

Validation AFNOR du système 3M™
Petrifilm™ Staph Express (STX)
pour la numération de *Staphylococcus*
« à coagulase positive »

Méthode de référence NF EN ISO 6888-1

Rapport de synthèse

Synthèse Petrifilm STX vs BP 2007-v01

Date de validation: 02/04/2003
Date de reconduction: 29/03/2007
Numéro d'attestation : 3M 01/9-04/03 A

Etude réalisée par :

L'INSTITUT PASTEUR DE LILLE
S.E.R.M.H.A.
1 rue du Professeur Calmette
BP.245
59019 LILLE CEDEX
FRANCE

pour :

LABORATOIRES 3M SANTE
Boulevard de l'Oise
95 029 CERGY PONTOISE CEDEX
FRANCE

1 Introduction

1.1 Référentiel de validation

L'étude de reconduction de validation de la méthode Petrifilm Staph Express pour le dénombrement de *Staphylococcus* à coagulase positive a été réalisée en conformité avec le référentiel NF EN ISO 16140 par rapport à la méthode de référence ISO 6888-1:2004.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

1.2.1 Principe de la méthode

Le système de numération Petrifilm™ Staph Express comprend un test Petrifilm Staph Express pour la numération de *Staphylococcus* à coagulase positive et un disque pour test Petrifilm Staph Express, qui sont conditionnés séparément.

Le test Petrifilm Staph Express est un milieu de culture prêt à l'emploi qui contient un agent gélifiant soluble dans l'eau froide. C'est un milieu chromogène, dérivé du milieu de Baird-Parker, sélectif et différentiel pour *Staphylococcus* à coagulase positive.

Le disque pour test Petrifilm Staph Express contient un système de détection au bleu de O-Toluidine qui facilite l'observation des réactions de desoxyribonucléase (DNase).

Les microorganismes à DNase positive détectés par les tests Petrifilm Staph Express sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* et *Staphylococcus intermedius*. Ces trois espèces comprennent la majorité des microorganismes communément connus comme staphylocoques à coagulase positive.

1.2.2 Protocole de la méthode

Les schémas analytiques sont présentés sur les figures 1 and 2.

Figure 1 : Test 3M™ Petrifilm™ Staph Express

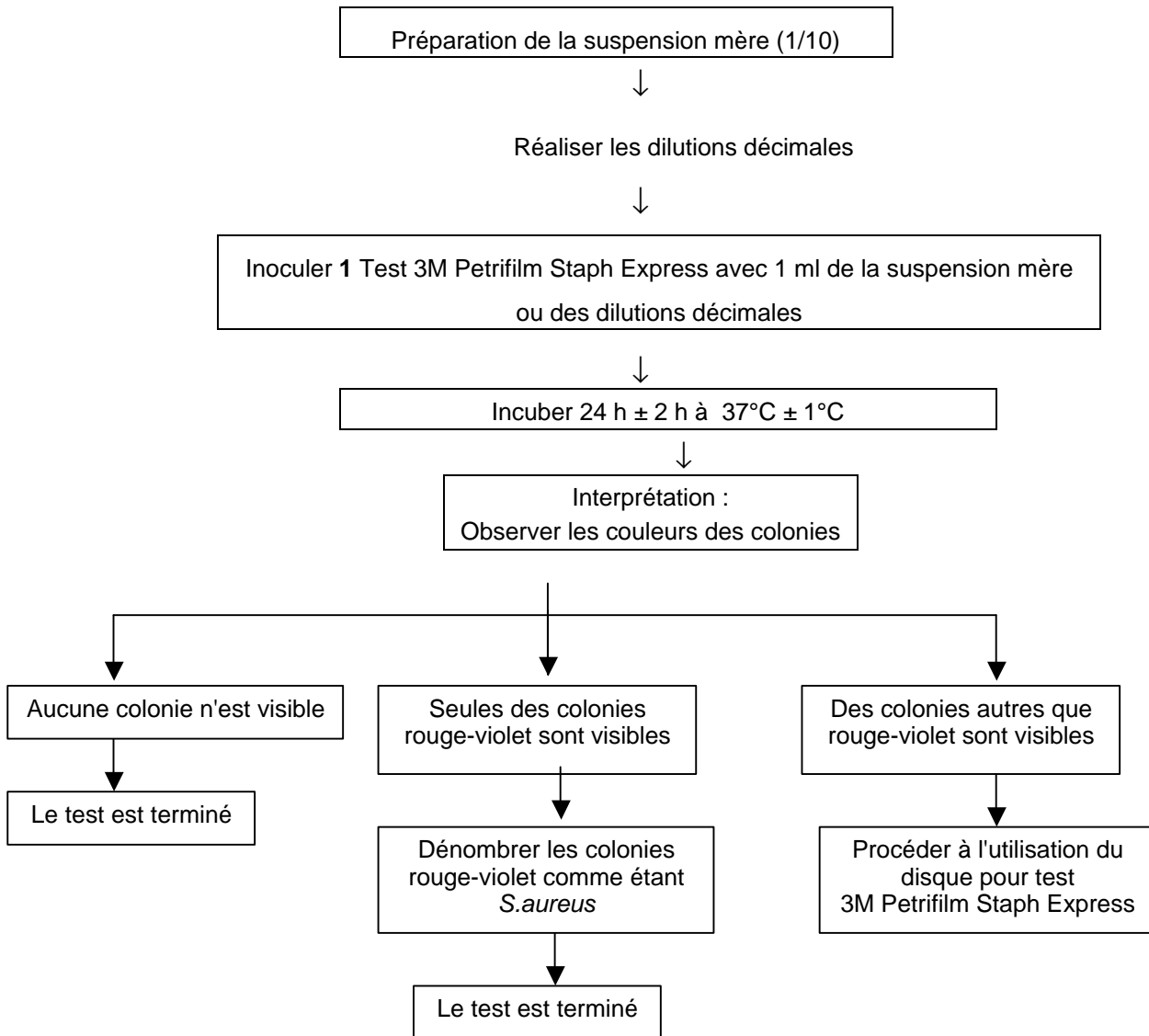
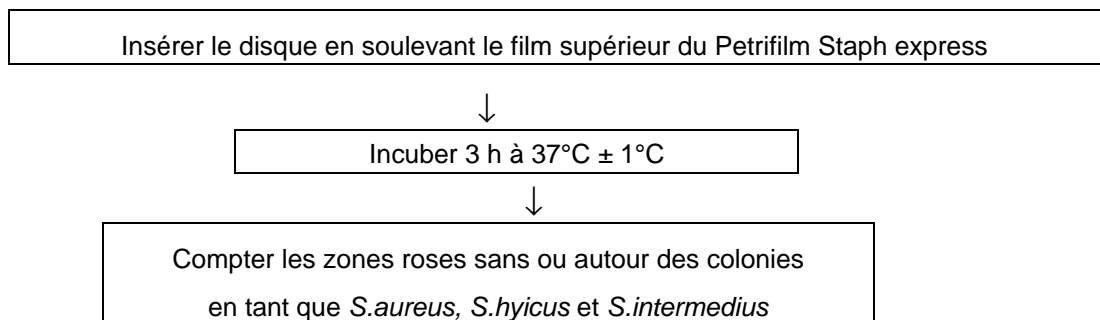


Figure 2 : Disque 3M™ Petrifilm™ Staph Express



1.3 Domaine d'application

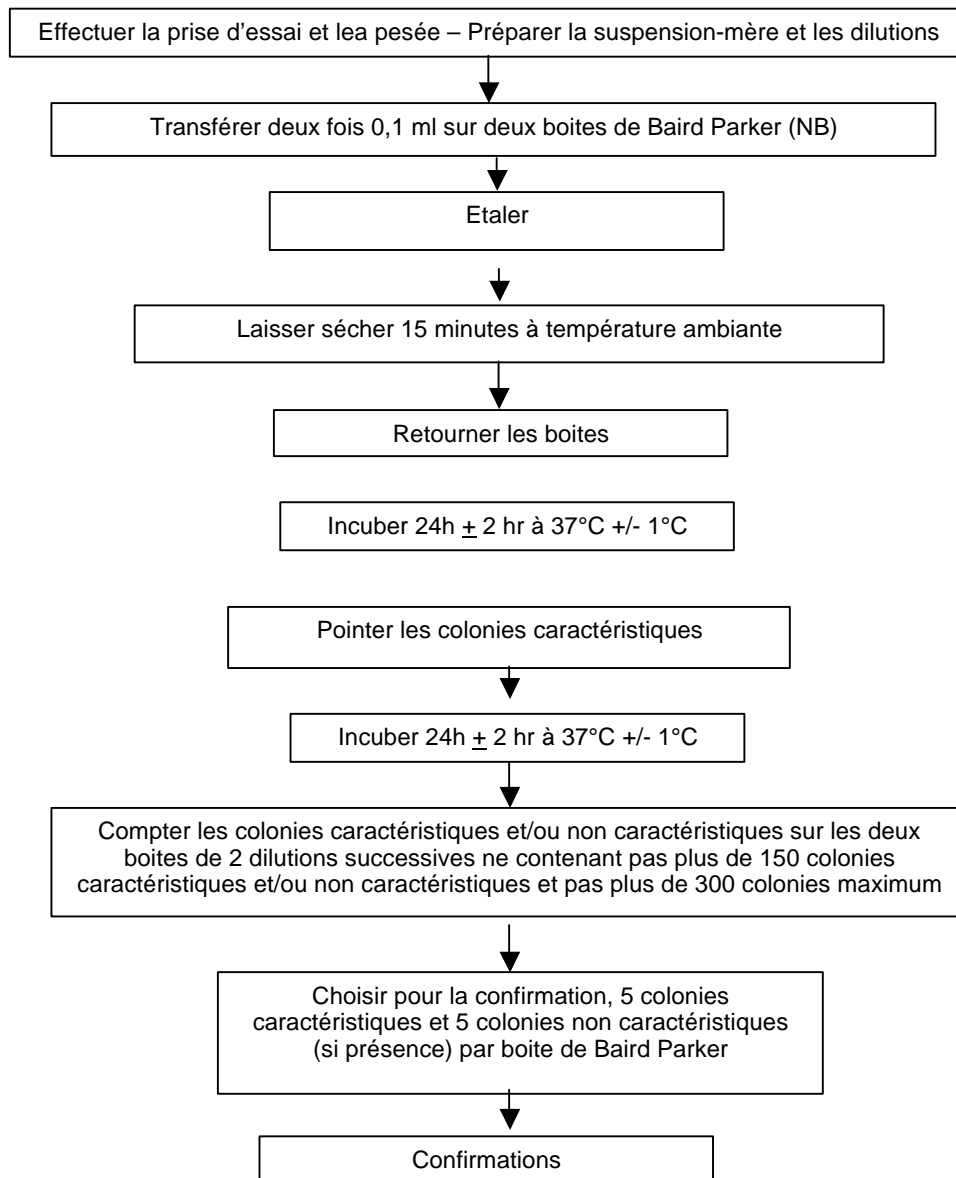
Tous produits d'alimentation humaine et d'alimentation pour animaux de compagnie

1.4 Méthode de référence

La méthode NF EN ISO 6888-1 :1999 et NF EN ISO 6888-1/A1 :2004, utilisant le milieu Baird Parker, ensemencé en surface, est la méthode de référence qui a été utilisée dans le cadre de cette validation. Cette méthode est une méthode avec confirmation des colonies caractéristiques et non caractéristiques par le test de la coagulase.

Le schéma analytique est présenté sur les figures 3 et 4.

Figure 3 : NORME NF EN ISO 6888-1
Protocole d'ensemencement

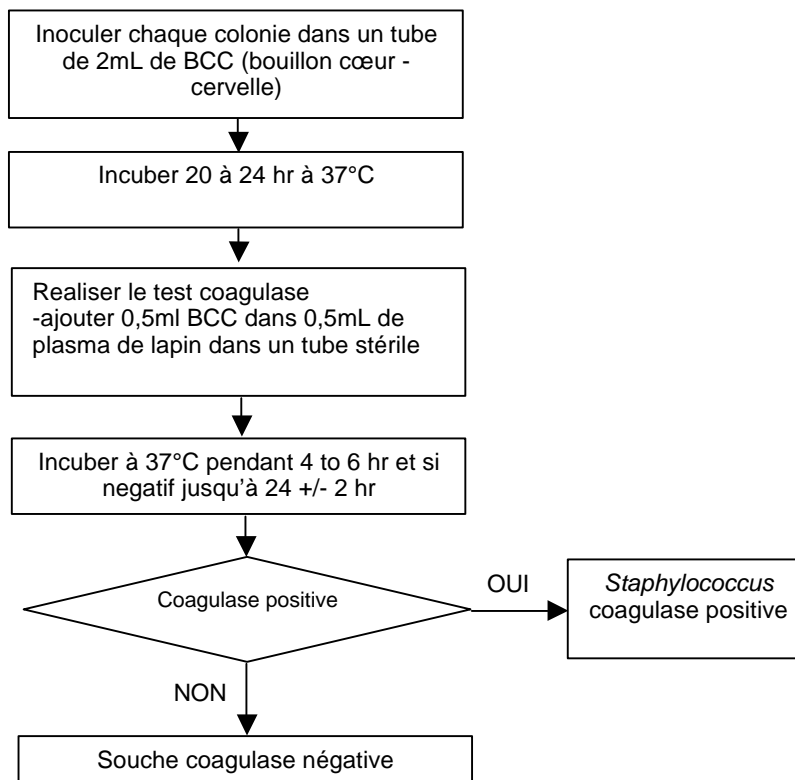


NB : Dans certains cas, s'il est nécessaire de procéder à des dénombrements de petits nombres de staphylocoques, il est possible d'ensemencer 2 fois 1 ml à la surface de 3 boîtes en 0.3 ml, 0.3 ml et 0.4 ml (soit 6 boîtes).

Dans ce cas, effectuer les opérations de dénombrement et de confirmation sur l'ensemble de ces boîtes comme s'il s'agissait de deux boîtes.

Au cours de l'étude de validation, 6 BP (2 x 1 mL) et 2 BP avec 0,1 mL de suspension-mère ont systématiquement été ensemencées.

Figure 4 : EN ISO 6888-1
Protocole de confirmation



1.5 Historique de la validation

La méthode Petrifilm Staph Express est validée sous le numéro d'attestation 3M 01/9-04/03 depuis avril 2003, pour l'alimentation humaine.

La méthode de référence utilisée était la norme NF EN ISO 6888-1 :1999, toujours en vigueur. Un amendement a été publié en Janvier 2004, ne modifiant pas la méthode, mais incluant uniquement des données de fidélité.

Les principaux éléments de validation liés à la méthode sont repris en annexe A.
L'étude de recondution a été revue afin d'être conforme au référentiel ISO 16140.

Des résultats de l'étude de validation de 2003 ont été repris dans les parties « exactitude relative », « linéarité », et « inclusivité/exclusivité ».

2 Etude comparative des méthodes

Les critères suivant ont été déterminés :

- linéarité
- exactitude relative
- inclusivité et exclusivité
- praticabilité

2.1 Exactitude relative

L'exactitude relative définie dans la norme NF EN ISO 16140 est l'écart entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

2.1.1 Nature des essais

Les produits ont été analysés en double par les 2 méthodes :

- la méthode de référence EN ISO 6888-1, utilisant la gélose Baird Parker,
- le système STX.

Au total, 200 produits ont été analysés, de manière à obtenir au moins 50 résultats exploitables.

Les catégories alimentaires et les types d'échantillons étaient les suivants :

Catégories	Types	Echantillons analysés	Echantillons exploités
Produits carnés	viandes et abats	27	14
	produits préparés à cuire	12	9
	charcuteries	15	6
	TOTAL	54	29, dont 28 résultats de 2003
Produits laitiers	fromages au lait cru	30	8
	lait et crème crus	14	9
	glaces	4	5
	TOTAL	49	22, dont 18 résultats de 2003
Produits de la pêche	poissons crus	10	6
	crustacés	9	6
	produits préparés	12	5
	TOTAL	31	17, dont 16 résultats de 2003
Produits végétaux	crus	4	2
	salades	19	11
	cuits	4	3
	TOTAL	27	16, dont 9 résultats de 2003
Pâtisseries Ovoproduits	pâtisserie avec crème	8	6
	pâtisserie avec crème aux œufs	6	3
	ovoproduits	3	1
	TOTAL	17	10, dont 10 résultats de 2003
Alimentation animale (animaux de compagnie)	croquettes	13	6
	à base de viande crue	5	5
	pâtés	4	1
	TOTAL	22	12, dont 0 résultats de 2003
TOTAL		200	106

Les 94 échantillons pour lesquels les résultats n'étaient pas interprétables présentaient :

- des dénombrements inférieurs à 10 UFC/g (ou <100 UFC/g) par les deux méthodes pour 58 d'entre-eux,
- des dénombrements inférieurs à 10 UFC/g (ou plus) par l'une des deux méthodes pour 12 d'entre-eux,
- des résultats non interprétables (envahissement ou trop de flore interférente) pour 24 d'entre-eux

2.1.2 Contaminations artificielles

Des contaminations artificielles ont été réalisées, en utilisant des suspensions contaminantes stressées dont le traitement et l'efficacité du stress ont été déterminés. 18 résultats ont été exploités suite à des contaminations artificielles.

Le pourcentage de contaminations artificielles est de 17% pour l'ensemble des échantillons dont les résultats étaient interprétables.

2.1.3 Résultats bruts

Chaque échantillon a été analysé en double par la méthode alternative et par la méthode de référence. Les résultats obtenus pour chaque méthode, exprimés en log, figurent en annexe B.

Selon la norme NF EN ISO 16140, un graphique bidimensionnel avec les valeurs de chaque échantillon a été tracé. A priori, l'axe vertical (y) est utilisé pour la méthode alternative et l'axe horizontal (x) est utilisé pour la méthode de référence.

Les données ont ensuite été testées par un programme de régression linéaire, afin de déterminer la valeur de l'intercept (a) et la valeur de la pente (b).

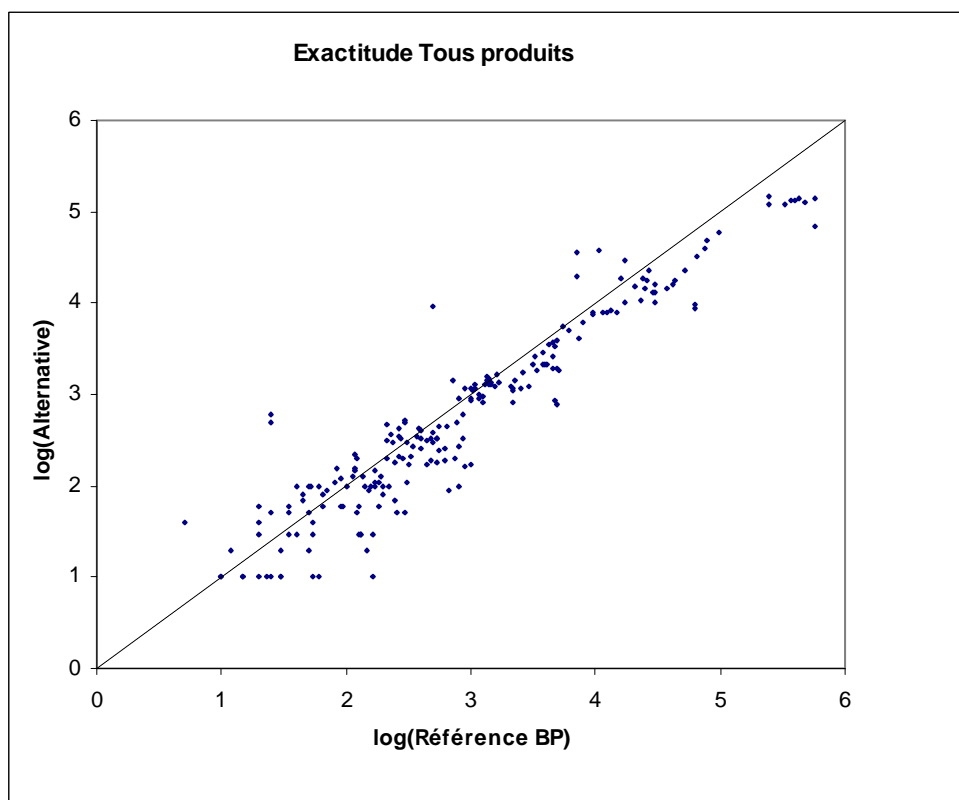
La relation d'exactitude relative est évaluée avec le modèle : $y = bx + a$.

Pour chacune des méthodes, les écarts-type de répétabilité ont calculés ($sr(x)$ et $Rob.sr(x)$ & $sr(y)$ et $Rob.sr(y)$).

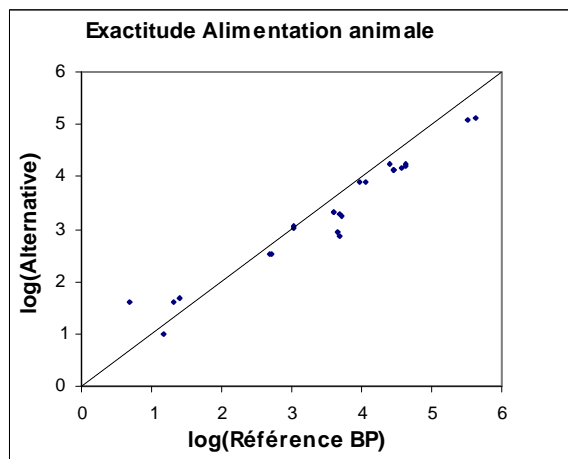
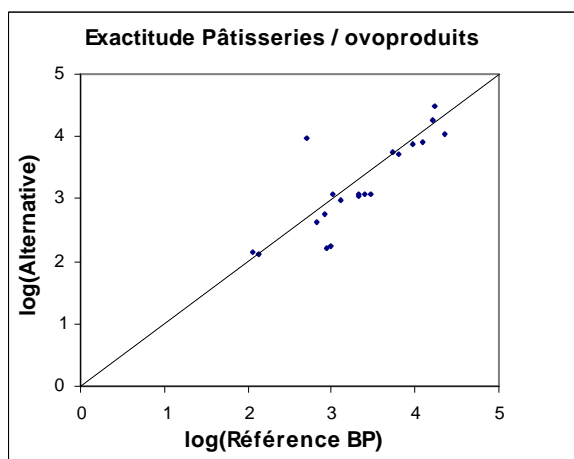
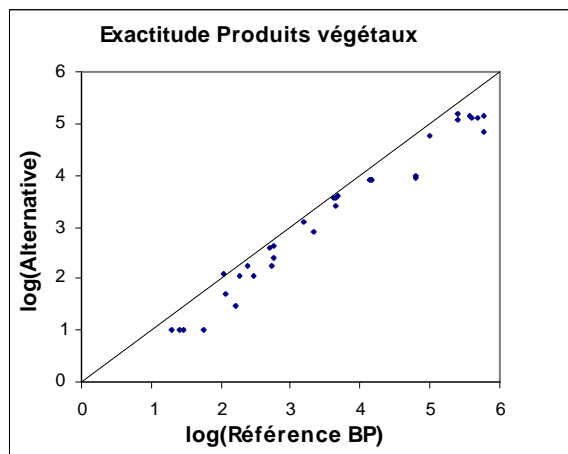
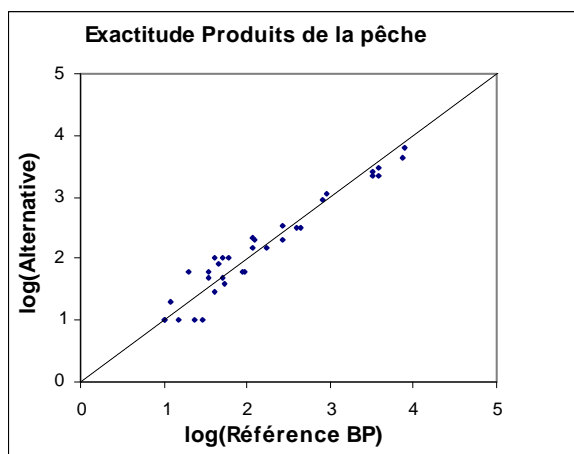
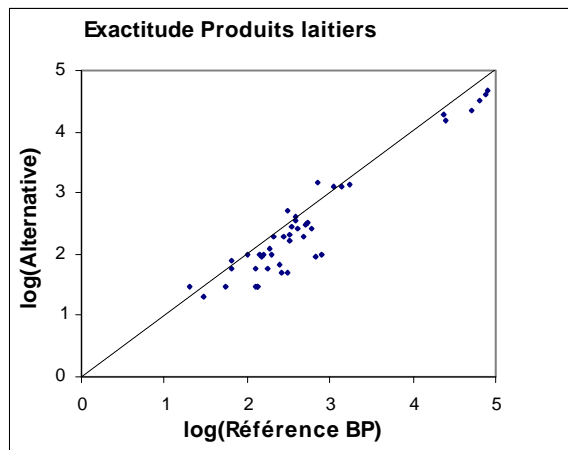
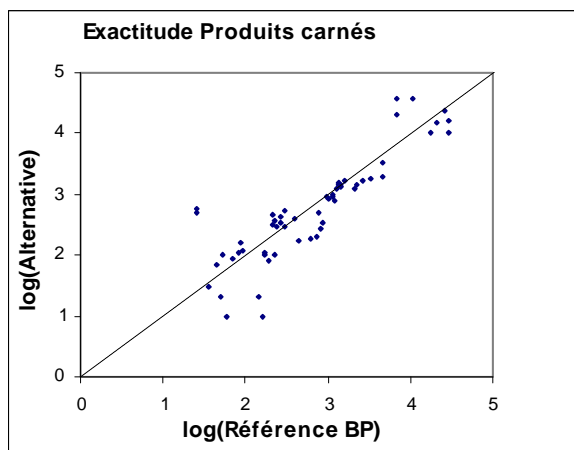
En fonction du rapport de ces écarts-type $R = sr(y)/sr(x)$ et $Rob.R = Rob.sr(y)/Rob.sr(x)$, la régression linéaire à utiliser pour l'interprétation est définie dans la norme NF EN ISO 16140.

Les graphiques suivants représentent les valeurs brutes obtenues pour les échantillons analysés, toute catégories confondues et par catégorie de produits.

La droite représentée est la première bissectrice ($y = x$).



Les graphiques suivants représentent les valeurs brutes obtenues pour les échantillons analysés, par catégorie de produits.



2.1.4 Interprétation statistique

Afin de vérifier si l'exactitude relative est satisfaisante, les deux hypothèses suivantes doivent être vérifiées au risque $\alpha = 5\%$:

- **Ordonnée à l'origine (ou intercept) {a = 0}**
La méthode alternative présente un biais systématique par rapport à la méthode de référence :
 - si la valeur $t = a / S_a$ avec (q-2) degrés de liberté est supérieure à la valeur critique $T_{critique}$, obtenue dans la table de Student, ou
 - si la probabilité $p\{a = 0\} < \alpha (=0,05)$, $p\{a = 0\}$ étant définie par la loi de Student
- **Pente {b = 1}**
Si la méthode alternative ne donne pas les mêmes valeurs que la méthode de référence :
 - la valeur $t = (b-1) / S_b$ avec (q-2) degrés de liberté est supérieure à la valeur critique $T_{critique}$, obtenue dans la table de Student, ou
 - si la probabilité $p\{b = 1\} < \alpha (=0,05)$, $p\{b = 1\}$ étant définie par la loi de Student

La régression utilisée, ainsi que les valeurs de a et b obtenues et les conclusions associées sont reprises dans le tableau suivant. Ces valeurs permettent de comparer le système 3M™ Petrifilm™ Staph Express et la méthode de référence.

Matrice	Rob.R	Régression utilisée	a	t(a)	p(t ;a=0)	b	t(b)	p(t ;b=1)	Conclusion
Tous produits	1,091	GMFR	-0,011	0,131	0,896	0,950	1,783	0,077	{a=0} acceptée {b=1} acceptée

L'équation de la droite de régression obtenue entre la méthode alternative et la méthode de référence, pour tous produits, est la suivante :

$$\text{Log Alt} = 0,9503 \text{ log Ref} - 0,0114$$

Le graphique représentant la droite de régression obtenues ($y = bx + a$), avec l'axe vertical (y) utilisé pour la méthode alternative et l'axe horizontal (x) utilisé pour la méthode de référence, est présenté en annexe B.

D'autres paramètres ont été calculés sur les données d'exactitude relative :

- les répétabilités de la méthode alternative et de la méthode de référence,
- le biais entre la méthode alternative et la méthode de référence.

Matrice	Répétabilité robuste		Biais (D) en log (alternative – référence)		Domaine (en log)
			moyen	médian	
	Réf.	Alt.			
Produits carnés	0,16	0,23	-0,056	-0,077	1,00 - 4,58
Produits laitiers	0,28	0,30	-0,248	-0,176	1,48 - 4,90
Produits pêche	0,17	0,37	+0,002	-0,005	1,00 - 3,90
Produits végétaux	0,31	0,17	-0,368	-0,363	1,00 - 5,76
Pâtisseries - Ovoproduits	0,24	0,17	-0,109	-0,101	2,10 - 4,48
Alimentation animale	0,10	0,09	-0,215	-0,277	1,00 - 4,63
Tous produits	0,21	0,23	-0,157	-0,167	1,00 - 5,76

2.1.5 Conclusion

Pour tous produits confondus, les deux hypothèses {a=0} et {b=1} sont acceptées. Il n'y a pas de biais systématique entre les méthodes.

Les limites de répétabilité calculées pour toutes catégories confondus sont tout à fait satisfaisantes : 0,21 log pour la méthode de référence NF EN ISO 6888-1 et 0,23 log pour la méthode Petrifilm™ Staph Express.

Le biais calculé entre la méthode alternative et la méthode de référence est de $-0,16$ log UFC/g (moyen) ou $-0,17$ log UFC/g (médian).

2.2 Linéarité

La linéarité définie dans la norme NF EN ISO 16140 est l'aptitude de la méthode à fournir des résultats proportionnels à la quantité de microorganismes présents dans l'échantillon, c'est-à-dire qu'à une augmentation de l'analyte correspond une augmentation linéaire ou proportionnelle des résultats.

2.2.1 Nature des essais

Cinq types d'aliments ont été contaminés à cinq niveaux de contamination. Pour chaque produit et chaque niveau de contamination, deux répétitions ont été réalisées.

Certains des essais réalisés en 2003 avaient été faits en parallèle de la méthode de référence NF EN ISO 6888-1. Il s'agit des produits suivants :

- viande hachée,
- filet de poisson cru,
- carottes râpées.

Pour les deux autres produits (lait cru, pâté pour animaux), les essais ont été réalisés en 2007.

Les niveaux de contamination étaient :

- niveau minimal :	100 à 500	UFC/g
- niveau intermédiaire 1 :	500 à 1000	UFC/g
- niveau moyen :	1000 à 5000	UFC/g
- niveau intermédiaire 2 :	5000 à 10 000	UFC/g
- niveau maximal :	10 000 à 100 000	UFC /g

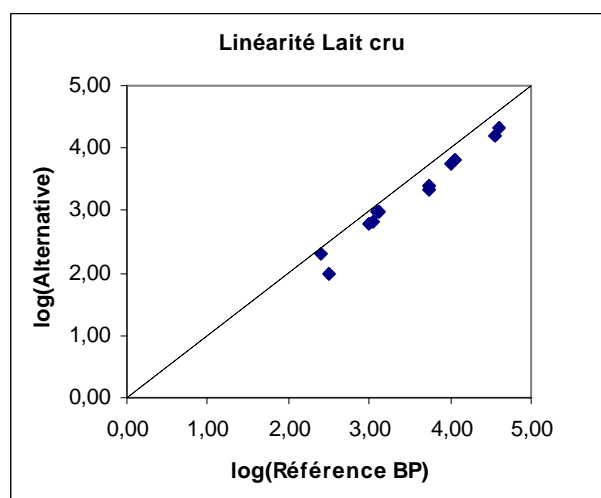
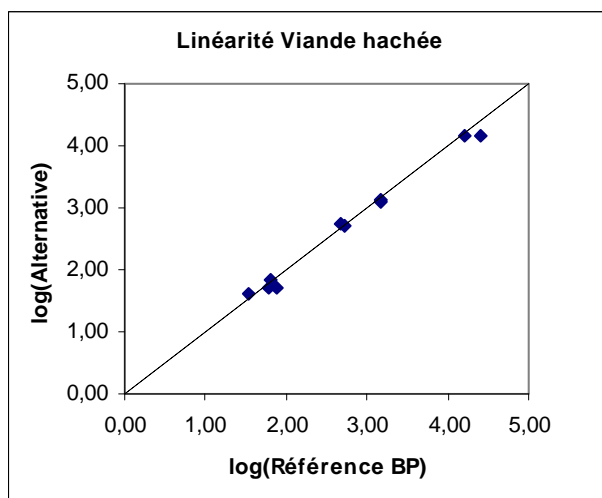
Les produits ont été contaminés, à chacun de ces niveaux, par *Staphylococcus aureus*.

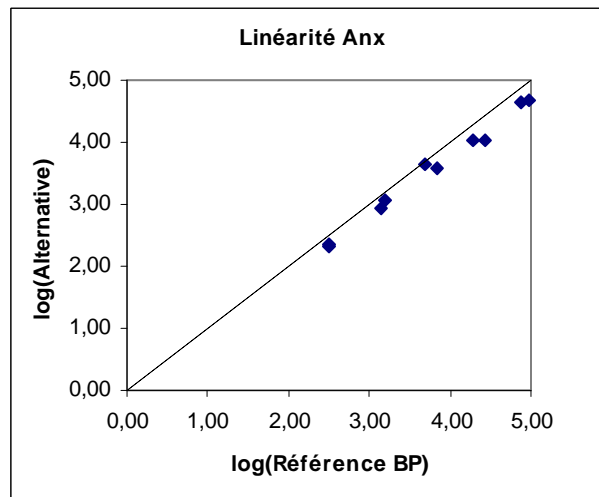
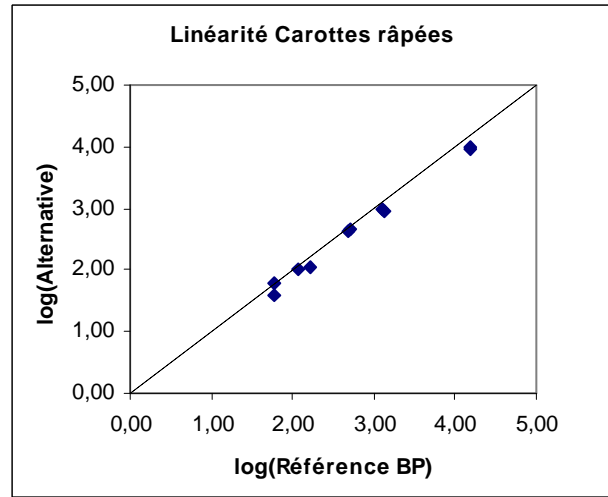
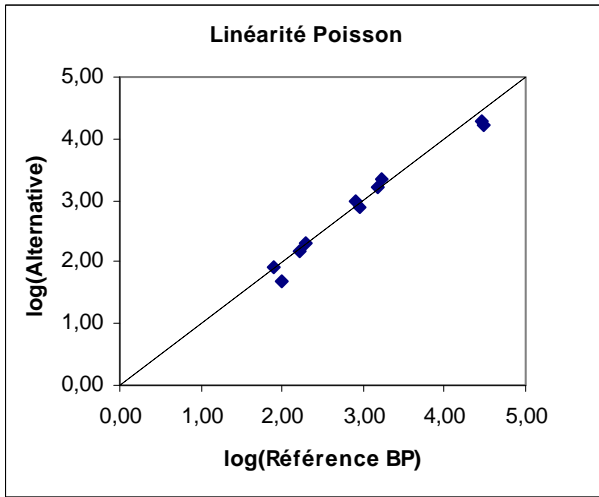
Produit	Souche	Origine
Viande hachée	<i>Staphylococcus aureus</i>	Viande hachée
Lait cru	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yaourt glacé
Filet de poisson cru	<i>Staphylococcus aureus</i>	Saumon fumé
Carottes râpées	<i>Staphylococcus aureus</i>	Salade composée
Pâté pour chien	<i>Staphylococcus aureus</i>	Produit carné

2.2.2 Résultats bruts

Comme pour l'exactitude relative, selon la norme NF EN ISO 16140, un graphique bidimensionnel avec les valeurs de chaque échantillon a été tracé pour chaque produit contaminé. L'axe vertical (y) est utilisé pour la méthode alternative et l'axe horizontal (x) est utilisé pour la méthode de référence.

La droite représentée sur les graphiques suivants est la première bissectrice ($y = x$).





2.2.3 Interprétation statistique

La non linéarité est déterminée par l'évaluation du défaut d'ajustement (lack of fit).
Il s'agit de calculer la valeur Rob.F :

$$\text{Rob.F} = \frac{(N-2) (s^2_{y:x} / \text{Rob.sr}(y)^2) - q (n-1)}{q-2}$$

avec q , le nombre de niveaux ($q = 5$)
 n , le nombre de réplicats pour chaque niveau ($n = 2$)
 N , le nombre d'échantillons ($N = nq$)

La relation n'est pas linéaire

- si [Rob.F > Fcrit (vnum, vden)]

ou

- si $p(F, vnum, vden) < \alpha (=0,05)$

Les régressions utilisées, ainsi que les valeurs de Rob.F sont détaillées dans le tableau suivant :

Matrice	Rob.R	Régression utilisée	Fcritique	Rob.F	p (Rob.F) %	Conclusion
viande hachée	0,855	GMFR	5,41	3,651	10 %	linéaire
lait cru	1,870	GMFR	5,19	5,838	3 %	non linéaire
poisson cru	2,933	OLS1	5,41	3,415	11 %	linéaire
carottes râpées	1,684	GMFR	5,41	6,188	4 %	non linéaire
pâté pour chien	0,211	OLS2	5,41	68,469	0 %	non linéaire

Les équations des droites de régression entre la méthode alternative et la méthode de référence sont reprises dans le tableau ci-dessous :

viande hachée	Log Alt = 0,9621 log Ref + 0,0526	R ² = 0,997
lait cru	Log Alt = 0,9719 log Ref - 0,1634	R ² = 0,985
poisson cru	Log Alt = 0,9624 log Ref + 0,0626	R ² = 0,978
carottes râpées	Log Alt = 0,9548 log Ref + 0,0041	R ² = 0,998
pâté pour chien	Log Ref = 1,0569 log Alt- 0,4343	R ² = 0,993

2.2.4 Conclusion

Les tests statistiques concluent à une relation linéaire pour les matrices « viande hachée » et « poisson cru ».

Pour le « lait cru » et les « carottes râpées », les valeurs de p sont respectivement de 3% et 4% : le test de non linéarité est donc significatif.

Pour le pâté pour chien, le test de non linéarité est très significatif.

Mais, il est à noter que pour ces trois matrices, les coefficients de corrélation sont très élevés, de l'ordre de 99%, ce qui peut mettre en défaut la robustesse du test de non linéarité.

Au vu de droites de régression obtenues, la linéarité apparaît satisfaisante.

2.3 Spécificité / sélectivité (inclusivité / exclusivité)

L'objectif de cette étude est de s'assurer que les *Staphylococcus* à coagulase positive (*S.aureus*, *S.hyicus* et *S.intermedius*) sont détectés, qu'il n'existe pas de réactions croisées avec d'autres espèces que *Staphylococcus* ou d'autres genres.

2.3.1 Protocole

Les souches ont été cultivées en bouillon coeur-cerveille pendant 18 à 24 heures à 37°C.

Différentes dilutions ont été réalisées et inoculées sur le test 3M™ Petrifilm™ Staph Express et sur gélose Baird Parker.

Pour étudier la spécificité du système complet, quelles que soient les conditions d'utilisation, le disque a été inséré dans tous les cas. La croissance, la couleur et la réaction DNase ont été observées.

2.3.2 Resultats and conclusion

Les résultats sont présentés en annexe C.

✓ Les 28 souches de *Staphylococcus aureus* testées donnent des colonies violettes sur Petrifilm Staph Express. La pose du disque a ensuite permis de détecter des zones roses caractéristiques des *Staphylococcus* à coagulase positive.

✓ Les autres souches de *Staphylococcus*, à coagulase positive, *S. hyicus* and *S. intermedius*, ont présenté un aspect typique: les colonies étaient rouge-violet ou noires, et après révélation avec le disque, les colonies sont entourées par une zone rose.

✓ Parmi les 26 souches non cibles testées, 15 autres *Staphylococcus* coagulase négative et 11 souches d'autres genres, aucune n'a donné de colonies typiques sur Petrifilm Staph Express ou après révélation sur disque.

La spécificité et la sélectivité sont satisfaisantes.

Le système 3M™ Petrifilm™ Staph Express a permis de détecter tous les *Staphylococcus*, à coagulase positive testés. Toutes les colonies présentaient un aspect caractéristique après incubation et révélation avec le disque.

3 Etude interlaboratoire

3.1 Organisation de l'étude

- Nombre de laboratoires participants

13 laboratoires étaient destinataires des échantillons.

- Echantillons

La matrice « lait pasteurisé » a été contaminée avec une souche de *Staphylococcus aureus*, origine « produits laitiers ».

- Nombre d'échantillons

Huit échantillons par laboratoire ont été préparés, avec deux flacons par niveau de contamination.

- Analyses

Les laboratoires participants et le laboratoire expert ont réalisé les analyses avec la méthode de référence et la méthode alternative.

Les analyses ont été réalisées deux jours après envoi des échantillons.

3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

3.2.1 Avant ensemencement

Le lait pasteurisé utilisé a été analysé (5 prises d'essai), selon la méthode de référence NF EN ISO 6888-1, avant les contaminations, pour nous assurer de l'absence de *Staphylococcus* à coagulase positive. Aucune des prises d'essai de 25 ml ne contenait de *Staphylococcus* à coagulase positive.

La flore naturelle présente dans la matrice était de l'ordre de 10 cellules par mL.

3.2.2 Taux de contamination obtenus

Les taux de contaminations obtenus dans la matrice et les estimations des précisions figurent dans le tableau ci-dessous:

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (CFU/ml)	Taux réel (CFU/ml)
Niveau 0 (L0)	1 et 8	0	0
Niveau bas (L1)	2 et 7	100	81
Niveau intermédiaire (L2)	3 et 6	1 000	810
Niveau haut (L3)	4 et 5	10 000	8100

3.2.3 Stabilité des échantillons

Le suivi du niveau de contamination en *Staphylococcus aureus* a été réalisé pendant 48 heures préalablement à l'envoi, dans du lait pasteurisé, sur des échantillons contaminés au taux intermédiaire et conservés à 7°C.

Les résultats obtenus, en UFC/ml, figurent dans le tableau suivant :

	J0	J1	J2
Echantillon 1	1400	1500	2000
Echantillon 2	1500	1400	1900
Echantillon 3	1900	2000	1700

Ces résultats montrent une stabilité de la souche dans les échantillons préparés.

3.3 Température des échantillons

3.3.1 Au cours du transport

Les courbes de températures obtenues suite à l'exploitation des données des thermoboutons montrent que les températures étaient stables au cours du transport.
Toutes les températures étaient comprises entre 0°C et 8°C.

3.3.2 A réception

Les températures mesurées à réception sont reprises dans le tableau ci-dessous :

Laboratoire	Températures à réception (°C)		Commentaires
	communiquée par le laboratoire	mesurée par le thermobouton	
A	6.5	1.9	/
B	5.0	2.4	/
C	1.2	2.4	/
D	3.0	0.4	/
E	1.7	0.0	/
F	4.0	4.5	/
G	9.4	7.9	Réception à J+2
H	5.0	4.9	/
I	12.3	4.4	/
J	/	3.0	/
K	3.7	3.5	/
L	1.5	1.9	/
M	0.7	1.4	/

3.3.3 Conclusion

Le laboratoire G a reçu ses échantillons à J+2, donc le jour où l'ensemble des laboratoires devait réaliser les analyses. La température des échantillons pendant ces 48 heures était restée en-dessous de 8°C.
Le laboratoire I a annoncé une température de 12,3°C, mais le thermobouton indique une température de 4,4°C, donc conforme aux exigences.
Leurs résultats sont donc exploitables.

La courbe obtenue pour le laboratoire M montrait une température enregistrée supérieure à 8°C après réception des échantillons. Ses résultats ne seront donc pas pris en compte.

Au total, les résultats de 12 laboratoires peuvent donc être traités statistiquement suite aux conditions préalables à l'analyse.

3.4 Resultats

3.4.1 Laboratoire expert

Les résultats obtenus par la méthode NF EN ISO 6888-1 et par la méthode Petrifilm™ Staph Express sont concordants.

	Méthode de référence NF EN ISO 6888-1		Méthode alternative	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
Niveau 0	<10	<10	<10	<10
Niveau 1	85	75	40	40
Niveau 2	620	480	370	600
Niveau 3	6700	7000	6100	6200

Les résultats de la méthode de référence EN ISO 6888-1 et de la méthode alternative sont concordants.

3.4.2 Laboratoires collaborateurs

Les résultats des 12 laboratoires ayant réalisé les analyses sont les suivants :

Niveau 0 (résultats in CFU/ml)

Laboratoire	EN ISO 6888-1		STX system	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
A	<10	<10	<10	<10
B	<10	<10	<10	<10
C	<10	<10	<10	<10
D	<10	<10	<10	<10
E	<100	<100	<10	<10
F	<10	<10	<10	<10
G	<10	<10	<10	<10
H	<10	<10	<10	<10
I	<10	<10	<10	<10
J	<10	<10	<10	<10
K	<10	<10	<10	<10
L	<10	<10	<10	<10
M	<10	<10	<10	<10

Niveau 1 (résultats in CFU/ml)

Laboratoire	EN ISO 6888-1		STX system	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
A	110	50	80	100
B	65	25	40	90
C	85	35	40	90
D	75	35	70	90
E	40	10	40	40
F	50	100	70	60
G	30	70	30	40
H	60	35	80	60
I	45	100	80	170
J	<10	60	110	70
K	70	100	50	50
L	65	60	90	60
M	<10	<10	<10	60

Niveau 2 (résultats in CFU/ml)

Laboratoire	EN ISO 6888-1		STX system	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
A	270	190	590	720
B	370	400	500	620
C	880	970	580	710
D	990	930	780	830
E	700	790	560	680
F	1100	1100	670	710
G	900	530	630	670
H	800	800	920	860
I	550	750	600	860
J	Pb de protocole	210	520	540
K	670	800	680	620
L	840	920	680	740
M	Pb de protocole	Pb de protocole	740	600

Niveau 3 (résultats in CFU/ml)

Laboratoire	EN ISO 6888-1		STX system	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
A	2900	3400	7900	4600
B	6000	3700	5500	4800
C	13000	11000	9700	7600
D	7600	12000	8500	10000
E	5800	9900	5500	5800
F	9600	9200	4100	6300
G	9600	6800	6500	7500
H	13000	5400	8500	8900
I	10000	10000	11000	10000
J	1500	3200	5200	5100
K	10000	12000	6300	7100
L	10000	11000	8400	7500
M	Pb de protocole	Pb de protocole	8300	8600

3.4.3 Conclusion

Les résultats du **laboratoire M** sont présentés, mais ne sont pas exploités statistiquement suite aux problèmes de température lors de la conservation des échantillons. De plus, ce laboratoire a rencontré des difficultés dans la mise en œuvre de la méthode de référence. En revanche, ses résultats obtenus par la méthode alternative semblent tout à fait cohérents.

Le **laboratoire J** a obtenu un résultat <10 UFC/mL pour un des deux réplicats du niveau 1 et n'a pas respecté le protocole de la méthode de référence pour un des deux réplicats du niveau 2 (ensemencement en simple boîte). Il nous a également signalé des difficultés de lecture sur les géloses Baird Parker. Ses résultats n'ont donc pas été exploités.

Au final, l'interprétation statistique a été réalisée sur 11 laboratoires.

3.5 Calculs

L'exploitation des résultats a été réalisée selon la norme NF EN ISO 16140 : 2003, par niveau de contamination. Les résultats ont préalablement été convertis en log.

3.5.1 Calcul du biais D

Pour chaque niveau et par laboratoire, les différences de résultats (d_i) obtenus entre la méthode alternative et la méthode de référence sont calculées, ce qui permet de déterminer le **biais D** ($=\text{MED}\{d_i\}$), ainsi que l'**écart-type robuste** $s\{d_i\}$ ($=k_1 S_n$).

Afin de vérifier si l'exactitude relative est satisfaisante, l'**hypothèse {D = 0}** est testée pour chaque niveau, en calculant la statistique :

$$t(d) = \text{MED}\{d_i\} \sqrt{n} / s\{d_i\} \quad \text{pour } n-1 \text{ degrés de liberté (n étant le nombre de laboratoires) au risque } \alpha = 5\%.$$

Le biais entre les deux méthodes est significatif si la valeur $t(d)$ est supérieure à la valeur critique, T_{critique} , obtenue dans la table de Student, ce qui signifie également que la méthode alternative manque d'exactitude par rapport à la méthode de référence pour le niveau testé.

Les valeurs du biais (alternative – référence), de l'écart-type robuste des différences et de la statistique $t(d)$ sont reprises dans les tableaux ci-dessous :

	Biais D (log)	$s\{d_i\}$	$t(d)$	T_{critique}	Conclusion
Niveau 1	0,091	0,171	1,774	2,228	{D=0} acceptée
Niveau 2	-0,050	0,144	1,157		{D=0} acceptée
Niveau 3	-0,064	0,161	1,312		{D=0} acceptée

Rappel :

La valeur du biais (alternative – référence) obtenue dans l'étude comparative était de l'ordre de (- 0,17 log).

Conclusion :

L'hypothèse selon laquelle le biais entre les deux méthodes est nul est statistiquement acceptée pour tous les niveaux.

L'exactitude relative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence est, de ce fait, satisfaisante.

3.5.2 Répétabilité

3.5.2.1 Limite de répétabilité

Pour chaque méthode et chaque niveau a été calculée la **limite de répétabilité** : $r = 2,8 S_r$, avec S_r : écart-type de répétabilité

Ces valeurs sont indiquées dans les tableaux ci-dessous :

	r (log UFC/mL) -Méthode de référence	r (log UFC/mL) - Méthode alternative
Niveau 1	0,972	0,367
Niveau 2	0,125	0,125
Niveau 3	0,265	0,158

3.5.2.2 Interprétation

Les répétabilités des méthodes alternative et de référence sont comparées, pour chacun des niveaux, à l'aide d'une distribution F : $F = (S_{r,alt} / S_{r,réf})^2$ avec n et n degrés de liberté

Si F (ou 1/F) est supérieure à la valeur critique F ($\alpha ; n ; n$), alors les méthodes comparées ont une répétabilité différente pour le niveau considéré.

Ces valeurs sont indiquées dans les tableaux ci-dessous :

	F (ou 1/F*)	F (0,05 ;n ;n)	n	Conclusion
Niveau 1	7,18*	2,85	11	Répétabilités différentes
Niveau 2	1,00			Répétabilités comparables
Niveau 3	2,80*			Répétabilités comparables

3.5.2.3 Conclusion

Les répétabilités obtenues pour la méthode de référence et la méthode alternative sont statistiquement comparables pour les deux niveaux supérieurs.

Pour le niveau faible les répétabilités sont très différentes : la limite de répétabilité de la méthode de référence est très élevée, notamment parce que les valeurs de la méthode de référence sont différentes pour les deux réplicats de ce niveau, suite vraisemblablement aux difficultés d'étalement des 1 mL sur les trois boîtes de Baird Parker par certains laboratoires.

Rappel :

Les valeurs de répétabilités obtenues dans l'étude comparative était de l'ordre de 0,21 log pour la méthode de référence et de 0,23 log pour la méthode alternative.

3.5.3 Reproductibilité

3.5.3.1 Limite de reproductibilité

Pour chaque méthode et chaque niveau a été calculée la **limite de reproductibilité** : $R = 2,8 S_R$, avec S_R : écart-type de reproductibilité

Ces valeurs sont indiquées dans les tableaux ci-dessous :

	R (log UFC/mL) - Méthode de référence	R (log UFC/mL) - Méthode alternative
Niveau 1	0,825 → 0,972 (r)	0,482
Niveau 2	0,398	0,161
Niveau 3	0,372	0,393

3.5.3.2 Interprétation

Les reproductibilités des méthodes alternatives et de référence sont comparées, pour chacun des niveaux, à l'aide d'une distribution F : $F = (S_{R,alt} / S_{R,réf})^2$ avec (n-1) et (n-1) degrés de liberté

Si F (ou 1/F) est supérieure à la valeur critique F ($\alpha ; n-1 ; n-1$), alors les méthodes comparées ont une reproductibilité différente pour le niveau considéré.

Ces valeurs sont indiquées dans les tableaux ci-dessous :

	F	F (0,05 ;n-1 ;n-1)	n	Conclusion
Niveau 1	4,07	2,98	11	Reproductibilités différentes
Niveau 2	6,10			Reproductibilités différentes
Niveau 3	1,11			Reproductibilités comparables

3.5.3.3 Conclusion

Pour les niveaux 1 et 2, la reproductibilité de la méthode alternative diffère de celle de la méthode de référence : la reproductibilité de la méthode alternative est plus faible que celle de la méthode de référence.

Pour le niveau 3, les deux méthodes sont comparables en terme de reproductibilité.

4 Praticabilité

La praticabilité est étudiée en fonction des 13 critères définis par le bureau technique en comparant le système de numération 3M™ Petrifilm™ Staph Express à la méthode de référence NF ISO 6888-1.

Critère	Communication sur le critère
1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode (cf notice) 2. Volume des réactifs (cf notice et emballage des flacons)	Les tests sont conditionnés en poches plastique scellées soit : - en boîte de 2 poches de 25 unités (50 unités), - en boîte de 20 poches de 25 unités (500 unités). Les disques sont conditionnés individuellement en poches plastique scellées soit : - en boîte de 1 poche de 20 unités, - en boîte de 5 poches de 20 unités (100 unités).
3. Condition de stockage des éléments (cf notice) – Péréemption des produits non ouverts (cf notice)	La température de stockage des tests Petrifilm et des disques avant ouverture est inférieure ou égale à 8°C. La date de péréemption est indiquée sur l'emballage et sur les tests et disques Petrifilm Staph Express (durée de vie de 18 mois après la sortie d'usine).
4. Modalités d'utilisation après première utilisation (cf notice)	Après ouverture des tests Petrifilm™ Staph Express , replacer les tests non utilisés dans leur poche. Refermer hermétiquement avec un ruban adhésif. Ne pas réfrigérer les poches ouvertes pour éviter une exposition à l'humidité. Stocker les dans un endroit frais et sec un mois au maximum. Pour conserver les disques restants dans une poche ouverte, fermer la poche avec un ruban adhésif après avoir refermé sur lui-même le côté ouvert. Placer les poches ainsi refermées dans un récipient étanche et les conserver dans un congélateur moins de 6 mois. Ces informations sont indiquées dans le notice 3M™ Petrifilm™ StaphExpress
5. Equipements ou locaux spécifiques nécessaires (cf notice)	Configuration normale et matériel courant d'un laboratoire de microbiologie. Rien de spécifique à part un diffuseur en plastique pour les tests Petrifilm STX disponible auprès de 3M (indiqué sur la notice). Lecture facilitée par l'utilisation d'une loupe.
6. Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (cf notice)	Les Petrifilm sont prêts à l'emploi.
7. Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode	Pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie, la formation à la technique nécessite moins de 1 jour.
8. Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser	Gain de temps de 8 minutes maximum par échantillon en comparaison à la méthode de référence qui demande des tests de confirmation (recherche de l'activité coagulase sur 20 colonies).
9. Délai de réponse des résultats	Resultat obtenu en 24 heures (J1) quel que soit le type de réponse : présence ou non de <i>Staphylococci</i> coagulase positive dans l'échantillon. L'analyse d'un échantillon par la méthode de référence ISO 6887-1 donne un résultat : - après 48 hrs (J2) pour un échantillon qui ne donne aucune colonie caractéristique ou non caractéristique sur gélose Baird-Parker - après 96 hrs (J4) pour un échantillon avec confirmations
10. Type de qualification de l'opérateur	L'utilisateur doit être formé aux bonnes pratiques de laboratoire de microbiologie alimentaire.
11. Etapes communes avec la méthode de référence	Réalisation de la suspension mère, du broyage et des dilutions
12. Traçabilité des résultats d'analyse	Aucune traçabilité particulière, elle est la même que celle de la méthode de référence. Le numéro de lot est indiqué sur chaque Petrifilm.
13. Maintenance par le laboratoire	No particular service.

5 Conclusion

Le système 3M™ Petrifilm™ Staph Express pour le dénombrement des *Staphylococcus* à coagulase positive est un **test miniaturisé** avec un milieu chromogénique sélectif et différentiel pour *Staphylococcus* à coagulase-positive, qui ne nécessite pas de tests de confirmation complémentaire. Ainsi, Le système Petrifilm Staph Express est une méthode **facile à mettre en œuvre**. Et il permet un **gain d'espace dans les incubateurs**.

Quelques difficultés de lecture peuvent apparaître lorsque les produits présentent des niveaux importants de flore interférente, de la même manière que dans la méthode de référence.

Le système PetrifilmStaph Express pour le dénombrement des *Staphylococcus* à coagulase positive permet un **gain de temps** par rapport à la méthode de référence, en particulier pour les échantillons positifs (résultat en un jour contre 4 jours pour la norme ISO 6888-1).

La méthode 3M™ Petrifilm™ Staph Express a été **comparée** à la méthode **NF EN ISO 6888-1**.

Les résultats obtenus permettent de conclure que :

- la linéarité de la méthode alternative est satisfaisante,
- l'exactitude relative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence est satisfaisante,
- le test montre une sélectivité et une spécificité satisfaisantes.

L'étude interlaboratoire a donné **des valeurs de répétabilité et de reproductibilité satisfaisantes**.

Les résultats obtenus lors de l'étude **interlaboratoire** permettent de conclure que :

- pour tous les niveaux, l'exactitude relative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence est satisfaisante. L'hypothèse, selon laquelle le **biais entre les deux méthodes est nul**, est vérifiée pour les deux niveaux supérieurs.

Les biais obtenus entre la méthode alternative et la méthode de référence, pour chacun des niveaux, varient entre (+ 0,09 log) et (- 0,05 log).

La valeur du biais (alternative - référence) obtenue dans l'étude comparative était de l'ordre de (- 0,17 log).

- les valeurs de répétabilité varient de 0,97 à 0,13 log (UFC/ml) pour la méthode de référence et de 0,37 à 0,13 log (UFC/ml) pour la méthode alternative. Elles sont comparables entre les deux méthodes pour les deux niveaux supérieurs.

Les valeurs de répétabilité obtenues dans l'étude comparative étaient de l'ordre de 0,21 log pour la méthode de référence et de 0,23 log pour la méthode alternative.

- les valeurs de reproductibilité varient de 0,97 à 0,27 log (UFC/ml) pour la méthode de référence et de 0,48 à 0,16 log (UFC/ml) pour la méthode alternative. Elles sont comparables entre les deux méthodes pour le niveau 3. Pour les niveaux 1 et 2, les valeurs de reproductibilité de la méthode de référence sont plus élevées que celles de la méthode alternative.

L'ensemble de ces résultats a conduit à la **reconduction de validation AFNOR** selon le référentiel EN ISO 16140 du système 3M Petrifilm Staph Express system (STX) (attestation n° 3M 01/9-04/03 A), pour le dénombrement des *Staphylococcus* à coagulase positive dans les produits d'alimentation humaine et les aliments pour animaux de compagnie, **pour une période de 4 ans**.

ANNEXES

ANNEXE A :

HISTORIQUE DE LA VALIDATION

- Date de 1^{ère} Validation AFNOR et date(s) de reconduction

La méthode utilisant le système 3M™ Petrifilm™ Staph Express (STX) est validée pour les échantillons alimentaires depuis avril 2003, sous le numéro d'attestation 3M 01/9-04/03.

- Méthode de référence par rapport à laquelle la méthode alternative a été comparée

La méthode NF EN ISO 6888-1 :1999 et NF EN ISO 6888-1/A1 :2004, utilisant le milieu Baird Parker, ensemencé en surface, est la méthode de référence qui a été utilisée dans le cadre de cette validation.

Cette méthode est une méthode avec confirmation des colonies caractéristiques et non caractéristiques par le test de la coagulase.

- Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale et des éventuelles reconductions et extensions

Spécificité

L'objectif de cette étude était de s'assurer que les *Staphylococcus aureus* étaient détectés, qu'il n'existait pas de réactions croisées avec d'autres espèces que *Staphylococcus* (hormis *S. hyicus* et *S. intermedius*) ou d'autres genres.

L'étude a porté sur 22 souches de *S. aureus* et 11 souches autres que *S. aureus*.

✓ Le système de numération 3M™ Petrifilm™ Staph Express a permis de retrouver tous les *Staphylococcus aureus* ensemencés. Tous présentaient un aspect typique après incubation et après révélation sur disque.

✓ Parmi les autres *Staphylococcus*, seuls *S. hyicus* et *S. intermedius*, souches à coagulase positive ont présenté l'aspect typique des *Staphylococcus aureus*.

✓ Les souches d'autres genres n'ont pas donné de colonies sur Petrifilm ou ont donné des colonies non typiques (couleur non rouge-violet, pas de zone rose après révélation sur disque).

Linéarité

Quatre matrices alimentaires (lait cru, viande hachée crue, filet de poisson cru et carottes râpées) ont été étudiées en parallèle avec la méthode de référence et la méthode alternative avec 4 souches différentes à 5 niveaux de contamination répartis entre 50/g et 10⁵/g.

Les paramètres des droites de régression obtenues étaient :

		Lait cru	Viande hachée	Poisson cru	Carottes râpées
Sensibilité (pente)	b1 =	0.95	1.00	1.01	0.97
Ecart-type de la sensibilité	s(b1) =	0.03	0.04	0.04	0.02
Blanc analytique (ordonnée à l'origine)	b0 =	0.14	-0.05	-0.00	0.08
Ecart-type du blanc analytique	s(b0) =	0.09	0.13	0.12	0.07
Variance expérimentale	s ² (e) =	0.02	0.03	0.02	0.01
Ecart-type expérimental	s (e) =	0.13	0.18	0.15	0.09
Coefficient de corrélation	R =	0.99	0.98	0.99	0.99

Les tests statistiques selon la norme NF V 03 110 permettaient de conclure que la méthode Petrifilm Staph Express était linéaire, quelle que soit la matrice.

Les droites de régression permettaient de vérifier que les points étaient regroupés le long de la droite ($y = x$).

Justesse

Au total, 205 produits avaient été analysés pour obtenir 126 résultats exploitables statistiquement. Les produits étaient répartis dans les catégories suivantes :

Catégories de produits	Produits analysés	Résultats exploitables
Produits carnés	62	35
Produits laitiers	50	31
Produits de la pêche	49	35
Produits végétaux et divers (ovoproduits, pâtisseries, plats cuisinés)	44	25

Parmi ces produits, certains ont été contaminés artificiellement (42 %, soit 53/126) par :

- contact avec des produits naturellement contaminés,
- inoculation avec une souche de *Staphylococcus aureus* préalablement stressée par culture en milieu salin, suivie d'un choc thermique,
- ou inoculation avec une souche de *Staphylococcus aureus* et échantillon mis à 4°C une nuit avant analyse.

Les principaux résultats obtenus étaient les suivants :

	Méthode alternative		Méthode de référence	
Moyennes	X =	2,71	Z =	2,84
Ecart-type de répétabilité	s ^r (x) =	0,30	0,13	0,31
Variance de répétabilité	s ^{2r} (x) =	0,09	0,02	0,10
Répétabilité	r =	0,36	r =	0,36

Tests de vérification de la justesse et de la répétabilité

	Valeurs obtenues		Valeur critique	Conclusion
Différence des moyennes	X-Z =	- 0,13		
Ecart-type des différences	s(d) =	0,22		
Test d'égalité	w =	0,59	3,00	Acceptable
Rapport des variances	q =	0,98	1,00	Acceptable

La comparaison de la méthode 3M™ Petrifilm™ Staph Express à la méthode de référence NF EN ISO 6888-1 :1999 et NF EN ISO 6888-1/A1 :2004 avait permis de conclure que la méthode alternative donnait des résultats justes par rapport à la méthode de référence.

Fidélité

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité de la méthode Petrifilm Staph Express obtenues lors de l'essai interlaboratoire étaient les suivantes :

- 0,14 à 0,33 log UFC/ml pour la répétabilité selon les niveaux de contamination.
- 0,20 à 0,37 log UFC/ml pour la reproductibilité selon les niveaux de contamination.

Elles ont été obtenues lors d'un essai rassemblant 14 laboratoires qui ont mis en œuvre uniquement la méthode Petrifilm Staph Express.

- Etude bibliographique

- [Validation AOAC OMA 2003.07](#) publiée dans le "Journal of AOAC" sous la référence suivante : 3M Petrifilm Staph Express Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of processed and prepared foods
- [Validation AOAC OMA 2003.08](#) publiée dans le "Journal of AOAC" sous la référence suivante : 3M Petrifilm Staph Express Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods
- [Validation AOAC OMA 2003.11](#) publiée dans le "Journal of AOAC" sous la référence suivante : 3M Petrifilm Staph Express Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected Meat, Seafood and Poultry

- Référentiel technique de la Validation AFNOR

Le référentiel technique était celui en vigueur en 2002-2003. Actuellement, il est remplacé par la norme ISO 16140 :2003.

ANNEXE B :

EXACTITUDE RELATIVE
REGRESSION

	Niveau	Méthode de référence				Méthode alternative			
		Rep.1	Rep.2	Mx	sxi interne	Rep.1	Rep.2	Myt	syt interne
Produits carnés	1	2,21	2,17	2,18979	0,03064	1,00	1,30	1,15051	0,21286
	2	2,65	2,79	2,72363	0,10083	2,24	2,28	2,25909	0,03073
	3	1,40	1,40	1,39794	0,00000	2,70	2,78	2,73856	0,05599
	4	2,36	2,42	2,38878	0,04558	2,57	2,54	2,55489	0,02333
	5	2,23	1,96	2,09116	0,19038	2,04	2,07	2,05517	0,02458
	6	2,34	2,60	2,47224	0,18359	2,00	2,60	2,30103	0,42572
	7	3,67	3,67	3,66703	0,00180	3,28	3,52	3,39759	0,17101
	8	3,36	3,32	3,33974	0,02744	3,15	3,08	3,11265	0,04734
	9	3,42	3,53	3,47278	0,07641	3,23	3,27	3,25041	0,02822
	10	3,13	3,09	3,10971	0,02710	3,16	2,90	3,03291	0,18359
	11	3,06	3,06	3,06000	0,00438	3,00	2,95	2,97071	0,03582
	12	3,12	3,16	3,13640	0,02834	3,10	3,14	3,12259	0,02525
	13	1,85	1,91	1,87666	0,04464	1,95	2,04	1,99602	0,05908
	14	2,94	2,91	2,92321	0,02498	2,53	2,42	2,47391	0,07481
	15	4,24	3,85	4,04407	0,28139	4,00	4,30	4,15051	0,21286
	16	4,48	4,42	4,45018	0,03810	4,00	4,36	4,18086	0,25578
	17	4,48	4,31	4,39444	0,11693	4,20	4,18	4,19011	0,01982
	18	1,78	1,54	1,66111	0,16552	1,00	1,48	1,23856	0,33738
	19	4,02	3,85	3,93314	0,12452	4,58	4,56	4,56804	0,01660
	20	3,12	3,16	3,13942	0,02328	3,19	3,11	3,15277	0,05491
	21	2,33	2,48	2,40340	0,10426	2,67	2,72	2,69832	0,03353
	22	2,48	2,42	2,45233	0,04430	2,46	2,63	2,54723	0,11805
	23	2,89	2,87	2,87890	0,01291	2,70	2,30	2,50000	0,28139
	24	3,21	3,15	3,18010	0,04606	3,22	3,17	3,19354	0,03217
	25	1,65	1,70	1,67609	0,03236	1,85	1,30	1,57306	0,38471
	26	2,99	3,00	2,99702	0,00422	2,96	2,94	2,94747	0,01575
	27	2,37	2,32	2,34696	0,03765	2,48	2,49	2,48360	0,00917
	28	1,93	1,72	1,82611	0,15124	2,19	2,00	2,09453	0,13368
	29	2,29	2,24	2,26420	0,03796	1,90	2,00	1,95154	0,06853
Produits laitiers	1	2,78	2,67	2,72965	0,07783	2,41	2,28	2,34330	0,08835
	2	2,18	2,12	2,14803	0,03968	1,95	1,48	1,71568	0,33738
	3	1,81	1,74	1,77664	0,05130	1,90	1,48	1,69011	0,30121
	4	2,10	2,12	2,11236	0,01078	1,48	1,48	1,47712	0,00000
	5	3,04	3,14	3,08769	0,07057	3,10	3,11	3,10934	0,00651
	6	2,00	2,15	2,07447	0,10532	2,00	2,00	2,00000	0,00000
	7	2,30	2,28	2,29179	0,01307	2,00	2,10	2,05237	0,07406
	8	2,60	2,58	2,58936	0,01796	2,41	2,62	2,51357	0,15245
	9	2,51	2,20	2,35524	0,21722	2,24	2,00	2,11868	0,16784
	10	2,33	2,45	2,38982	0,08506	2,30	2,30	2,30103	0,00000
	11	2,70	2,48	2,58805	0,15687	2,48	2,70	2,58805	0,15687
	12	2,40	2,48	2,43753	0,05599	1,85	1,70	1,77203	0,10333
	13	2,41	2,26	2,33551	0,11023	1,70	1,78	1,73856	0,05599
	14	2,91	2,83	2,86792	0,05668	2,00	1,95	1,97712	0,03236
	15	2,73	2,57	2,65090	0,10797	2,53	2,55	2,53824	0,01617
	16	1,81	2,11	1,96103	0,20947	1,78	1,78	1,77815	0,00000
	17	4,40	4,37	4,38576	0,01722	4,17	4,27	4,21711	0,06928
	18	2,53	2,52	2,52385	0,00418	2,44	2,32	2,37803	0,08160
	19	4,87	4,90	4,88395	0,02005	4,60	4,68	4,64247	0,05715
	20	4,72	4,81	4,76747	0,06426	4,36	4,51	4,43573	0,11198
	21	3,23	2,86	3,04471	0,26267	3,13	3,16	3,14871	0,01982
	22	1,48	1,30	1,38908	0,12452	1,30	1,48	1,38908	0,12452
Produits pêche	52	1,08	1,36	1,22045	0,19979	1,30	1,00	1,15051	0,21286
	53	1,48	1,00	1,23856	0,33738	1,00	1,00	1,00000	0,00000
	54	2,91	2,96	2,93221	0,03425	2,95	3,07	3,00783	0,08201
	55	1,70	1,60	1,65051	0,06853	2,00	2,00	2,00000	0,00000
	56	3,90	3,87	3,88643	0,02356	3,78	3,62	3,70302	0,11548
	57	3,58	3,58	3,57796	0,00111	3,46	3,34	3,40129	0,08835
	58	1,54	1,60	1,57306	0,04101	1,70	1,48	1,58805	0,15687
	59	2,24	2,09	2,16506	0,10225	2,16	2,30	2,23188	0,09779
	60	1,98	1,95	1,96598	0,01660	1,78	1,78	1,77815	0,00000
	61	1,65	1,78	1,71568	0,08835	1,90	2,00	1,95154	0,06853
	62	1,00	1,30	1,15051	0,21286	1,00	1,78	1,38908	0,55024
	63	1,70	1,54	1,62152	0,10953	1,70	1,78	1,73856	0,05599
	64	3,52	3,50	3,50750	0,01388	3,42	3,34	3,37991	0,05811
	65	2,59	2,64	2,61821	0,03696	2,51	2,50	2,50879	0,00865
	66	2,44	2,42	2,42837	0,01041	2,53	2,32	2,42357	0,14600
	67	2,08	2,07	2,07414	0,00224	2,34	2,19	2,26394	0,10590
	68	1,74	1,18	1,45823	0,39900	1,60	1,00	1,30103	0,42572
	Végétaux	69	2,21	2,08	2,14653	0,09525	1,48	1,70	1,58805
70		3,20	3,34	3,26870	0,09659	3,09	2,91	3,00090	0,12452
71		2,73	2,74	2,73853	0,00765	2,26	2,39	2,32480	0,09216
72		2,26	2,39	2,32480	0,09216	2,04	2,26	2,14871	0,15687
73		2,05	2,48	2,26402	0,30477	2,10	2,04	2,07126	0,04734
74		1,74	1,30	1,52070	0,31066	1,00	1,00	1,00000	0,00000
75		2,75	2,70	2,72498	0,03679	2,64	2,58	2,61085	0,04101
76		3,66	3,62	3,63894	0,02820	3,42	3,55	3,48534	0,09098
77		3,66	3,69	3,67101	0,02084	3,56	3,58	3,57126	0,01498
78		1,48	1,40	1,43753	0,05599	1,00	1,00	1,00000	0,00000
79		4,17	4,12	4,14605	0,03688	3,90	3,92	3,90789	0,01380
80		5,39	5,57	5,47802	0,12452	5,17	5,13	5,15129	0,02758
81		4,80	4,79	4,79745	0,00445	3,93	3,99	3,96188	0,04264
82		5,68	5,76	5,72042	0,05308	5,10	5,14	5,12402	0,02727
83		5,40	5,60	5,50000	0,14433	5,08	5,12	5,10122	0,02653
84		4,99	5,76	5,37398	0,54301	4,77	4,85	4,80831	0,05203
Pâtisseries	85	2,07	2,14	2,10482	0,05038	2,16	2,10	2,13373	0,04101
	86	3,97	4,36	4,16505	0,27082	3,89	4,02	3,95555	0,09549
	87	4,24	4,21	4,22205	0,01841	4,48	4,27	4,37161	0,14921
	88	4,10	2,70	3,39794	0,98849	3,90	3,96	3,93301	0,04231
	89	3,79	3,74	3,76439	0,03959	3,71	3,75	3,72788	0,02872
	90	3,00	2,95	2,97182	0,03424	2,24	2,21	2,22562	0,01660
	91	3,47	3,34	3,40195	0,09314	3,09	3,04	3,06517	0,03362
	92	3,01	3,10	3,05316	0,06411	3,07	2,99	3,03027	0,05979
	93	2,81	2,93	2,87117	0,08238	2,64	2,77	2,70568	0,09311
	94	3,39	3,33	3,36314	0,04472	3,07	3,07	3,07255	0,00000
	Aliments Animaux	95	4,63	4,62	4,62604	0,00660	4,24	4,21	4,22562
96		4,58	4,41	4,49121	0,12084	4,16	4,24	4,20004	0,05277
97		1,30	1,18	1,23856	0,08835	1,60	1,00	1,30103	0,42572
98		3,69	3,67	3,67657	0,01470	2,88	2,93	2,90731	0,03454
99		1,40	0,70	1,04846	0,49425	1,70	1,60	1,65051	0,06853
100		2,73	2,68	2,70226	0,03323	2,53	2,53	2,52681	0,00000
101		3,59	3,61	3,60195	0,01396	3,34	3,34	3,33882	0,00000
102		3,70	3,70	3,69895	0,00558	3,26	3,28	3,27023	0,01498
103		5,52	5,63	5,57580	0,07764	5,08	5,14	5,11002	0,03898
104		4,47	4,46	4,46712	0,00476	4,12	4,11	4,11693	0,00853
105		3,02	3,03	3,02678	0,00525	3,04	3,07	3,05517	0,02458
106		4,06	3,97	4,01712	0,06162	3,89	3,88	3,88546	0,00363

Médiane x	2,73409	0,05084
Moyenne x	2,92368	

Médiane y	2,55106	0,05545
Moyenne y	2,76691	

écart-type de répétabilité global	Srx	0,16411
écart-type de répétabilité robuste	Rob Swx	0,07538

Sry	0,14159
Rob Swy	0,08221

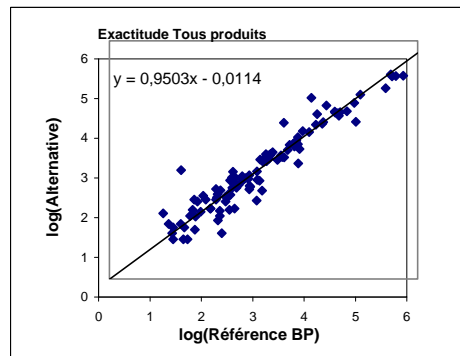
R	0,86278
Rob.R	1,09066

n =	2
q =	106
nq =	212

0,5 < R < 2	GMFR	Calcul sur les moyennes des deux méthodes
R > 2	OLS	
R < 0,5	OLS chgt	

Régression GMFR
Ecart-types globaux

Vxi	Vyi	
1,07811	5,27079	
0,09020	0,51670	
4,65574	0,00474	
0,57431	0,09045	
1,42242	1,01376	
0,44129	0,61533	
1,10514	0,82476	
0,34697	0,24132	
0,60887	0,46833	
0,06995	0,17521	
0,03719	0,08435	
0,09131	0,25366	
2,19446	1,19205	
0,00062	0,17730	
2,58973	3,87403	
4,66190	4,06395	
4,33995	4,05135	
3,21555	4,78554	
2,05355	6,48842	
0,09364	0,30079	
0,55225	0,01053	
0,44630	0,11045	
0,00418	0,22166	
0,13363	0,36506	
3,11398	2,99855	
0,01078	0,06545	
0,66663	0,16061	
2,43216	0,92207	
0,87125	1,33434	
0,08135	0,36671	
1,20482	2,32399	
2,63403	2,40975	
1,31660	3,32712	
0,05878	0,23456	
1,45340	1,17631	
0,79874	1,02663	
0,22386	0,15161	
0,69342	0,86858	
0,57724	0,43409	
0,24990	0,08859	
0,47581	1,99024	
0,70403	2,11815	
0,00943	1,24858	
0,16047	0,10484	
1,89726	1,95529	
4,27567	4,21097	
0,31973	0,30911	
7,68571	7,03872	
6,80331	5,58244	
0,09830	0,29194	
4,72550	3,81237	
5,84185	5,27079	
5,79305	6,24395	
0,00132	0,12280	
3,24658	1,17631	
1,85433	1,76595	
0,85618	0,81267	
3,64999	2,80406	
1,16146	0,58208	
1,83463	1,95529	
2,92631	1,33434	
6,33351	4,09962	
3,40323	2,11815	
0,68189	0,75492	
0,18798	0,13333	
0,49077	0,25708	
1,44344	0,51718	
4,45429	4,47886	
1,21698	2,80406	
0,24742	0,12500	
0,06862	0,39941	
0,72579	0,78895	
0,96318	0,97010	
4,03321	6,24395	
0,08031	0,05039	
1,02399	1,04055	
1,11744	1,29418	
4,42039	6,24395	
2,98975	2,60384	
13,06481	11,37132	
7,02204	2,85773	
15,64632	11,11263	
13,29572	10,89867	
12,30285	8,33732	
1,34358	0,80352	
3,15535	2,83482	
3,37188	5,17239	
1,42697	2,72136	
1,41518	1,84774	
0,00581	0,58627	
0,46617	0,17904	
0,03764	0,14229	
0,01230	0,01617	
0,38826	0,18683	
5,79609	4,25594	
4,92893	4,11052	
5,68704	4,47886	
1,13391	0,04062	
7,27719	2,49738	
0,09915	0,11530	
0,92030	0,65415	
1,20214	0,50689	
14,07357	10,98185	
4,76448	3,64516	
0,02129	0,16679	
2,39505	2,50230	
Vx	Vy	Vxy
1,21636	1,09843	1,08751
Sx	Sy	
1,10289	1,04806	



Estimation des paramètres	sur les moyennes	
	r =	0,95499
	b =	0,95029
	a =	-0,01142

Ecart-type résiduel par rapport aux points estimés de la régression

S_{y:x} = 0,445601667

yi estimés	résidus	Smy:x
2,06951	-0,91900	0,31509
2,57681	-0,31772	
1,31702	1,42154	
2,25860	0,29629	
1,97578	0,07939	
2,33792	-0,03689	
3,47331	-0,07572	
3,16229	-0,04964	
3,28872	-0,03831	
2,94369	0,08921	
2,89646	0,07425	
2,96906	0,15353	
1,77195	0,22407	
2,76647	-0,29257	
3,83161	0,31891	
4,21753	-0,03667	
4,16456	0,02555	
1,56711	-0,32855	
3,72620	0,84185	
2,97193	0,18084	
2,27250	0,42582	
2,31900	0,22824	
2,72436	-0,22436	
3,01059	0,18295	
1,58135	-0,00828	
2,83661	0,11086	
2,21886	0,26474	
1,72391	0,37062	
2,14022	-0,18868	
2,58253	-0,23923	
2,02983	-0,31415	
1,67690	0,01321	
1,99592	-0,51880	
2,92277	0,18657	
1,95992	0,04008	
2,16644	-0,11407	
2,44921	0,06435	
2,22673	-0,10805	
2,25960	0,04143	
2,44797	0,14008	
2,30493	-0,53290	
2,20798	-0,46942	
2,71393	-0,73680	
2,50770	0,03054	
1,85212	-0,07397	
4,15631	0,06080	
2,38697	-0,00893	
4,62973	0,01274	
4,51905	-0,08332	
2,88193	0,26678	
1,30860	0,08047	
1,14836	0,00215	
1,16557	-0,16557	
2,77502	0,23280	
1,55704	0,44296	
3,68180	0,02122	
3,38867	0,01262	
1,48344	0,10460	
2,04601	0,18587	
1,85683	-0,07868	
1,61897	0,33257	
1,08190	0,30718	
1,52949	0,20907	
3,32171	0,05820	
2,47663	0,03216	
2,29623	0,12735	
1,95960	0,30433	
1,37431	-0,07328	
2,02840	-0,44035	
3,09479	-0,09389	
2,59097	-0,26617	
2,19781	-0,04910	
2,14005	-0,06879	
1,43368	-0,43368	
2,57810	0,03276	
3,44662	0,03872	
3,47709	0,09417	
1,35465	-0,35465	
3,92852	-0,02063	
5,19427	-0,04297	
4,54753	-0,58565	
5,42462	-0,30060	
5,21516	-0,11394	
5,09540	-0,28710	
1,98877	0,14496	
3,94657	0,00898	
4,00074	0,37088	
3,21760	0,71541	
3,56583	0,16204	
2,81266	-0,58704	
3,22141	-0,15624	
2,88995	0,14032	
2,71701	-0,01133	
3,18453	-0,11198	
4,38464	-0,15902	
4,25652	-0,05647	
1,16557	0,13546	
3,48238	-0,57506	
0,98491	0,66560	
2,55651	-0,02970	
3,41146	-0,07265	
3,50365	-0,23341	
5,28719	-0,17717	
4,23363	-0,11670	
2,86489	0,19028	
3,80600	0,07946	

Ecart-types des paramètres

S(a)	0,08707	t(a)	0,13115	p(a=0)	0,89591
S(b)	0,02788	t(b)	1,78305	p(b=1)	0,07749

Répétabilité
= 2,8 Sr

	Méthode de référence	Méthode alternative
Sr	0,16411	0,14159
r	0,45950	0,39645
Rob.Sr	0,07538	0,08221
Rob.r	0,21106	0,23020

Biais

Différences	
-1,03928	
-0,46454	
1,34062	
0,16611	
-0,03599	
-0,17121	
-0,26943	
-0,22709	
-0,22238	
-0,07680	
-0,08929	
-0,01381	
0,11935	
-0,44931	
0,10645	
-0,26932	
-0,20433	
-0,42255	
0,63490	
0,01335	
0,29492	
0,09490	
-0,37890	
0,01344	
-0,10303	
-0,04955	
0,13665	
0,26841	
-0,31266	
-0,38635	
-0,43235	
-0,08653	
-0,63523	
0,02165	
-0,07447	
-0,23942	
-0,07579	
-0,23656	
-0,08879	
0,00000	
-0,66550	
-0,59695	
-0,89080	
-0,11266	
-0,18288	
-0,16865	
-0,14582	
-0,24147	
-0,33175	
0,10400	
0,00000	
-0,06994	
-0,23856	
0,07561	
0,34949	
-0,18340	
-0,17667	
0,01498	
0,06682	
-0,18783	
0,23586	
0,23856	
0,11704	
-0,12759	
-0,10942	
-0,00479	
0,18980	
-0,15720	
-0,55848	
-0,26781	
-0,41373	
-0,17609	
-0,19276	
-0,52070	
-0,11413	
-0,15360	
-0,09975	
-0,43753	
-0,23816	
-0,32672	
-0,83556	
-0,59640	
-0,39878	
-0,56567	
0,02891	
-0,20950	
0,14956	
0,53507	
-0,03651	
-0,74620	
-0,33679	
-0,02288	
-0,16548	
-0,29059	
-0,40041	
-0,29117	
0,06247	
-0,76926	
0,60206	
-0,17546	
-0,26313	
-0,42872	
-0,46578	
-0,35020	
0,02839	
-0,13167	
D = -0,15676	moyenne
D = -0,16706	médiane

ANNEXE C :

RESULTATS DE SPECIFICITE/SELECTIVITE

Souches	Origine	Couleur des colonies après incubation	Aspect des colonies après révélation sur disque
<i>Staphylococcus aureus</i> colonies caractéristiques sur gélose Baird Parker	ATCC 6538	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	ATCC 9144	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit laitier	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit carné	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Lait cru	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Fromage au lait cru	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit laitier	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit laitier	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Fromage au lait cru	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Fromage au lait cru	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Chipolatas	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit carné	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit carné	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit carné	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit carné	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Produit carné	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	CIP 7625	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Pâtisserie	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Pâtisserie	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Saumon fumé	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
Lait	rose violet	colonies entourées d'une zone rose	
CIP 53154	rose violet	colonies entourées d'une zone rose	
Filet d'empereur	rose violet	colonies entourées d'une zone rose	
Salade de pâtes	rose violet	colonies entourées d'une zone rose	
Tartine capagnarde	rose violet	colonies entourées d'une zone rose	
<i>Staphylococcus aureus</i> colonies non caractéristiques sur gélose Baird Parker	Produit carné	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Foie de volaille	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
	Lait de chèvre	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.hyicus</i>	Collection	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.hyicus</i>	Produit carné	noire	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.hyicus</i>	Produit carné (E)	noire	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.hyicus</i>	Produit carné (G)	noire	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.hyicus</i>	Collection (SW)	noire	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.intermedius</i>	Collection	rose violet	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.intermedius</i>	Collection	violet foncé	colonies entourées d'une zone rose
<i>St.xylosus</i>	Munster	noire	pas de zone rose
<i>St.epidermidis</i>	Produit laitier	pas de colonie	/
<i>St.epidermidis</i>	ATCC 12228	pas de colonie	/
<i>St.scuiri</i>	Collection	pas de colonie	/
<i>St.saprophyticus</i>	Collection	noire	pas de zone rose
<i>St.cohnii</i>	Saumon fumé	pas de colonie	/
<i>St.epidermidis</i>	Clinique	pas de colonie	/
<i>St.epidermidis</i>	Saumon fumé	pas de colonie	/
<i>St.epidermidis</i>	Collection	pas de colonie	/
<i>St.simulans</i>	Salade composée	noire	pas de zone rose
<i>St.warneri</i>	Jambon braisé	pas de colonie	/
<i>St.warneri</i>	Lard fumé	pas de colonie	/
<i>St.warneri</i>	Jambon de Bayonne	pas de colonie	/
<i>St.xylosus</i>	Salade composée	noire	pas de zone rose
<i>St.xylosus</i>	Abats	noire	pas de zone rose
Autres genres			
<i>Listeria innocua</i>	Poisson fumé	bleue	pas de zone rose
<i>Enterococcus faecalis</i>	Produit carné	pas de colonie	/
<i>Micrococcus spp</i>	Végétaux	pas de colonie	/
<i>E.coli</i>	Produit laitier	pas de colonie	/
<i>Micrococcus spp</i>	Environnement	pas de colonie	/
<i>Micrococcus luteus</i>	Environnement	pas de colonie	/
<i>Micrococcus roseus</i>	Environnement	pas de colonie	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	Œuf	turquoise	pas de zone rose
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 3286	turquoise	pas de zone rose
<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 5433	pas de colonie	/
<i>Enterococcus durans</i>	Produit carné	pas de colonie	/