_r = 1,4826 * \text{Médiane}(s_i)$	0,275	0,233
Ecart-type de reproductibilité	$S_R = \text{Racine carrée}(S_b^2 + S_r^2 / 2)$ $S_b = 1,1926 * S_n$	0,217	0,243

Tableau 19bis : Estimateurs calculés pour le niveau 2 (0,1 ml).

Estimateur	Formule utilisée	Valeur pour la méthode de référence	Valeur pour la méthode alternative
Médiane	Médiane (Mi)	3,683	3,690
Médiane récursive	$S_n = \text{Médiane}(\text{Médiane des écarts des } M_i)$	0,017	0,048
Ecart-type de répétabilité	$S_r = 1,4826 * \text{Médiane}(s_i)$	0,050	0,057
Ecart-type de reproductibilité	$S_R = \text{Racine carrée}(S_b^2 + S_r^2 / 2)$ $S_b = 1,1926 * S_n$	0,041	0,070

Tableau 20 : Estimateurs calculés pour le niveau 3.

## 4.2 Calcul du biais

Pour chaque niveau, la différence entre les moyennes des deux réplicats de chaque méthode d'essai est déterminée. La médiane est calculée afin de déterminer le biais entre les deux méthodes.

L'écart-type robuste,  $s(d_i)$  est calculé avec la médiane récursive déterminée sur les différences. On calcule ainsi une statistique  $t(d) = \text{Médiane}(d_i) * \text{Racine carrée}(n) / s(d_i)$ . Cette valeur calculée est comparée à la valeur critique trouvée dans la table de Student ( $\alpha = 0,05$  et  $n-1$  degrés de liberté) afin de valider l'hypothèse de la nullité du biais. Le tableau 21 présente les résultats obtenus pour les trois niveaux.

Niveau	Biais (log)	$s(d_i)$	$t(d)$	Tcritique
1	0,068	0,163	1,316	2,262
2	0,021	0,083	0,794	
2 (0,1 ml)	-0,037	0,240	0	
3	0,009	0,070	0,403	

Tableau 21 : valeurs du biais et test de la nullité du biais

Pour les trois niveaux, les valeurs du biais sont comprises entre  $-0,037$  et  $0,068$  et l'hypothèse de la nullité du biais est vérifiée.

Les biais obtenus sont similaires à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

### 4.3 Calcul de la répétabilité

Pour chaque méthode, la limite de répétabilité et l'écart-type relatif de répétabilité sont calculés avec les formules suivantes :

Limite de répétabilité :  $r = 2,8 \text{ Sr}$

Ecart-type relatif de répétabilité :  $Rsr = 100 \text{ Sr} / \text{Médiane}(Mi)$

Le tableau 22 présente les résultats obtenus pour les trois niveaux.

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	r	Rsr	r	Rsr
1	0,785	16,98	0,799	17,96
2	0,131	1,77	0,329	4,42
2 (0,1 ml)	0,769	10,27	0,651	8,96
3	0,139	1,35	0,159	1,54

Tableau 22 : valeurs de r et Rsr pour les deux méthodes

Les répétabilités des deux méthodes sont comparées par l'intermédiaire d'un test de Fisher en comparant la valeur calculée de  $F = (\text{Sr}(\text{alt})/\text{Sr}(\text{ref}))^2$  à la valeur F critique déterminée pour  $\alpha = 0,05$  et n degrés de liberté.

Le tableau 23 présente les résultats obtenus.

Niveau	F calculé	F critique	n
1	1,034	2,98	10
2	<b>6,31</b>	2,98	
2 (0,1 ml)	0,717	2,98	
3	1,311	2,98	

Tableau 23 : comparaison des répétabilités des deux méthodes

Les répétabilités des méthodes sont comparables pour les niveaux 1, 2 (calculé avec 0,1 mlensemencé) et 3. Pour le niveau 2 (calculé avec les résultats de l'ensemencement des 3 boîtes à partir de la suspension mère), elles ne sont pas comparables : ce résultat est dû à une valeur de Sr extrêmement faible pour la méthode de référence pour ce niveau (0,047 contre 0,118 pour la méthode alternative). La répétabilité de la méthode alternative reste dans des valeurs acceptables pour ce niveau (0,329).

#### 4.4 Calcul de la reproductibilité

Pour chaque méthode, la limite de reproductibilité et l'écart-type relatif de reproductibilité sont calculés avec les formules suivantes :

Limite de reproductibilité :  $R = 2,8 SR$

Ecart-type relatif de répétabilité :  $R_{SR} = 100 SR / \text{Médiane}(Mi)$

Le tableau 24 présente les résultats obtenus pour les trois niveaux.

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	R	R <sub>SR</sub>	R	R <sub>SR</sub>
1	0,632	13,66	0,725	16,30
2	0,192	2,59	0,364	4,88
2 (0,1 ml)	0,608	8,12	0,682	9,38
3	0,114	1,10	0,195	1,89

Tableau 24 : valeurs de R et R<sub>SR</sub> pour les deux méthodes

Les reproductibilités des deux méthodes sont comparées par l'intermédiaire d'un test de Fisher en comparant la valeur calculée de  $F = (S_R(\text{alt})/S_R(\text{ref}))^2$  à la valeur F critique déterminée pour  $\alpha = 0,05$  et n-1 degrés de liberté.

Le tableau 25 présente les résultats obtenus.

Niveau	F calculé	F critique	n
1	1,42	3,14	10
2	<b>3,55</b>		
2 (0,1 ml)	1,33		
3	2,93		

Tableau 25 : comparaison des reproductibilités des deux méthodes

Les reproductibilités des méthodes sont comparables pour les niveaux 1, 2 (calculé avec 0,1 ml ensemencé) et 3. Pour le niveau 2 (calculé avec les résultats de l'ensemencement des 3 boîtes à partir de la suspension mère), elles ne sont pas comparables : ce résultat est dû à une valeur de S<sub>R</sub> faible pour la méthode de référence pour ces niveaux (0,068 contre 0,130 pour la méthode alternative).

Le quotient R/r a été calculé pour chaque niveau et chaque méthode. Le tableau 26 présente les résultats obtenus.

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	R/r	<=2	R/r	<=2
1	1 *	Oui	1 *	Oui
2	1,46		1,11	
2 (0,1 ml)	1 *		1,05	
3	1 *		1,23	

Tableau 26 : calcul de R/r

\* N.B : R=r car en pratique  $R < r$ .

#### 4.5 Dispersion entre les laboratoires

La probabilité d'avoir une dispersion homogène entre les laboratoires, à savoir que les différences entre laboratoires soient inférieures à la dispersion interne typique de détermination, est déterminée par le calcul de  $F = 2 (S_b/S_r)^2$  avec n-1, n degrés de libertés.

Le tableau 27 présente les résultats obtenus.

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	F	p(F)	F	p(F)
1	0,29	0,96	0,65	0,74
2	3,26	<b>0,04</b>	1,44	0,29
2 (0,1 ml)	0,25	0,98	1,19	0,39
3	0,34	0,94	2,00	0,15

Tableau 27: dispersion entre laboratoires.

La dispersion entre les laboratoires est bonne quel que soit le niveau et la méthode utilisée. La valeur p(F) obtenue pour la méthode de référence au niveau 2 (ensemencement de 1 ml sur trois boîtes) est légèrement inférieure à 5 % en raison d'un écart-type de répétabilité très faible (0,047).

## 5 Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude interlaboratoire permettent de conclure que :

- ✓ l'exactitude relative est bonne entre les deux méthodes quelque soit le niveau de contamination. Les biais varient entre -0,037 et 0,068. L'hypothèse que le biais est nul est vérifiée pour tous les niveaux de contamination. Le biais obtenu est comparable à celui obtenu lors de l'étude préliminaire.
- ✓ Les répétabilités varient entre 0,13 et 0,78 pour la méthode de référence et entre 0,16 et 0,80 pour la méthode alternative : elles sont comparables.
- ✓ Les reproductibilités varient entre 0,11 et 0,63 pour la méthode de référence et entre 0,19 et 0,72 pour la méthode alternative.
- ✓ Les valeurs de R sont inférieures ou égales aux valeurs de  $2r$  pour les deux méthodes et à tous les niveaux.

Muriel COIGNARD,  
Chef du Laboratoire