

CONFIDENTIEL

VALIDATION AFNOR DE LA MÉTHODE CHROMagar™ Listeria
numération pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes*

RAPPORT DE SYNTHÈSE

Ce document comporte 26 pages.

Rédacteur : Muriel COIGNARD

Référence : RS/CHR-21/2

Version 1 rédigée le 15/01/2007

1. Introduction

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

| | |
|--|--|
| CHROMagar 4, Place du 18 Juin 1940 75006 PARIS Tél. 01 45 48 05 05 Fax : 01 45 48 06 06 M. Lerner | 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 de novembre 2005 à juin 2006. L'étude interlaboratoire a été réalisée en octobre 2006.

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 CHROMagar™ *Listeria* numération 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 sur 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).

2. Etude comparative

2.1 Linéarité

2.1.1 Matrices utilisées

Cinq 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,
- 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 :

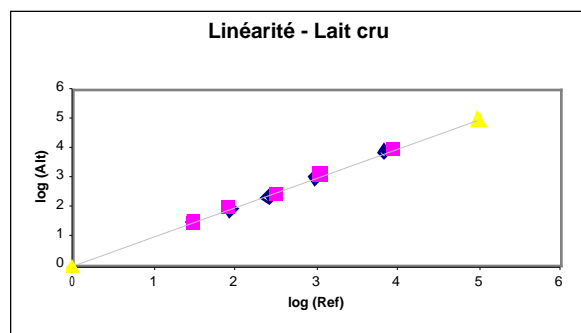
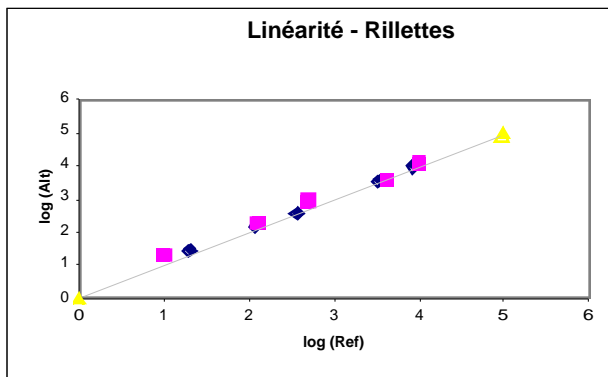
- 10 à 50 ufc par gramme,
- 50 à 100 ufc par gramme,
- 100 à 500 ufc par gramme,
- 500 à 1 000 ufc par gramme,
- 1 000 à 10 000 ufc par gramme.

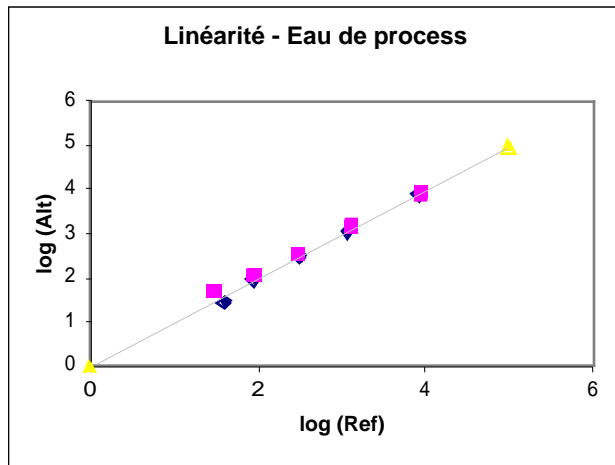
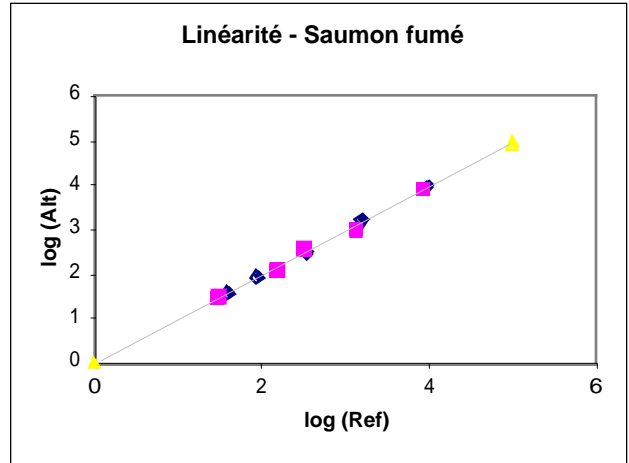
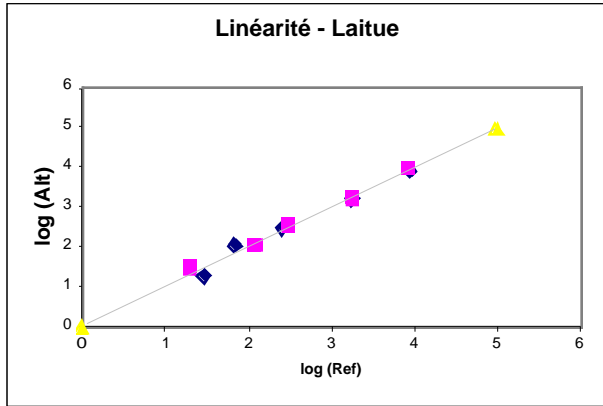
Les échantillons ont été contaminés individuellement par la souche bactérienne, et analysés en double, par la méthode alternative et par la méthode de référence.

2.1.3 Résultats bruts

Les résultats bruts de dénombrement figurent en annexe 3.

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 | 1,16 | GMFR | 4,79 | 5,41 | 6,2 | 0,9990 | $\log(\text{Alt})=0,9318 \log(\text{Ref})+0,3053$ |
| Laitue | 0,8 | GMFR | 35,53 | 5,41 | 0,1 | 0,9903 | $\log(\text{Alt})=1,0239 \log(\text{Ref})-0,0510$ |
| Lait cru | 0,72 | GMFR | 8,30 | 5,41 | 2,2 | 0,9987 | $\log(\text{Alt})=1,0105 \log(\text{Ref})-0,0036$ |
| Saumon | 1,06 | GMFR | 0,00 | 5,41 | 100 | 0,9996 | $\log(\text{Alt})=1,0060 \log(\text{Ref})-0,0310$ |
| Eau de process | 2,83 | OLS1 | 12,42 | 5,41 | 0,9 | 0,9973 | $\log(\text{Alt})=0,9669 \log(\text{Ref})+0,1224$ |

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).

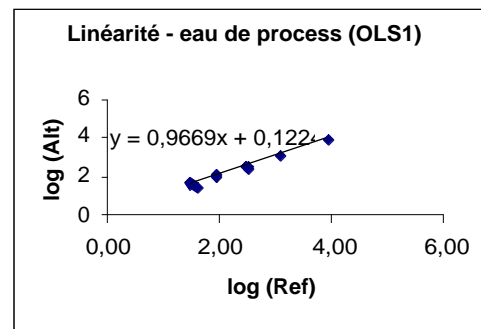
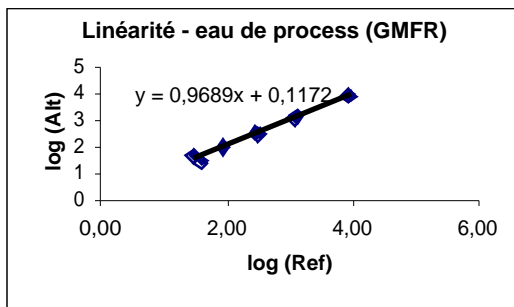
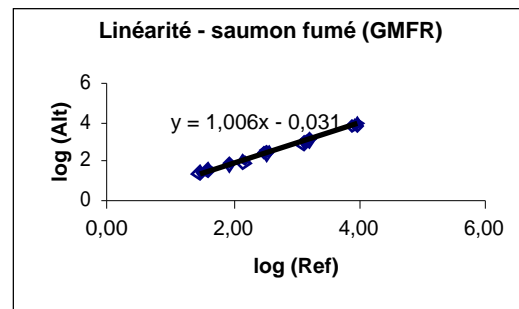
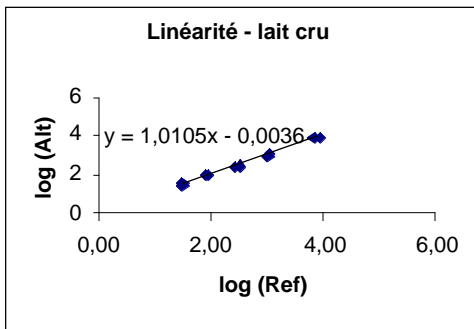
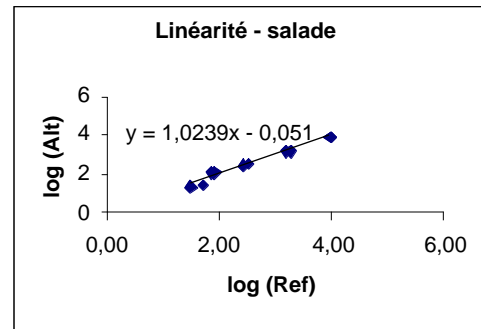
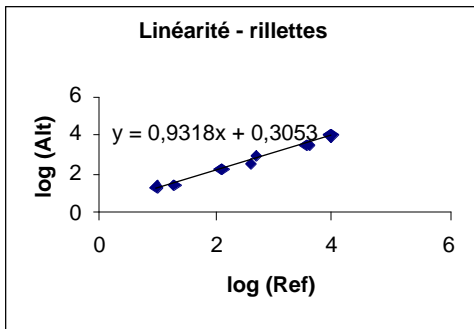
Une valeur de p% inférieure à 5 % indique une non linéarité au risque $\alpha = 5 \%$.

Pour les matrices rillettes et saumon fumé, la relation entre les deux méthodes étudiées est linéaire au risque $\alpha = 5 \%$.

Pour la matrice lait cru, la relation n'est pas linéaire entre les deux méthodes, au risque 5 % mais elle l'est au risque 1 %. Cependant, le coefficient de corrélation est très élevé (0,9987) et les hypothèses $b=1$ et $a=0$ sont vérifiées, respectivement à 75 % et 97 %.

Pour les matrices salade et eau de process, la relation n'est pas linéaire entre les deux méthodes. Cependant, les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,99 (respectivement 0,9903 et 0,9973) et les hypothèses $b=1$ et $a=0$ sont vérifiées.

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 quatre 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.

Tableau 2

| Catégories | Types | Nombre d'échantillons | |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------|
| | | Analysés | Exploités (1) |
| Produits carnés | Viandes crues | 9 | 5 |
| | Produits carnés transformés à cuire | 8 | 1 |
| | Charcuteries prêtes à consommer | 10 | 4 |
| | Total | 27 | 10 |
| Produits laitiers | Fromages au lait cru | 6 | 4 |
| | Laits crus | 4 | 3 |
| | Autres produits laitiers | 5 | 5 |
| | Total | 15 | 12 |
| Produits de la pêche | Poissons crus | 8 | 5 |
| | Poissons transformés | 6 | 2 |
| | Produits prêts à consommer | 11 | 4 |
| | Total | 25 | 11 |
| Produits végétaux | Végétaux crus | 5 | 4 |
| | Végétaux surgelés | 2 | 2 |
| | Salades, crudités | 5 | 5 |
| | Total | 12 | 11 |
| Prélèvements d'environnement | Prélèvements de surfaces | 8 | 4 |
| | Eaux de process | 2 | 2 |
| | Poussières et résidus | 4 | 4 |
| | Total | 14 | 10 |
| TOTAL | | 93 | 54 |

(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

| Stress N° | Nature du stress | Souche utilisée | Origine |
|-----------|-------------------------------|--------------------------|--|
| 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 48 | Lait cru Environnement Saumon fumé |
| 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 | Rillettes Salade |

Le nombre d'échantillons contaminés artificiellement par rapport au nombre d'échantillons positifs est de 42 sur 93, soit 45,2 %. Parmi les résultats positifs exploités, 44 échantillons sur 54 sont artificiellement contaminés, soit un pourcentage de 81,5 %.

Le nombre d'échantillons naturellement contaminés et positifs pour au moins un résultat est de 12. Parmi les résultats exploités, 10 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. Pour la méthode CHROMagar™ Listeria numération, la confirmation a également été réalisée par le test CHROMagar™ Identification Listeria. Seul le nombre de colonies confirmées diffère, pour la méthode alternative, une seule colonie par échantillon a été confirmée.

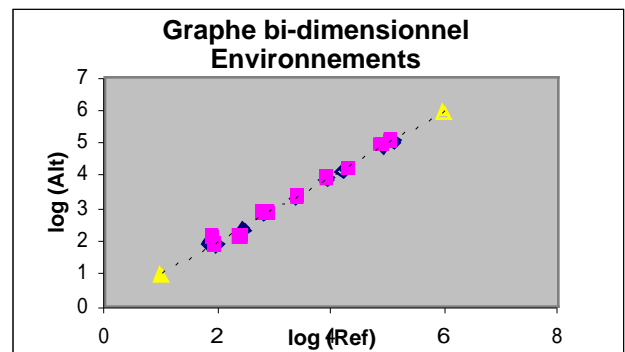
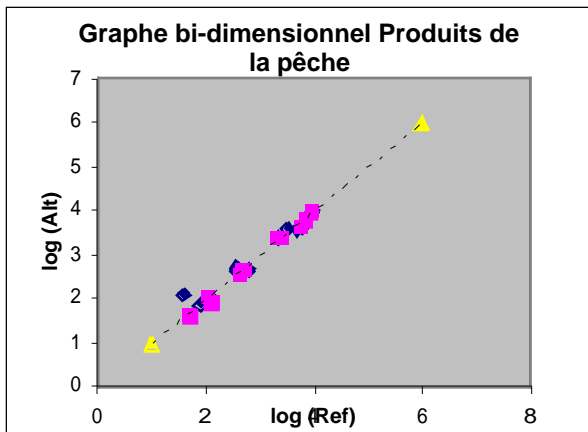
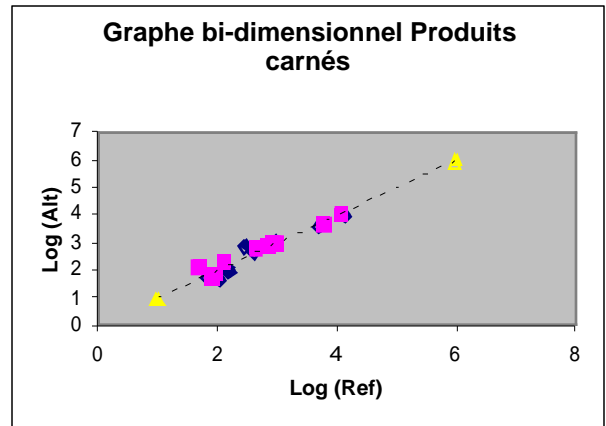
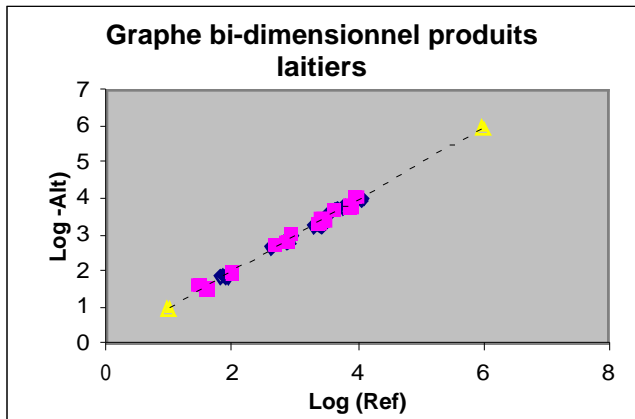
2.2.4 Résultats bruts

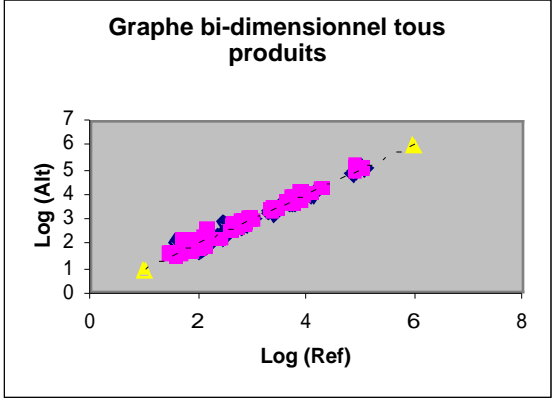
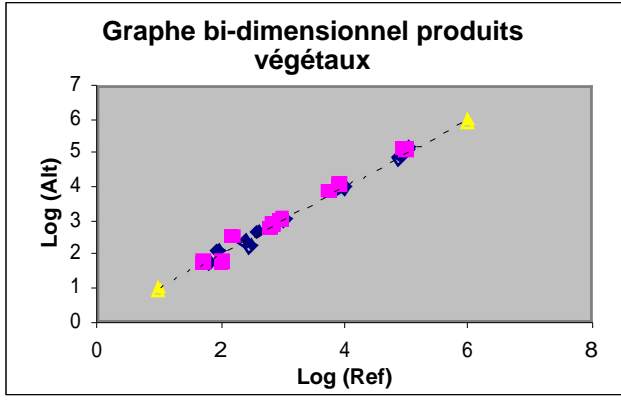
Le tableau 4 présente les domaines de contamination exprimés en logarithme pour chaque catégorie d'aliments.

Tableau 4

| Catégorie d'aliments | Domaine de contamination (log) |
|------------------------------|--------------------------------|
| Produits carnés | 1,70 – 4,15 |
| Produits laitiers | 1,48 – 4,08 |
| Produits de la pêche | 1,60 – 4,00 |
| Produits végétaux | 1,84 – 5,11 |
| Prélèvements d'environnement | 1,70 – 5,18 |
| Toutes catégories | 1,48 – 5,18 |

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 | 0,87 | GMFR | -0,027 | 0,135 | 0,988 | 0,168 | 2,306 | 0,87 | 0,90 |
| Produits laitiers | 12 | 1,14 | GMFR | 0,002 | 0,033 | 0,994 | 0,224 | 2,228 | 0,83 | 0,97 |
| Produits de la pêche | 11 | 1,91 | GMFR | 0,078 | 0,67 | 0,971 | 0,761 | 2,262 | 0,47 | 0,52 |
| Produits végétaux | 11 | 2,43 | OLS1 | -0,048 | 0,634 | 1,036 | 1,626 | 2,262 | 0,12 | 0,53 |
| Prélèvements d'environnement | 10 | 1,50 | GMFR | 0,027 | 0,353 | 0,995 | 0,191 | 2,306 | 0,85 | 0,73 |
| Tous produits | 54 | 1,19 | GMFR | -0,012 | 0,279 | 1,008 | 0,54 | 2,000 | 0,59 | 0,78 |

GMFR : régression linéaire orthogonale

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 | -0,006 | 0,023 | 0,318 | 0,278 | 0,213 | 0,152 |
| Produits laitiers | -0,013 | 0,011 | 0,312 | 0,357 | 0,196 | 0,184 |
| Produits de la pêche | -0,008 | -0,004 | 0,188 | 0,358 | 0,196 | 0,108 |
| Produits végétaux | 0,068 | 0,077 | 0,369 | 0,409 | 0,186 | 0,455 |
| Prélèvements d'environnement | 0,018 | 0,016 | 0,135 | 0,203 | 0,198 | 0,132 |
| Tous produits | 0,011 | 0,016 | 0,280 | 0,332 | 0,196 | 0,176 |

2.2.6 Conclusion

Les biais entre les deux méthodes varient, en valeur moyenne de -0,013 à +0,068 et en valeur médiane de -0,011 à +0,077 : il n'y a pas de biais systématique entre les deux méthodes, la valeur moyenne globale du biais étant de 0,011 et la valeur médiane de 0,016. Les limites de répétabilité de la méthode alternative sont comparables à celles de la méthode de référence.

Concernant les pentes et ordonnées à l'origine, les hypothèses, $b=1$ et $a=0$ sont vérifiées pour toutes les catégories. Pour l'ensemble des catégories, le $p\%$ sur l'ordonnée à l'origine est de 78 % et sur la pente de 59 %.

La méthode CHROMagar™ *Listeria* numération 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 CHROMagar™ Listeria, tel que décrit dans la notice de la méthode CHROMagar™ Listeria numération. Un ml a été ensemercé 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 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 : ensemencement de 0,1 ml sur 3 boîtes

| Niveau (UFC/ml) | Nombre d'échantillons positifs | Ecart-type s_o | Biais x_o |
|-----------------|--------------------------------|------------------|-------------|
| 34 | 6/6 | 1,79 | 2,5 |
| 10,7 | 4/6 | 1,1926 | 1 |
| 4,9 | 3/6 | 1,1926 | 0,5 |

Tableau 8 : ensemencement de 1 ml sur 1 boîte

| Niveau (UFC /ml) | Nombre d'échantillons positifs | Ecart-type s_o | Biais x_o |
|------------------|--------------------------------|------------------|-------------|
| 4,5 | 6/6 | 0,60 | 4 |
| 1,7 | 4/6 | 1,1926 | 1 |
| 0,7 | 2/6 | 0 | 0 |

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

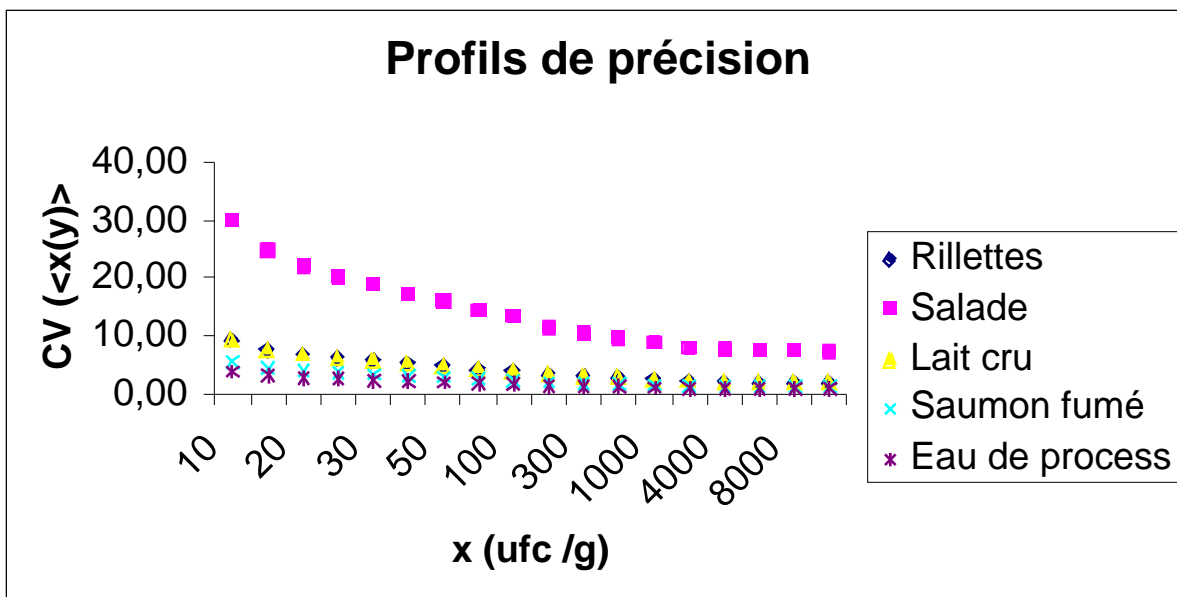
Tableau 9

| | Formule | Valeur obtenue (1 ml sur 3 boîtes) | Valeur obtenue (0,1 ml sur 1 boîte) |
|-----|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| LC | $1,65 s_o + x_o$ | 5,45 | 7,38 |
| LOD | $3,3 s_o + x_o$ | 5,98 | 8,41 |
| LOQ | $10 s_o + x_o$ | 10 | 20,4 |

2.4 Sensibilité relative

Les données sont intrinsèques à la méthode et sont obtenues à partir des données de l'étude de linéarité.

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

| Critère | Données |
|---|--|
| 1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode | La gélose CHROMagar™ <i>Listeria</i> est disponible en conditionnement de 10 boîtes en pré-coulé ou en poudre déshydratée. |
| 2. Volume des réactifs | Sans objet. |
| 3. Conditions de stockage des éléments et péremption des produits non ouverts | La température de stockage de la poudre est 2-30 °C. Les boîtes se conservent à 2-8 °C. |
| 4. Modalités d'utilisation après première utilisation | Le milieu préparé se conserve deux semaines à 2-8°C. |
| 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 | Les deux possibilités |
| 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 par les tests de la méthode de référence ou J3 par le test CHROMagar™ Identification Listeria |
| 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 Conclusion

La méthode CHROMagar™ Listeria numération 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 très satisfaisante,
- une limite de détection d'environ 6 à 8 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.

3. Etude interlaboratoire

3.1 Organisation de l'étude

3.1.1 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 contaminé 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 aérobique 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.

3.1.2 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 - 500 / ml
- 500 – 5 000 / ml
- 5 000 – 50 000/ ml

Deux flacons ont été préparés pour chaque taux.

3.1.3 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 aérobique 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 02/10/2006.

3.1.4 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, le laboratoire expert et deux autres fournisseurs ; 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.

3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

3.2.1 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 | 2 - 5 | 0 |
| 50 - 500 | 7 - 1 | 120 |
| 500 – 5 000 | 4 - 8 | 1 200 |
| 5000 – 50 000 | 6 - 9 | 12 000 |

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) |
|------------|-----------------------|--|--|
| 02/10/2006 | 50 - 500 | 130 | 2,11 |
| | 500 – 5 000 | 1 400 | 3,15 |
| | 5000 – 50 000 | 14 000 | 4,15 |
| 03/10/2006 | 50 - 500 | 100 | 2,00 |
| | 500 – 5 000 | 1 200 | 3,08 |
| | 5000 – 50 000 | 14 000 | 4,15 |

Tableau 12 : stabilité des échantillons

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

3.2.2 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 | 03/10/2006 | 9h15 | 7,5 | 0 ; 7,5 |
| B | | 9h15 | 7,4 | 1 ; 7,5 |
| C | | 17h00 | 7,8 | - |
| D | | NC ¹ | NC | 0 ; 5,5 |
| E | | 11h00 | 6,2 | -1 ; 6,0 |
| F | | 11h40 | 8,5 | 0 ; 8,0 |
| G | | 11h00 | 6,9 | 4 ; 7,5 |
| H | | 8h40 | 10,0 | 4 ; 8,0 |
| I | | 9h30 | 7,8 | 0 ; 7,5 |
| J | | 10h15 | 5,9 | 0 ; 4,5 |
| K | | 15h30 | 9,3 | 4 ; 6,0 |
| L | | 11h15 | 9,3 | 3 ; 7,0 |

Tableau 13 : températures à réception des colis

Pour tous les laboratoires collaborateurs, la température était conforme car inférieure à 8,4 °C (indication du thermobouton).

Tous les laboratoires ont reçu leur colis le lendemain de l'envoi soit le 03/10/2006 avant 14 h, à l'exception du laboratoire C qui a reçu le colis après 14 h (à 17h) et n'a pas réalisé les analyses. Le laboratoire A a reçu un échantillon légèrement fuité et a réalisé les analyses. Le laboratoire D a « oublié » le colis en chambre froide toute la journée, sans le traiter (aucune température à réception n'a donc été relevée) et les analyses ont été réalisées de nuit.

Le laboratoire E a réalisé les essais, mais avec une lecture à 24 h uniquement.

3.2.3 Conclusion

Le laboratoire C est exclu car il n'a pas réalisé les analyses en raison d'une réception tardive des échantillons. Le laboratoire E est exclu pour non respect du protocole. Au total, l'exploitation des résultats est réalisée avec 10 laboratoires.

¹ NC : Non communiqué

3.3 Résultats

3.3.1 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 $7,0 \cdot 10^3$ / ml et $2,0 \cdot 10^4$ / ml avec une moyenne de $1,2 \cdot 10^4$ / ml.

Les résultats de chaque laboratoire collaborateur sont présentés en annexe 5 en dessous de chaque tableau de résultats bruts.

3.3.2 Résultats obtenus par le laboratoire expert

Le tableau 14 présente une synthèse des résultats obtenus.

| Taux visés | Méthode de référence ISO 11290-2 | | Méthode alternative CHROMagar™ Listeria numération | |
|----------------|----------------------------------|------------|--|------------|
| | Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 | Réplicat 2 |
| < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | <10 |
| 50 - 500 | 150 | 110 (Ne) | 110 (Ne) | 150 |
| 500 – 5 000 | 1 300 | 1 200 | 1 400 | 1 300 |
| 5 000 – 50 000 | 14 000 | 14 000 | 18 000 | 10 000 |

Tableau 14 : résultats du laboratoire expert

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

Les confirmations ont été réalisées par le laboratoire expert selon les tests suivants :

- pour la méthode de référence : coloration de Gram, catalase, hémolyse, galerie biochimique.
- Pour la méthode CHROMagar : spot d'une colonie bien isolée sur gélose CHROMagar™ Identification Listeria

3.3.3 Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs

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 CHROMagar™ Listeria numération | |
|-------------|----------------------------------|------------|--|------------|
| | Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 | Réplicat 2 |
| A | 120 | 95 | 100 | 150 |
| B | 140 | 140 | 150 | 140 |
| D | 110 | 130 | 110 | 60 |
| E | 140 | 140 | 110 | 60 |
| F | 100 | 80 | 120 | 140 |
| G | 150 | 140 | 160 | 140 |
| H | 100 | 140 | 170 | 150 |
| I | 130 | 140 | 130 | 120 |
| J | 100 | 90 | 100 | 140 |
| K | 110 | 100 | 120 | 120 |
| L | 120 | 120 | 130 | 130 |

Tableau 15: résultats des laboratoires collaborateurs – niveau 1

| Laboratoire | Méthode de référence ISO 11290-2 | | Méthode alternative CHROMagar™ Listeria numération | |
|-------------|----------------------------------|------------|--|------------|
| | Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 | Réplicat 2 |
| A | 1200 | 1300 | 1100 | 1100 |
| B | 1100 | 1400 | 1200 | 1300 |
| C | 1100 | 1000 | 1100 | 890 |
| E | 1100 | 1200 | 1200 | 1400 |
| F | 1100 | 1200 | 1200 | 1100 |
| G | 1200 | 1200 | 1200 | 1100 |
| H | 1300 | 1200 | 1400 | 1100 |
| I | 1200 | 980 | 1200 | 830 |
| J | 1200 | 1100 | 1100 | 1000 |
| K | 1300 | 1200 | 1500 | 1300 |
| L | 1200 | 1300 | 1200 | 1100 |

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 CHROMagar™ Listeria numération | |
|-------------|----------------------------------|------------|--|--------------|
| | Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 | Réplicat 2 |
| A | 14000 | 13000 | 12000 | 10000 |
| B | 12000 | 15000 | 14000 | 18000 |
| C | 13000 | 13000 | 14000 | 12000 |
| E | 12000 | 12000 | 13000 | 13000 |
| F | 13000 | 14000 | 12000 | 14000 |
| G | 15000 | 13000 | 14000 | 14000 |
| H | 14000 | 11000 | 12000 | 14000 |
| I | 15000 | 13000 | 15000 | 11000 |
| J | 17000 | 13000 | 9900 | 9000 |
| K | 13000 | 15000 | 11000 | 13000 |
| L | 14000 | 13000 | 12000 | 10000 |

Tableau 17 : résultats des laboratoires collaborateurs – niveau 3

3.4 Conclusion

Tous les laboratoires ont respecté le protocole décrit dans les instructions, à l'exception du laboratoire E, exclu. Les modalités de confirmation ont été respectées.

- pour la méthode de référence : coloration de Gram, catalase, hémolyse, galerie biochimique.
- Pour la méthode CHROMagar : spot d'une colonie bien isolée sur gélose CHROMagar™ Identification Listeria

3.4 Calculs

3.4.1 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) | 2,075 | 2,105 |
| Médiane récursive | $S_n =$ Médiane(Médiane des écarts des Mi) | 0,058 | 0,039 |
| Ecart-type de répétabilité | $S_r = 1,4826 *$ Médiane (si) | 0,046 | 0,059 |
| Ecart-type de reproductibilité | $S_R =$ Racine carrée ($S_b^2 + S_r^2 / 2$) $S_b = 1,1926 * S_n$ | 0,077 | 0,062 |

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) | 3,086 | 3,060 |
| Médiane récursive | $S_n =$ Médiane(Médiane des écarts des Mi) | 0,017 | 0,052 |
| Ecart-type de répétabilité | $S_r = 1,4826 *$ Médiane (si) | 0,038 | 0,054 |
| Ecart-type de reproductibilité | $S_R =$ Racine carrée ($S_b^2 + S_r^2 / 2$) $S_b = 1,1926 * S_n$ | 0,034 | 0,073 |

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) | 4,129 | 4,113 |
| Médiane récursive | $S_n = \text{Médiane}(\text{Médiane des écarts des Mi})$ | 0,029 | 0,038 |
| Ecart-type de répétabilité | $S_r = 1,4826 * \text{Médiane}(s_i)$ | 0,065 | 0,070 |
| Ecart-type de reproductibilité | $S_R = \text{Racine carrée}(S_b^2 + S_r^2 / 2)$ $S_b = 1,1926 * S_n$ | 0,058 | 0,067 |

Tableau 20 : Estimateurs calculés pour le niveau 3.

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 | 0,047 | 0,092 | 1,609 | 2,262 |
| 2 | -0,022 | 0,033 | -2,094 | |
| 3 | 0,000 | 0,065 | 0 | |

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

Pour les trois niveaux, les valeurs du biais sont comprises entre $-0,022$ et $0,047$ et l'hypothèse de la nullité du biais est vérifiée.

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

3.4.3 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 : $r = 2,8 S_r$

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

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

| Niveau | Méthode de référence | | Méthode alternative | |
|--------|----------------------|-------|---------------------|-------|
| | r | Rsr | r | Rsr |
| 1 | 0,128 | 2,201 | 0,165 | 2,798 |
| 2 | 0,106 – 0,095 * | 1,232 | 0,152 | 1,773 |
| 3 | 0,182 – 0,162 * | 1,578 | 0,197 – 0,188 * | 1,707 |

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

* Valeurs de R puisque R=r

Les répétabilités des deux méthodes sont comparées par l'intermédiaire d'un test de Fisher en comparant la valeur calculée de $F = (Sr(alt)/Sr(ref))^2$ 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 | 1,662 | 2,98 | 10 |
| 2 | 2,037 | 2,98 | |
| 3 | 1,160 | 2,98 | |

Tableau 23 : comparaison des répétabilités des deux méthodes

Les répétabilités des méthodes sont comparables pour tous les niveaux.

3.4.4 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_{SR} | R | R_{SR} |
| 1 | 0,215 | 3,704 | 0,175 | 2,967 |
| 2 | 0,095 * | 1,100 | 0,204 | 2,377 |
| 3 | 0,162 * | 1,397 | 0,188 * | 1,629 |

Tableau 24 : valeurs de R et R_{SR} pour les deux méthodes (* reproductibilité inférieure à la valeur de la répétabilité)

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 (ou 1/F) | F critique | n |
|--------|--------------------|------------|----|
| 1 | 1,558 (1/F) | 3,14 | 10 |
| 2 | 4,669 | | |
| 3 | 1,359 | | |

Tableau 25 : comparaison des reproductibilités des deux méthodes

Les reproductibilités des méthodes sont comparables pour les niveaux 1 et 3. Pour le niveau 2, la valeur particulièrement faible de la reproductibilité pour la méthode de référence fait que la valeur de F est supérieure au F critique (0,095).

Le quotient R/r a été calculé pour chaque niveau et chaque méthode. Le tableau 16 présente les résultats obtenus.

| Niveau | Méthode de référence | | Méthode alternative | |
|--------|----------------------|----------|---------------------|----------|
| | R/r | ≤ 2 | R /r | ≤ 2 |
| 1 | 1,68 | Oui | 1,06 | Oui |
| 2 | 1 * | | 1,34 | |
| 3 | 1 * | | 1 * | |

Tableau 26 : calcul de R/r

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

3.4.5 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 $F = 2 (S_p/S_s)^2$ avec n-1, n degrés de libertés.

Le tableau 27 présente les résultats obtenus.

| Niveau | Méthode de référence | | Méthode alternative | |
|--------|----------------------|--------------|---------------------|------|
| | F (ou 1/F) | p(F) | F | p(F) |
| 1 | 4,62 | 0,012 | 1,24 | 0,36 |
| 2 | 1,68 (1/F) | 0,21 | 2,59 | 0,08 |
| 3 | 1,76 (1/F) | 0,20 | 1,22 (1/F) | 0,38 |

Tableau 27 : dispersion entre laboratoires.

La dispersion entre les laboratoires est bonne quelque soit le niveau et la méthode utilisée. La valeur p(F) obtenue pour la méthode de référence au niveau 1

(ensemencement de 1 ml sur trois boîtes) est inférieure à 5 % en raison d'un écart-type de répétabilité très faible (0,046).

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 $-0,022$ et $0,047$. 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 $0,11$ et $0,18$ pour la méthode de référence et entre $0,15$ et $0,20$ pour la méthode alternative : elles sont comparables.
- Les reproductibilités varient entre $0,095$ et $0,215$ pour la méthode de référence et entre $0,175$ et $0,204$ pour la méthode alternative : elles sont comparables.
- Les valeurs de R sont inférieures ou égales aux valeurs de $2r$ pour les deux méthodes et à tous les niveaux.