

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode CHROMagar™ *Listeria* comprend une unique étape d'enrichissement en bouillon Fraser demi suivie d'un isolement-étalement sur une seule boîte de CHROMagar™ *Listeria* qui est un milieu chromogène permettant la détection spécifique de *Listeria monocytogenes* en 24 heures. En cas d'absence de colonies typiques après 24 heures d'incubation sur CHROMagar™ *Listeria*, la méthode indique l'absence de *L. monocytogenes*, après un temps d'analyse total de 48 heures.

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

- à partir des colonies isolées sur CHROMagar™ *Listeria*, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- A partir d'une colonie suspecte bien isolée sur CHROMagar™ *Listeria*, en réalisant un spot sur une gélose CHROMagar™ Identification *Listeria* : les *Listeria monocytogenes* présentent une coloration mauve avec un halo blanc.

En cas de résultats discordants (positif sur CHROMagar™ *Listeria*, non confirmé par les tests décrits ci-dessus), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE (historique de validation)

1/ Reconduction de 2006 : Depuis la première validation délivrée en 2001, la méthode CHROMagar™ *Listeria* n'a pas subi de modifications. Une nouvelle modalité de confirmation des résultats positifs, par le test CHROMagar™ Identification *Listeria*, a été ajoutée.

Le protocole de validation ayant changé (utilisation du protocole EN ISO 16140 pour la reconduction) et la méthode de référence EN ISO 11290-1 ayant subi un amendement, l'intégralité de l'étude de validation a été refaite, à l'exception de l'étude de praticabilité de 2001, qui a été complétée par rapport à l'utilisation du nouveau test de confirmation.

2/ Reconduction de 2009 : Depuis la dernière validation en 2006, la méthode CHROMagar™ *Listeria* n'a pas été modifiée, et le protocole de validation ainsi que la méthode de référence n'ont pas changé. Aucun essai complémentaire n'a été réalisé dans le cadre de cette étude de reconduction.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2005 sur 439 échantillons de produits dont 88 naturellement contaminés, 76 artificiellement contaminés et 275 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits de la pêche, produits végétaux et divers, prélèvements d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**.

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 150 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 3 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 11 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 275 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

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

- Exactitude relative : **AC = 96,8%**
- Spécificité relative : **SP = 98,9%**

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs

- Sensibilité relative : **SE = 93,2%**

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 93,3\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,2\%$$

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

PD = 3, ND = 11 donc Y = PD + ND = 14 ; $6 \leq Y \leq 22$ m=3, M=2 donc m > M

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2005, sur les 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

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

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Rillettes	<i>L. monocytogenes</i> 4e	0,4 [0,2 - 1,0]	0,4 [0,2 - 1,0]
Saumon fumé	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	0,3 [0,1 - 1,0]	0,3 [0,1 - 1,0]
Salade	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,9 [0,5 - 1,6]	0,9 [0,5 - 1,6]
Lait cru	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,5 [0,2 - 1,3]	0,5 [0,2 - 1,3]
Eau de process	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	0,9 [0,3 - 2,2]	0,7 [0,3 - 1,9]

(3) **LOD₅₀** : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas

"Hitchins A. Proposed Used of a 50% Limit of detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of presence-Absence Microbial detection Methods, Draft 10th December, 2003"

Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,1 et 2,2 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 1,9 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 31 souches non *Listeria monocytogenes* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** avec la méthode alternative se fait en 3 jours (si confirmation avec le test CHROMagar™ Identification Listeria) ou 5 à 8 jours (si confirmation par les tests classiques) contre 7 à 11 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 5 jours (si absence de colonies typiques) à 11 jours avec la méthode de référence.
 - Dans le cas de résultats présumés **positifs** par la méthode alternative, mais rendus **négatifs après confirmation**, les résultats négatifs sont obtenus en 3 jours (si confirmation avec le test CHROMagar™ Identification Listeria) et jusqu'à 5 à 8 jours (si confirmation par les tests classiques).

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons composés d'un mélange à 50% de lait entier pasteurisé et à 50% de lait demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *Listeria monocytogenes* de sérotype 1/2 a aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (3 bactéries/ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 bactéries/ml)

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses au total pour chaque laboratoire collaborateur.

Résultats :

Niveaux de contamination	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités	Nombre de résultats négatifs		Nombre de résultats positifs	
				REF	ALT	REF	ALT
0	112	112	112	112	112	0	0
1	112	112	112	0	0	112	112
2	112	112	112	0	0	112	112

REF : méthode de référence

ALT : méthode alternative

Calculs

- Exactitude relative : 100 %
- Spécificité : 100%
- Sensibilité : 100%

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

Degré d'accord : % de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés par le même laboratoire dans des conditions de répétabilité. C'est la moyenne des probabilités que deux répliquats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Concordance : % de chance de trouver le résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). C'est le % de toutes les paires de répliquats donnant le même résultat.

Odds ratio (COR) : il est défini par la formule suivante :

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

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode alternative** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100	100	1
L1	100	100	1
L2	100	100	1

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100	100	1
L1	100	100	1
L2	100	100	1

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est identique à celle de la méthode de référence.

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org