

CONFIDENTIEL

ETUDE POUR LA VALIDATION AFNOR DU TEST SMS
(Simple Method For *Salmonella*) POUR LA DETECTION
RAPIDE DES SALMONELLES DANS LES PRODUITS
D'ALIMENTATION HUMAINE ET ANIMALE
ET LES ECHANTILLONS D'ENVIRONNEMENT
RAPPORT DE SYNTHÈSE – JUILLET 2004

Ce rapport d'analyse ne concerne que les objets soumis aux analyses. Sa reproduction n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 26 pages.

Seuls certains essais rapportés dans ce document sont couverts par l'accréditation de la Section Laboratoire du COFRAC. Ils sont identifiés par le symbole *

Essais réalisés à l'ISHA : 25, avenue de la République 91300 Massy

Laboratoires

I.S.H.A.- CHAMPLAN

Rue du chemin blanc – CHAMPLAN – F – 91165 LONGJUMEAU
Tél. : **33 (0)1 69 79 31 50** Fax : 33 (0)1 64 48 82 49

E mail : ssha@ssha.asso.fr

Association reconnue d'utilité publique – SIREN : 784 259 947 – APE : 731Z – N° TVA intracommunautaire : FR 39 784 259 947

I.S.H.A.- MASSY

25, av. de la République – F – 91300 Massy
Tél. : **33 (0)1 69 79 31 50** Fax : 33 (0)1 64 48 82 49

E mail : microbiologie@ssha.asso.fr

Fabricant : **AES Laboratoire**

Laboratoire expert : **S.S.H.A. – I.S.H.A.**

En vue de l'obtention de la validation AFNOR selon la norme NF EN ISO 16140 du test Simple Method Salmonella (SMS) pour la détection des *salmonella* spp avec confirmation dans tous produits d'alimentation humaine et animale et échantillons d'environnement.

Méthode alternative : test Simple Method Salmonella (SMS) pour la détection rapide des salmonelles avec confirmation dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement.

Méthode de référence(*) : norme NF EN ISO 6579 (2002), concernant les méthodes pour la recherche des *Salmonella* spp.

SOMMAIRE

I. Introduction.....	4
II. Méthode alternative.....	4
III. Méthode de référence.....	4
IV. Résultats de l'étude préliminaire	
A- Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de la M.A. et de la M.R.....	4
B- Niveau de détection relatif de la MA et de la MR.....	8
C- Inclusivité et exclusivité de la méthode alternative.....	9
D- Praticabilité de la méthode alternative.....	10
V. Essais complémentaires	
V-A. Echantillons (matières grasses > à 20%) supplémentaires.....	12
VI. Etude collaborative	
A.Objectif.....	13
B. Mise en œuvre et résultats de l'étude collaborative	13
B-1. Laboratoires collaborateurs.....	13
B-2. Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé.....	13
B-3. Préparation et inoculation des échantillons.....	13
B-4. Etiquetage des échantillons.....	14
B-5. Expédition des échantillons.....	14
B-6. Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs.....	14
B-7. Résultats.....	14
B-7-1. Température et état des échantillons à la réception.....	14
B-7-2. Résultats du laboratoire expert.....	15
B-7-3. Résultats des laboratoires collaborateurs.....	15
B-7-4. Conclusion.....	22
VII. Conclusion générale.....	22
Annexes	
Annexe 1 : protocole de la méthode alternative.....	23
Annexe 2 : protocole de la méthode de référence.....	24
Annexe 3 : Résultats de sélectivité, souches cibles.....	25
Annexe 4 : Résultats de sélectivité, souches non cibles.....	26

I. INTRODUCTION

Ce document présente les différents résultats obtenus dans le cadre de l'étude de la validation Afnor du test SMS (Simple Method For *Salmonella*) par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 6579, pour la détection des *Salmonella* spp dans les produits d'alimentation humaine et animale et les échantillons d'environnement. Cette étude a été réalisée selon la norme NF EN ISO 16140.

Avertissement : Dans le cadre de la validation AFNOR les confirmations ont été réalisées selon les méthodes de références (ISO, CEN ou NF). Le MUCAP test a été utilisé hors validation.

II. METHODE ALTERNATIVE

Le milieu SMS est utilisé pour la recherche de *Salmonella* spp dans les produits alimentaires et les prélèvements d'environnement. Le principe du milieu repose sur la mobilité des salmonelles et leur aptitude à décarboxyler la L-Lysine. Sur ce milieu, les salmonelles produisent des zones de migration associées à un virage au rouge de la gélose. Les agents sélectifs contenus dans la formulation de même que l'incubation à 41°C confèrent au milieu SMS une forte sélectivité.

Le protocole de la méthode est présenté dans l'annexe 1.

III. METHODE DE REFERENCE

La méthode de référence est la norme NF EN ISO 6579 (2002), dont le protocole est présenté en annexe 2.

IV. RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

A- Exactitude relative, spécificité relative et la sensibilité relative de la méthode alternative et la méthode de référence

- L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances des deux méthodes sur des échantillons contaminés ou non contaminés. Les analyses sont réalisées en simple par les 2 méthodes et les échantillons sont répartis dans les principales catégories de produits alimentaires.

METHODES

Chacun des échantillons est analysé en simple par la méthode de référence et la méthode alternative. Les résultats positifs avec la méthode alternative ainsi que les résultats négatifs discordants sont confirmés selon le protocole de la méthode de référence.

La méthode alternative ayant l'étape de pré-enrichissement commune avec la méthode de référence, les essais sont réalisés à partir du même bouillon pour les 2 méthodes.

Dans le cas de contamination artificielle, plusieurs types de stress ont été utilisés (voir tableau suivant) et les suspensions bactériennes ont été inoculées dans la suspension-mère commune.

Type de stress	Souche	Origine	log N (MNS) – log N (MS)
4 °C pendant 5 jours	<i>S. indiana</i>	Filet de bœuf	0.5
4 °C pendant 46 jours	<i>S. virchow</i>	CIP 105 . 355	0.7
4 °C pendant 46 jours	<i>S. typhimurium</i>	CIP 104 . 115	0.6
4 °C pendant 25 jours	<i>S. infantis</i>	Neo. C 189.2983	0.7
-20 °C pendant 24 heures	<i>S. indiana</i>	Filet de bœuf	1.5
-20 °C pendant 24 heures	<i>S. virchow</i>	CIP 105 . 355	2.3
-20 °C pendant 24 heures	<i>S. typhimurium</i>	Bœuf haché cru	1.9
-20 °C pendant 24 heures	<i>S. enteritidis</i>	Filet de bœuf	1.2
-20 °C pendant 6 jours	<i>S. agona</i>	Industrie laitière	0.7
-20 °C pendant 6 jours	<i>S. typhimurium</i>	Table de découpe	0.5
-20 °C pendant 16 jours	<i>S. typhimurium</i>	Pigeon	0.9
-20 °C pendant 16 jours	<i>S. typhimurium</i>	Pièce de porc	1.3
-20 °C pendant 16 jours	<i>S. derby</i>	Pièce de porc	2.1
-20 °C pendant 25 jours	<i>S. infantis</i>	Neo. C 189.2983	1.5
-20 °C pendant 25 jours	<i>S. infantis</i>	ATCC 51741	0.6
-20 °C pendant 25 jours	<i>S. enteritidis</i>	Poulet	0.8
-20 °C pendant 25 jours	<i>S. heidelberg</i>	Viande de volaille	1.7
50 °C pendant 15 minutes	<i>S. virchow</i>	CIP 105 . 355	0.5
50 °C pendant 15 minutes	<i>S. enteritidis</i>	Ovo-produit	0.6
50 °C pendant 20 minutes	<i>S. infantis</i>	ATCC 51741	0.7
50 °C pendant 30 minutes	<i>S. indiana</i>	Filet de bœuf	0.8
50 °C pendant 30 minutes	<i>S. enteritidis</i>	Filet de bœuf	0.7
50 °C pendant 30 minutes	<i>S. typhimurium</i>	CIP 104 . 115	0.8
50 °C pendant 60 minutes	<i>S. typhimurium</i>	Bœuf haché cru	1.2

Au total 378 échantillons ont été analysés par les 2 méthodes dont 25,45 % d'échantillons contaminés naturellement.

Pour les types particuliers demandés par le bureau technique, ont été analysés :

- 13 volailles crues (8 échantillons positifs et 5 échantillons négatifs) ;
- 14 fromages au lait cru (6 échantillons positifs et 8 échantillons négatifs) ;
- 38 œufs et dérivés, y compris la mayonnaise crue (27 échantillons positifs et 11 échantillons négatifs).

Catégorie de produit	Nombre d'échantillons positifs	Nombre d'échantillons négatifs
Produits carnés	30	32
Produits de la mer	30	31
Ovo-produits	30	31
Produits laitiers	30	31
Echantillons d'environnement	30	33
Alimentation animale	35	35

RESULTATS

Produits carnés

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	29	0
Méthode alternative négative (A-)	1	32

Produits de la mer

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	29	1
Méthode alternative négative (A-)	0	31

Ovo-produits

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	30	0
Méthode alternative négative (A-)	0	31

Produits laitiers

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	28	2
Méthode alternative négative (A-)	0	31

Echantillons d'environnement

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	30	0
Méthode alternative négative (A-)	0	33

Alimentation animale

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	35	0
Méthode alternative négative (A-)	0	35

L'ensemble des matrices

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA = 181	PD = 3
Méthode alternative négative (A-)	ND = 1	NA = 193

négative (A-)	PPND = 0	PPNA = 0
----------------------	----------	----------

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Echantillons supplémentaires pour l'alimentation animale (essais complémentaires)

A la demande du Bureau Technique 10 échantillons d'alimentation animale (animaux d'élevage) ont été analysés par la méthode de référence et le test SMS. La concentration des bactéries dans la matrice varie de 4 à 6 cellules par 25 grammes de produit. Le stress appliqué est un traitement thermique de 52 °C pendant 15 minutes, la différence en dénombrement entre le milieu sélectif (XLD) et le milieu non sélectif (TSA) est supérieure à 0.5 en logarithme pour l'ensemble des souches utilisées. Les résultats montrent une concordance totale entre les deux méthodes.

Calcul de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative

Matrices	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	N-	Spécificité relative SP (%)
Produits carnés	29	32	1	0	62	98	30	97	32	100
Produits de la mer	29	31	0	1	61	98	29	100	32	97
Ovo-produits	30	31	0	0	61	100	30	100	31	100
Produits laitiers	28	31	0	2	61	97	28	100	33	94
Ech. d'environnement	30	33	0	0	63	100	30	100	33	100
Alim. animale	40	40	0	0	80	100	40	100	40	100

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.

AC = (PA+NA)/N x 100% , SE = PA/N+ x 100%, SP = NA/N- x 100%, N+ = PA+ND et N- = NA+PD.

La sensibilité a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ce ci inclu les positifs supplémentaires de la méthode alternative), comme suit : $S = \frac{PA+PD}{PA+ND+PD}$

Matrices	PA	NA	ND	PD	Sensibilité (S)
Produits carnés	29	32	1	0	97 %
Produits de la mer	29	31	0	1	100 %
Ovo-produits	30	31	0	0	100 %
Produits laitiers	28	31	0	2	100 %
Ech. d'environnement	30	33	0	0	100 %
Alim. animale	40	40	0	0	100 %

Les résultats montrent qu'il existe une concordance totale entre la méthode de référence et la méthode alternative pour les ovo-produits, les échantillons d'environnements et l'alimentation animale.

Pour les produits carnés un résultat faux négatif (ND) a été obtenu sur des raviolis crus et le sérotypage de la souche a donné le sérovar *brandenburg*. Deux résultats positifs supplémentaires (PD) et un résultat positif supplémentaire (PD) ont été obtenus respectivement pour les produits laitiers et les produits de la mer. Les sérotypages ont confirmé le sérovar *enteritidis* pour les produits de la mer et le sérovar *dublin* pour les produits laitiers.

CONCLUSION

Calcul des intervalles de confiance associés au nombre d'échantillons soumis à essai

	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC (%)	LCL (%)	N+	SE (%)	LCL (%)	N-	SP (%)	LCL (%)
Produits carnés	62	98	96	30	97	92	32	100	98
Produits de la mer	61	98	96	29	100	98	32	97	92
Ovo-produits	61	100	98	30	100	98	31	100	98
Produits laitiers	61	97	93	28	100	98	33	94	88
Ech. d'environnement	63	100	98	30	100	98	33	100	98
Alim. animale	70	100	98	30	100	98	70	100	98

LCL : limite de confiance inférieure à 95% (unilatéral)

Remarques

- 1- Pour l'ensemble des échantillons positifs, le test MUCAP a donné un résultat positif.
- 2- Le pourcentage de résultats positifs obtenus après 14 heures d'incubation du milieu SMS est de 83%. Quel que soit le résultat obtenu, la lecture du milieu SMS a été réalisée à 24 heures.
- 3- Le nombre de résultats discordants étant inférieur à six, le test Nc Nemar n'a pas été utilisé pour l'examen de ces résultats.

B - Niveau de détection relatif de la méthode alternative et de la méthode de référence

L'objectif est de déterminer la concentration minimale de *Salmonella* spp détectable dans un aliment par les deux méthodes.

Quatre niveaux de contamination (1 : 0 cellule / 25 mL ou g, 2 : 1 cellule / 25 mL ou g, 3 : 3 cellules / 25 mL ou g et 4 : 9 cellules / 25 mL ou g) ont été testés pour chaque couple aliment – souche. Six répliques ont été réalisées pour chaque modalité après le pré-enrichissement. L'inoculation des différents niveaux est réalisée dans la suspension-mère.

METHODES

Cinq couples aliment - souche de *Salmonella* ont été testés :

Souche	Aliment	Flore totale ^a
<i>S. typhimurium</i>	Viande hachée de boeuf	1.2 10 ³
<i>S. dublin</i>	Lait cru	1.2 10 ⁶
<i>S. enteritidis</i>	Œuf entier	7.2 10 ⁷

<i>S. virchow</i>	Filet de lieu noir	4.3 10 ⁷
<i>S. typhimurium</i>	Eau de process	5.3 10 ²

a : CFU/mL ou CFU/g

Trois niveaux de contamination ont été testé pour chaque couple aliment – souche. Six réplifications ont été réalisées pour chaque niveau. Les contaminations ont été réalisées directement dans le bouillon de pré-enrichissement, avant incubation.

Des suspensions d'environ 10 cellules par mL (suspension initiale) ont été préparées. A partir de la suspension initiale, un volume de 0.1 mL est prélevé pour contaminer 25 grammes de produit. En parallèle, la suspension initiale est diluée au demi et au 1/4. Un volume de 0.1 mL de ces 2 suspensions est prélevé pour contaminer 25 grammes de produit. Pour les 3 niveaux de contamination, l'homogénéité des suspensions est vérifiée par 10 dénombrements en gélose TSA et le calcul de l'intervalle de confiance selon la loi de Poisson est calculé.

Les niveaux de détection relatif obtenus pour la méthode alternative sont identiques à ceux obtenus pour la méthode de référence quel que soit le couple souche - matrice alimentaire testé.

Souche (matrice)	Niveau de détection relatif selon le test de Spearman-Kræber	
	Méthode de référence (*) ^a	Méthode alternative
<i>S. enteritidis</i> (œuf entier)	0.360 [0.261, 0.506]	0.360 [0.261, 0.506]
<i>S. virchow</i> (filet de Lieu noir)	0.250 [0.151, 0.428]	0.250 [0.151, 0.428]
<i>S. typhimurium</i> (viande hachée)	0.460 [0.315, 0.673]	0.460 [0.315, 0.673]
<i>S. dublin</i> (lait cru)	0.500 [0.362, 0.703]	0.500 [0.362, 0.703]
<i>S. typhimurium</i> (eau de process)	0.460 [0.315, 0.673]	0.460 [0.315, 0.673]

a : cellules dans 25 g / mL

CONCLUSION

La limite de détection de la méthode alternative et de la méthode de référence est identique, elle varie entre 0.250 CFU / 25 g (mL) [0.151, 0.428] et 0.500 CFU / 25 g (mL) [0.362, 0.703].

C - Inclusivité et exclusivité de la méthode alternative

L'objectif de cette étape est de s'assurer que toutes les souches de *Salmonella* spp sont détectées par le test SMS (inclusivité) et qu'il n'existe pas de réactions croisées avec des souches non-*Salmonella* (exclusivité).

METHODES

Les souches testées subissent 2 repiquages successifs avant leurs utilisations. Le dernier repiquage est réalisé dans l'eau peptonée tamponnée. Le niveau d'inoculation est compris entre 10 et 100 fois le niveau de détection relatif pour les souches cibles et d'environ 10⁶ pour les souches non cibles.

RESULTATS

Aucune réaction croisée n'a été détectée avec les souches non cibles. Les sérovars *gallinarum* et *paratyphi A* n'ont pas été détectés par le test SMS. Le premier sérovar étant immobile et le deuxième ayant peu ou pas d'activité lysine décarboxylase. Une souche de *S. infantis* et une souche de *S. paratyphi C* n'ont également pas été détectées. Trois souches supplémentaires de *S. infantis* ont donné un résultat positif.

Les résultats sont présentés en annexe 3 pour les souches cibles et en annexe 4 pour les souches non cibles.

CONCLUSION

Le test SMS est spécifique des *Salmonella* mobiles ayant une lysine décarboxylase.

D- Praticabilité de la méthode alternative

La praticabilité est étudiée en suivant les 13 critères décrits dans les exigences relatives aux études préliminaire et collaborative de l'AFNOR.

Les critères sont :

1- Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Le milieu SMS est pré-coulé en boîte de Petri. Les boîtes sont conditionnées par 10 unités dans des coffrets de 20 ou 120 unités.

Le MUCAP test est présenté sous forme d'un flacon compte-gouttes.

2- Volume des réactifs

Le flacon du MUCAP test contient 8 mL de solution (qsp 160 confirmations).

3- Conditions de stockage des éléments (péremption des produits non ouverts)

La température de stockage des éléments du test est comprise entre 2 et 8 °C. Ils doivent être portés à température ambiante avant utilisation. La date d'expiration est indiquée sur le coffret, sur les boîtes de SMS et sur le flacon MUCAP test.

4- Modalités d'utilisation après première utilisation

Le MUCAP test peut être utilisé, après ouverture jusqu'à la date de péremption indiquée. Entre chaque utilisation, le flacon doit être refermé et stocké entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière.

5- Equipements ou locaux spécifiques nécessaires

Parmi les équipements nécessaires il faut :

- une étuve réglée à 41°C ± 1°C
- une étuve réglée à 37°C ± 1°C
- Lampe de Wood
- matériel courant de laboratoire

6- Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer

Tous les éléments du test 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 un jour.

8- Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique

Etape	Temps en minutes					
	M.A.			M.R.		
	1 analyse	10 analyses	50 analyses	1 analyse	10 analyses	50 analyses
Prise d'essai	2	17	70	3	23	97
Mise en suspension						
Inoculation des bouillons sélectifs						
Inoculation du milieu SMS	0,75	5	24			
Inoculation et incubation Des milieux sélectifs				1	5	25
Lecture des boîtes	1	7	30	0,2	2	10
Confirmation biochimique				5	50	250
Confirmation par le MUCAP test	0,5	3,5	20			
Confirmation sérologique				7,5	75	375
Total	4,25	32,5	144	16,70	155	757

9- Délai d'obtention des résultats

Premier cas : échantillons négatifs

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Repiquage du pré-enrichissement	J1	J1
Repiquage des bouillons sélectifs	-	J2
Lecture XLD et autre milieu au choix	-	J3
Lecture du milieu SMS	J2	-
Confirmation du genre après purification	-	J5
Confirmation du genre	-	J5 à J7*

* : identification de la 1 ère à J5, puis 48 heures supplémentaires pour les autres colonies

Deuxième cas : échantillons positifs

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Repiquage du pré-enrichissement	J1	J1
Repiquage des bouillons sélectifs	-	J2
Lecture XLD et autre milieu au choix	-	J3
Lecture du milieu SMS	J2	-
Confirmation du genre après purification	-	J5
Confirmation du genre	-	J5 à J7

Réalisation du MUCAP test	J2	
Confirmation conventionnelle *	J3 à J5	

* : seulement si le MUCAP test est négatif

10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence.

11- Etapes communes avec la méthode de référence

Le pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée.

12- Traçabilité des résultats d'analyse

-

13- Maintenance par le laboratoire

-

CONCLUSION

Le test SMS permet d'obtenir des délais d'obtention de résultats plus courts que ceux obtenus par la méthode de référence.

V. ESSAIS COMPLEMENTAIRES

V-A. Echantillons (matières grasses > à 20%) supplémentaires

16 échantillons de mayonnaise et de chocolat (8 non contaminés et 8 contaminés à un taux de 5 cellules par 25 grammes de produit) ont été analysés avec ajout de tween dans la suspension-mère. Cet essai a été réalisé afin de vérifier la lisibilité de la lecture des boîtes du test SMS. Les résultats montrent que l'utilisation du tween dans les conditions décrites (matrice et souche) n'influe pas sur la lecture du résultat du test.

VI. ETUDE COLLABORATIVE

A. OBJECTIF

L'étude collaborative a pour but de déterminer la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires utilisant des échantillons identiques et de comparer ces résultats dans le cadre de l'étude comparative des méthodes.

B. MISE EN ŒUVRE ET RESULTATS DE L'ETUDE COLLABORATIVE

B-1. Laboratoires collaborateurs

L'étude collaborative a été réalisée par le laboratoire expert et quatorze laboratoires collaborateurs.

B-2. Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé

La stabilité de *Salmonella enteritidis*, dans le lait pasteurisé, a été réalisée sur 5 jours à (4 ± 2) °C. Deux types d'analyse ont été réalisées :

- (1) – Inoculation de 3 cellules dans 25 mL de lait pasteurisé, les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2 et J+5 par la méthode de référence (*) et le test SMS.
- (2) – Inoculation de $2.3 \cdot 10^4$ cellules dans 20 mL de lait pasteurisé, les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2 et J+5 par dénombrement sur Hektoen.

L'ensemble des résultats montre que la souche de *S. enteritidis* est stable pendant 5 jours à (4 ± 2) °C dans du lait pasteurisé.

B-3. Préparation et inoculation des échantillons

La matrice « lait pasteurisé » a été inoculée avec *Salmonella enteritidis*.

Trois niveaux ont été testés :

0 cellule dans 25 mL (**L0**),

3 cellules dans 25 mL (**L1**),

30 cellules dans 25 mL (**L2**).

Le lait pasteurisé a été réparti à raison de 25 mL dans des pots stériles. Chaque pot a été inoculé individuellement. Huit réplicats par taux et par laboratoire ont été préparés. Chaque laboratoire a reçu 24 échantillons à tester par la méthode de référence et la méthode alternative et 1 échantillon de lait pasteurisé non-inoculé pour déterminer la flore endogène de la matrice.

Niveaux	Taux cibles (cellules/25 mL)	Taux réels (cellules/25 mL)	Intervalle de confiance donné par la loi de Poisson
L0	0	0	-
L1	3	3	[0 , 7]
L2	30	31	[21 , 42]

Tableau 1 : Résultats de dénombrement des inocula de *Salmonella enteritidis*

B-4. Etiquetage des échantillons

L'étiquetage des pots a été réalisé de la façon suivante :

- 1- un code permettant d'identifier le laboratoire : A à N,
- 2- un code permettant d'identifier chaque échantillon, connu uniquement du laboratoire expert.

Les échantillons et les témoins température (lait pasteurisé non inoculé contenant un thermobouton) ont été stockés à 4°C avant expédition.

Niveaux	Taux cibles (cellules / 25 mL)	Code échantillon
L0	0	2, 9, 14, 17, 21, 22, 23, 24.
L1	3	3, 4, 10, 11, 12, 13, 19, 20.
L2	30	1, 5, 6, 7, 8, 15, 16, 18.

Tableau 2 : Codes échantillon attribués a chaque niveau de contamination

B-5. Expédition des échantillons

Les échantillons ont été expédiés dans un kit froid (sofribox ISH3L/20P + 1 sowgam F10/0 de la société SOFRIGAM) le 30 mars 2004. Le transport a été confié à CHRONOPOST. Les colis sont arrivés en moins de 24 heures chez les laboratoires collaborateurs.

B-6. Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs

La température du pot témoin a été prise dès réception du colis et le thermobouton expédié au laboratoire expert pour la lecture des données. Les échantillons ont été analysés dans la journée (31 mars 2004). Le laboratoire expert a analysé une série d'échantillons dans les mêmes conditions en parallèle avec la méthode alternative et la méthode de référence.

B-7. Résultats

B-7-1. Température et état des échantillons à réception

Laboratoires	Températures (°C)	Etat des échantillons
A	1.0	Bon
B	4.7	Bon
C	4.4	Bon
D	3.6	Bon
E	6.5	Bon
F	3.5	Bon
G	3.8	Bon
H	2.9	Bon
I	4.9	Bon
J	4.0	Bon
K	2.9	Bon
L	3.8	Bon
M	4.6	Bon
N	3.0	Bon

Tableau 3 : Températures et états des échantillons à réception chez les laboratoires participants

Deux thermoboutons n'ont pas été restitués au laboratoire expert à ce jour. L'analyse des profils thermiques des différents thermoboutons montre une variation de la température entre 0.48 °C et 5.18 °C pour l'ensemble des laboratoires. On note, pour le laboratoire D, une température minimale de – 0.54 °C durant 30 minutes.

B-7-2. Résultats du laboratoire expert

Niveau de contamination	Méthode alternative	Méthode de référence (*)
L0	0/8	0/8
L1	8/8	8/8
L2	8/8	8/8

Tableau 4 : Résultats positifs obtenus par le laboratoire expert pour les 2 méthodes

Les résultats obtenus par le laboratoire expert sont conformes à ceux attendus.

B-7-3. Résultats des laboratoires collaborateurs

Les résultats des laboratoires collaborateurs sont synthétisés dans les tableaux 8 et 9. Les résultats du laboratoire D n'ont pas été pris en compte. Dans un premier envoi de résultats, deux résultats discordants ont été observés (échantillons n° 21 et n° 23 obtenus positifs avec confirmation par la méthode de référence et négatifs par la méthode alternative). Le laboratoire évoque une erreur de prélèvement dans les sacs de la suspension-mère. Les résultats de la contre analyse, demandée par le laboratoire expert à partir de l'eau peptonée tamponnée conservée à 4°C, ont donné des résultats conformes (les 2 échantillons ont donné un résultat négatif pour les 2 méthodes). Cependant cette contre analyse a été réalisée une semaine après le 31 mars 2004, date de la réalisation des tests par les laboratoires participants, raison pour laquelle nous avons exclu ce laboratoire.

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	0/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	0/8	8/8	8/8
D	-	-	-
E	0/8	7/8	8/8
F	0/8	8/8	8/8
G	0/8	8/8	8/8
H	0/8	7/8	8/8
I	0/8	8/8	8/8
J	0/8	7/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	7/8	8/8
M	0/8	7/8	8/8
N	0/8	8/8	8/8
Total	0/104 ^a	99/104 ^b	104/104 ^c

Tableau 5 : Résultats positifs obtenus avec la méthode de référence

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode de référence

b TP_{1r} : vrais positifs obtenus au niveau 1 avec la méthode de référence

c TP_{2r} : vrais positifs obtenus au niveau 2 avec la méthode de référence

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	0/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	0/8	8/8	8/8
D	-	-	-
E	0/8	7/8	8/8
F	0/8	8/8	8/8
G	0/8	8/8	8/8
H	0/8	7/8	8/8
I	0/8	8/8	8/8
J	0/8	7/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	7/8	8/8
M	0/8	7/8	8/8
N	0/8	8/8	8/8
Total	0/104 ^a	99/104 ^b	104/104 ^c

Tableau 6 : Résultats positifs obtenus avec le test SMS

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode alternative

b TP_{1a} : vrais positifs obtenus au niveau 1 avec la méthode alternative

c TP_{2a} : vrais positifs obtenus au niveau 2 avec la méthode alternative

1- Calcul des pourcentages de spécificité (SP) et de sensibilité (SE) pour la méthode de référence et la méthode alternative

	Méthode de référence	Méthode alternative
SP (niveau L0)	100%	100%
SE (niveau L1)	95%	95%
SE (niveau L2)	100%	100%

$$SP = [1 - FP/N^-] \times 100\%$$

N⁻ : nombre total des essais L0

FP : nombre de faux positifs

$$SE = [TP/N^+] \times 100\%$$

N⁺ : nombre total des essais L1 ou L2

TP : nombre de vrais positifs

2- Calcul de l'exactitude relative pour les différents niveaux de contamination

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA= 0	PD= 0	0
-	ND= 0	NA= 104	104
Total	0	104	104

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.

Tableau 7 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L0

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA= 99	PD= 0	99
-	ND= 0	NA= 5	5
Total	99	5	104

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.

Tableau 8 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L1

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA= 104	PD= 0	104
-	ND= 0	NA= 0	0
Total	104	0	104

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.

Tableau 9 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L2

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA= 203	PD= 0	203
-	ND= 0	NA= 109	109
Total	203	109	312

Tableau 10 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour la totalité des résultats

3- Calcul des intervalles de confiance

	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC (%)	LCL (%)	N+	SE (%)	LCL (%)	N-	SP (%)	LCL (%)
Niveau L0	104	100	98	-	-	-	104	100	98
Niveau L1	104	100	98	104	95	93	-	-	-
Niveau L2	104	100	98	104	100	98	-	-	-
Total	312	100	98	208	98	96	104	100	98

LCL : limite de confiance inférieure à 95% (unilatéral)

4- Résultats discordants

Aucun résultat discordant n'a été observé entre la méthode de référence et la méthode alternative.

5- Interprétation

Les résultats obtenus, dans l'étude collaborative, sont comparables à ceux obtenus dans l'étude préliminaire pour l'exactitude relative (de 97% à 100% selon la catégorie d'aliment), la sensibilité relative (de 97% à 100% selon la catégorie d'aliment) et la spécificité relative (de 94% à 100% selon la catégorie d'aliment).

Degré d'accord

C'est le pourcentage de chances de trouver le même résultat pour deux prises d'essai identiques (2 échantillons identiques) analysés dans le même laboratoire dans des conditions de répétabilité.

Le degré d'accord est la moyenne des probabilités que deux réplicats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Le degré d'accord de la méthode alternative, comme la méthode de référence, est de :
 100% pour le niveau de contamination L0 (voir tableau 14),
 92% pour le niveau de contamination L1 (voir tableau 15),
 100% pour le niveau de contamination L2 (voir tableau 16).

Niveau de contamination L0

Lab.	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paire de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paire de négatifs	Probabilité de paire de résultats identiques
A	0	0	0	1.00	1.00	1.00
B	0	0	0	1.00	1.00	1.00
C	0	0	0	1.00	1.00	1.00
E	0	0	0	1.00	1.00	1.00
F	0	0	0	1.00	1.00	1.00
G	0	0	0	1.00	1.00	1.00
H	0	0	0	1.00	1.00	1.00
I	0	0	0	1.00	1.00	1.00
J	0	0	0	1.00	1.00	1.00
K	0	0	0	1.00	1.00	1.00
L	0	0	0	1.00	1.00	1.00
M	0	0	0	1.00	1.00	1.00
N	0	0	0	1.00	1.00	1.00
Moyenne						1.00

Tableau 11 : Calcul du degré d'accord pour le niveau de contamination L0 pour les 2 méthodes

Niveau de contamination L1

Lab.	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paire de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paire de négatifs	Probabilité de paire de résultats identiques
A	8	1.00	1.00	0	0	1.00
B	8	1.00	1.00	0	0	1.00
C	8	1.00	1.00	0	0	1.00
E	7	0.88	0.77	0.10	0.01	0.78
F	8	1.00	1.00	0	0	1.00
G	8	1.00	1.00	0	0	1.00
H	7	0.88	0.77	0.10	0.01	0.78
I	8	1.00	1.00	0	0	1.00
J	7	0.88	0.77	0.10	0.01	0.78
K	8	1.00	1.00	0	0	1.00
L	7	0.88	0.77	0.10	0.01	0.78
M	7	0.88	0.77	0.10	0.01	0.78
N	8	1.00	1.00	0	0	1.00
Moyenne						0.92

Tableau 12 : Calcul du degré d'accord pour le niveau de contamination L1 pour les 2 méthodes

Niveau de contamination L2

Lab.	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paire de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paire de négatifs	Probabilité de paire de résultats identiques
A	8	1.00	1.00	0	0	1.00
B	8	1.00	1.00	0	0	1.00
C	8	1.00	1.00	0	0	1.00
E	8	1.00	1.00	0	0	1.00
F	8	1.00	1.00	0	0	1.00
G	8	1.00	1.00	0	0	1.00
H	8	1.00	1.00	0	0	1.00
I	8	1.00	1.00	0	0	1.00
J	8	1.00	1.00	0	0	1.00
K	8	1.00	1.00	0	0	1.00
L	8	1.00	1.00	0	0	1.00
M	8	1.00	1.00	0	0	1.00
N	8	1.00	1.00	0	0	1.00
Moyenne						1.00

Tableau 13 : Calcul du degré d'accord pour le niveau de contamination L2 pour les 2 méthodes

Concordance

C'est le pourcentage de chances de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). La concordance est la probabilité que de toutes les paires de répliqués donnant le même résultat pour des laboratoires différents.

La concordance de la méthode alternative, comme de la méthode de référence, est de :

100% pour le niveau de contamination L0,

91% pour le niveau de contamination L1 (voir tableau 17),

100% pour le niveau de contamination L2 (voir tableau 18).

Niveau de contamination L1

Lab.	Nombre de positifs	Paires inter-laboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires inter-laboratoires
A	8	728	768
B	8	728	768
C	8	728	768
E	7	648	768
F	8	728	768
G	8	728	768
H	7	648	768
I	8	728	768
J	7	648	768
K	8	728	768
L	7	648	768
M	7	648	768
N	8	728	768
Total		9064	9984

Tableau 14 : Calcul de la concordance pour le niveau de contamination L1 pour les 2 méthodes

Niveau de contamination L2

Lab.	Nombre de positifs	Paires inter-laboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires inter-laboratoires
A	8	768	768
B	8	768	768
C	8	768	768
E	8	768	768
F	8	768	768
G	8	768	768
H	8	768	768
I	8	768	768
J	8	768	768
K	8	768	768
L	8	768	768
M	8	768	768
N	8	768	768
Total		9984	9984

Tableau 15 : Calcul de la concordance pour le niveau de contamination L2 pour les 2 méthodes

Odds ratio

Le calcul de *odds ratio* (COR) est défini comme suit

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1
L1	92%	91%	1.14
L2	100%	100%	1

Les valeurs de *odds ratio* sont identiques pour la méthode alternative comme pour la méthode de référence.

Lorsque COR = 1, le degré d'accord et la concordance sont égaux. Deux échantillons identiques ont autant de chance de donner le même résultat s'ils sont analysés par le même laboratoire que s'ils sont analysés par des laboratoires différents.

Lorsque COR > 1, la concordance est plus petite que le degré d'accord. Deux échantillons identiques ont plus de chances de donner le même résultat s'ils sont analysés par le même laboratoire que s'ils sont analysés par des laboratoires différents. La variabilité inter-laboratoire devient prédominante.

Cependant le fait de trouver COR > 1 peut résulter de variations dues au hasard. L'utilisation d'un essai de signification statistique peut permettre de confirmer que la variation inter-laboratoire est bien prédominante.

Test exact : le tableau suivant donne les différentes combinaisons possible pour le niveau L1

Lab.	+ -	Total	+ -	Total	+ -	Total	+ -	Total	+ -	Total	+ -	Total	+ -	Total
A	8 0	8	6 2	8	6 2	8	5 3	8	5 3	8	4 4	8	3 5	8
B	8 0	8	7 1	8	6 2	8	7 1	8	6 2	8	7 1	8	8 0	8
C	8 0	8	7 1	8	7 1	8	7 1	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
E	7 1	8	7 1	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
F	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
G	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
H	7 1	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
I	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
J	7 1	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
K	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
L	7 1	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
M	7 1	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
N	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8	8 0	8
Total	99 5	104	99 5	104	99 5	104	99 5	104	99 5	104	99 5	104	99 5	104
P (table)		4 10 ⁻⁴		2 10 ⁻⁴		7 10 ⁻⁵		4 10 ⁻⁵		2 10 ⁻⁵		6 10 ⁻⁶		6 10 ⁻⁷
Nb. d'arr.		1287		2860		858		858		156		156		13
P (Cutoff)		0.459		0.446		0.058		0.033		0.003		0.001		0.000
P (value)		1.000		0.541		0.096		0.037		0.004		0.001		

Pour le test SMS, P (value) = 1, P > 0.05, on peut conclure que la répartition des 5 résultats négatifs est aléatoire.

Il est à noter que les 5 échantillons négatifs du niveau L1 par la méthode alternative ont également étaient négatifs par la méthode de référence. Ce ci est probablement du au faible taux de contamination visé.

B-7-4. Conclusion

Les différents calculs réalisés montrent que la méthode alternative possède la même spécificité (100%) et la même sensibilité aux 2 niveaux (95% et 100%) que la méthode de référence. Son exactitude relative est de 100% pour les 3 niveaux de contamination. La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, *odds ratio*) est identique à celle de la méthode de référence.

Par ailleurs, les résultats obtenus pour l'ensemble des participants, montrent une corrélation totale entre la confirmation des résultats positifs du test SMS par la méthode conventionnelle et par le MUCAP test.

VII. CONCLUSION GENERALE

A la lumière des résultats de l'étude préliminaire, des essais complémentaires et de l'étude collaborative, le laboratoire expert propose la validation du test SMS.

PROTOCOLE DU TEST SMS

ETAPE 1 : PRE-ENRICHISSEMENT

X g (mL) d'échantillon + 9X mL d'eau peptonée tamponnée

Incubation à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 heures \pm 2 heures

β

ETAPE 2 : ENSEMENCEMENT

Dépôt de 3X0,1 mL d'eau peptonée tamponnée incubée sur un bord de la boîte de Petri du milieu S.M.S.

β

ETAPE 3 : INCUBATION

Les boîtes de Petri sont incubées à $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures

β

ETAPE 4 : LECTURE DES BOITES

Le test est négatif, s'il n'existe pas de zone de migration rouge sur la boîte de Petri ou que cette zone soit inférieure à 2 cm.

Le test est présumé positif, si le diamètre de cette zone est supérieure ou égale à 2 cm

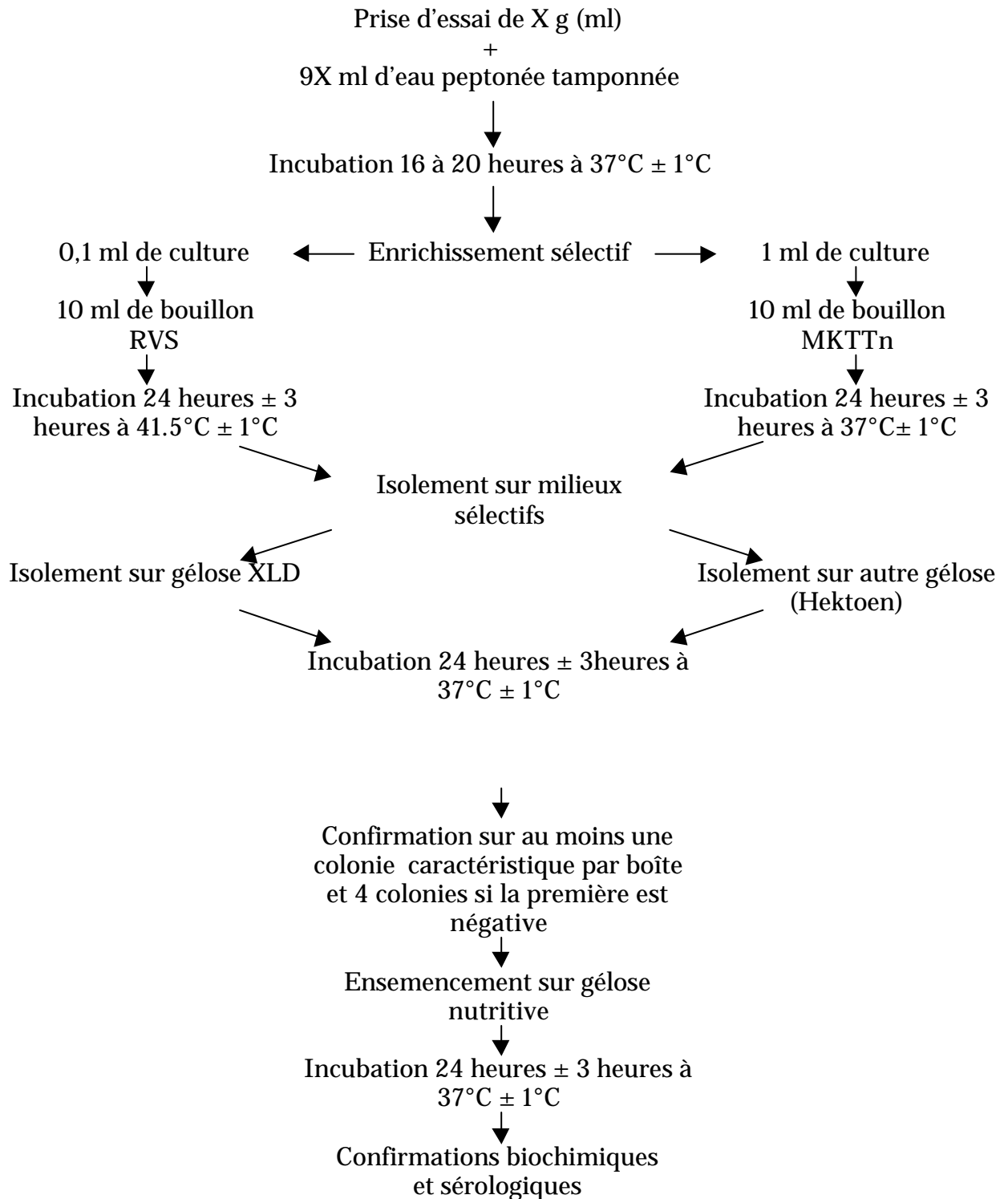
↓

ETAPE 5 : CONFIRMATION

La confirmation est réalisée selon les méthodes classiques (NF, EN ou ISO), après une étape de purification.

Annexe 2 : protocole de la méthode de référence

PROTOCOLE DE LA METHODE DE REFERENCE NORME ISO 6579



Annexe 3 : Résultats de sélectivité, souches cibles

Microorganismes & Origine	Résultats			
	Méthode référence		Méthode alternative	
	Résultat attendu	Résultat obtenu	Résultat attendu	Résultat obtenu
<i>S. anatum</i> (Saucisson sec)	/	/	+	+
<i>S. agona</i> (lait)	/	/	+	+
<i>S. arizonae</i> (Saucisson sec)	/	/	+	+
<i>S. brandenburg</i> (Viande cuite)	/	/	+	+
<i>S. brandenburg</i> (Jambon fumé)	/	/	+	+
<i>S. brandenburg</i> (porc)	/	/	+	+
<i>S. brandenburg</i> (grattin de courgette)	/	/	+	+
<i>S. bredeney</i> (Rôti de dinde cru)	/	/	+	+
<i>S. derby</i> (Echine de porc)	/	/	+	+
<i>S. derby</i> (Pièce de porc)	/	/	+	+
<i>S. derby</i> (Saucisse)	/	/	+	+
<i>S. enteritidis</i> (Poulet)	/	/	+	+
<i>S. enteritidis</i> (Ovo-produit)	/	/	+	+
<i>S. enteritidis</i> (Ovo-produit)	/	/	+	+
<i>S. enteritidis</i> (filet de bœuf)	/	/	+	+
<i>S. gallinarum</i> (CIP 57.53)	+	+	-	-
<i>S. gallinarum</i> (CIP A 255)	+	+	-	-
<i>S. hadar</i> (Poulet cru)	/	/	+	+
<i>S. hadar</i> (Escalope volaille)	/	/	+	+
<i>S. hadar</i> (Merguez)	/	/	+	+
<i>S. heidelberg</i> (Volaille)	/	/	+	+
<i>S. kottbus</i> (Jardinière)	/	/	+	+
<i>S. kottbus</i> (Sauté de dinde cru)	/	/	+	+
<i>S. paratyphi A</i> (CIP 55 39)	+	+	-	-
<i>S. paratyphi A</i> (CIP 55 40)	+	+	-	-
<i>S. paratyphi A</i> (CIP A220)	+	+	-	-
<i>S. paratyphi B</i> (CIP 54 100)	/	/	+	+
<i>S. paratyphi B</i> (SAL 19.1)	/	/	+	+
<i>S. paratyphi B</i> (SAL 19.2)	/	/	+	+
<i>S. paratyphi C</i> (CIP 55 108)	+	+	+	-
<i>S. typhimurium</i> (Pied en gelée)	/	/	+	+
<i>S. typhimurium</i> (Pigeon)	/	/	+	+
<i>S. typhimurium</i> (CIP 104 115)	/	/	+	+
<i>S. typhimurium</i> (CIP 60. 62)	/	/	+	+
<i>S. typhimurium</i> (Bœuf cru)	/	/	+	+
<i>S. typhimurium</i> (table de découpe)	/	/	+	+
<i>S. typhi</i> (CIP 54 136)	/	/	+	+
<i>S. infantis</i> (CIP 103 . 549)	+	+	+	-
<i>S. infantis</i> (ATCC 51741)	/	/	+	+
<i>S. infantis</i> (Neo. C1794)	/	/	+	+
<i>S. infantis</i> (Neo. C189.2983)	/	/	+	+
<i>S. saintpaul</i> (Filet de dinde cru)	/	/	+	+
<i>S. saintpaul</i> (Rôti de lapin)	/	/	+	+
<i>S. virchow</i> (CIP 105 . 355)	/	/	+	+
<i>S. virchow</i> (Afssa 11337)	/	/	+	+
<i>S. virchow</i> (Afssa 6838 lac+)	/	/	+	+
<i>S. virchow</i> (souche B afssa)	/	/	+	+
<i>S. montevideo</i> (SAL 17.1)	/	/	+	+
<i>S. montevideo</i> (SAL 17.3)	/	/	+	+
<i>S. montevideo</i> (SAL 17.4)	/	/	+	+
<i>S. montevideo</i> (SAL 17.5)	/	/	+	+
<i>S. montevideo</i> (SAL 17.7)	/	/	+	+
<i>S. schevazengrund</i> (porc)	/	/	+	+
<i>S. senftenberg</i> (CIP 105343)	/	/	+	+

Annexe 4 : Résultats de sélectivité, souches non cibles

Microorganismes & Origine	Résultats			
	Méthode référence		Méthode alternative	
	Résultat attendu	Résultat obtenu	Résultat attendu	Résultat obtenu
<i>Bacillus cereus</i> (CIP 549)	/	/	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (Lait)	/	/	-	-
<i>Bacillus circulans</i> (Industrie laitière)	/	/	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (Crème dessert)	/	/	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i> (CIP 58 55)	/	/	-	-
<i>Staphylococcus epidermis</i> (environnement)	/	/	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	/	/	-	-
<i>Escherichia coli</i> (Carotte râpées)	/	/	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	/	/	-	-
<i>Escherichia coli</i> (Industrie laitière)	/	/	-	-
<i>Escherichia hermanii</i> (CIP 103 176)	/	/	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (Industrie laitière)	/	/	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (CIP 60 86 T)	/	/	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (CIP 60 85)	/	/	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (-)	/	/	-	-
<i>Hafnia alvei</i> (Taboulé)	/	/	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Pâtisserie)	/	/	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (Salade de soja)	/	/	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CIP 82 91)	/	/	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CIP 100 720)	/	/	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 194 29)	/	/	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (CIP 69 13 T)	/	/	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (CIP 102 127)	/	/	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 80 90)	/	/	-	-
<i>Citrobacter koserii</i> (CIP 72 11)	/	/	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> (CIP 53 62)	/	/	-	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 102 31)	/	/	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Sdw. Dinde fromage)	/	/	-	-
<i>Shigella flexneri</i> (CIP 82 48 T)	/	/	-	-
<i>Shigella sonnei</i> (ATCC 92 90)	/	/	-	-