



***Validation de la méthode
RAPID>Listeria spp pour
la recherche de Listeria spp.***

Rapport de synthèse

-
Etudes comparative et interlaboratoire selon le référentiel
EN ISO 16140

Date de validation : 15/12/2006
Date d'extension : 29/03/2007
Numéro d'attestation : BRD 07/12 – 12/06

Etude proposée par :

L'INSTITUT PASTEUR DE LILLE
S.E.R.M.H.A.
Domaine du CERTIA - BP 20039
369, Rue Jules Guesde
59651 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX

pour :

BIO-RAD
3, Bd Raymond Poincaré
92430 MARNES-LA-COQUETTE

1 Introduction

1.1 Référentiels de validation

L'étude de validation de la méthode RAPID'*Listeria* spp – recherche a été réalisée selon le référentiel EN ISO 16140.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

1.2.1 Protocole

Le protocole est le suivant :

- un enrichissement en Fraser ½ pendant 24 heures à 30°C,
- un étalement-isolement de 0,1ml sur milieu RAPID'*Listeria* spp. incubé 24 heures +/- 2 heures à 37°C,
- une confirmation des colonies caractéristiques : bleues à bleu-vert

Le schéma de la méthode figure en annexe A.

Les colonies caractéristiques obtenues sont confirmées, à raison d'au moins une colonie par boîte :

1) pour le genre :

- par les tests décrits dans les méthodes normalisées, sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée (GRAM et catalase),
- ou par piqûre sur gélose PALCAM à partir d'une colonie isolée, incubée 24 heures à 37°C,
- ou par piqûre sur gélose RAPID *L.Mono* à partir d'une colonie isolée, incubée 24 heures à 37°C, en parallèle avec une coloration de GRAM et un test catalase

puis,

2) pour l'espèce (facultatif)

- par les tests décrits dans les méthodes normalisées, sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée (CAMP test, hémolyse, xylose et rhamnose) ou par l'utilisation d'une galerie miniaturisée,
- ou par piqûre sur gélose RAPID *L.Mono* pour confirmer la présence de *Listeria monocytogenes* à partir d'une colonie isolée, lorsque le spot est bleu.

D'autre part, des essais ont été réalisés dans le cadre de l'étude de validation, sur les échantillons positifs testés lors de l'étude d'exactitude, pour vérifier qu'il était possible :

- de conserver les bouillons Fraser ½ jusqu'à 72 heures à 3°C +/- 2°C, avant étalement – isolement de la gélose RAPID'*Listeria* spp.
- de réaliser les lectures des géloses RAPID'*Listeria* spp. directement après incubation (à partir de 22 heures d'incubation) et après prolongation de cette incubation pendant 24 heures supplémentaires (jusqu'à 48 heures d'incubation)
- de conserver les géloses RAPID'*Listeria* spp. pendant 48 heures à 3°C +/- 2°C après incubation.

1.2.2 Principe de la méthode

Le milieu RAPID'*Listeria* spp. (RLSP) est un milieu de culture gélosé, sélectif des *Listeria*.

Il permet de mettre en évidence les *Listeria* spp grâce à la détection de l'activité β -D-glucosidase par un substrat chromogénique. Les colonies de *Listeria* sont bleues à bleu-vert.

La sélectivité du milieu est obtenue par l'action combinée du Chlorure de Lithium et du mélange antibiotique.

1.3 Domaine d'application

- tous produits d'alimentation humaine,
- échantillons de l'environnement

1.4 Méthode de référence

L'étude de validation a été réalisée par rapport à la méthode de référence EN ISO 11290-1/A1 :2004.

Le schéma de la méthode figure en annexe A.

2 Etude comparative des méthodes

2.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

L'objectif de ces essais, selon le référentiel EN ISO 16140, est de comparer les performances des deux méthodes:

- la méthode de référence NF EN ISO 11290-1/A1 :2005,
- la méthode RAPID'*Listeria* spp.

sur des échantillons naturellement contaminés et non contaminés en *Listeria*.

2.1.1 Nombre et nature des échantillons

Selon la norme EN ISO 16140, 5 catégories de produits doivent être analysées avec un minimum de 60 échantillons par catégorie doivent être analysés, dont environ 50% d'échantillons positifs (au moins 30 résultats) et 50% d'échantillons négatifs.

Chaque catégorie a été divisée en différents types et les résultats se répartissent de la manière suivante :

Catégories	Types	Positifs*	Négatifs	Total
Produits carnés	crus	14	14	28
	assaisonnés, prêts à cuire	6	5	11
	charcuteries, plats cuisinés, ...	12	18	30
	Total	32	37	69
Produits laitiers	fromages au lait de vache	28	13	41
	fromages au lait de chèvre ou de brebis	6	8	14
	desserts, poudres de lait, laits crus	11	9	20
	Total	45	30	75
Produits de la pêche	filets de poissons frais et crustacés	16	15	31
	poissons fumés	8	6	14
	plats cuisinés à base de poisson	9	12	21
	Total	33	33	66
Produits végétaux	surgelés	6	7	13
	frais ou 4ème gamme	11	13	24
	assaisonnés	13	10	23
	Total	30	30	60
Environnement	eaux diverses	6	7	13
	prélèvements de surface	32	25	57
	résidus	14	6	20
	Total	52	38	90
TOTAL		192	168	360

* il s'agit des résultats positifs par l'une ou l'autre des méthodes

2.1.2 Contaminations artificielles des échantillons et pourcentage

Des contaminations artificielles ont été réalisées à l'aide de souches stressées selon les exigences de la norme EN ISO 16140 et du bureau technique de la validation AFNOR.

62 échantillons ont été artificiellement contaminés et 49 ont donné un résultat positif.

Au total, sur 192 résultats positifs en *Listeria*, 26% ont été obtenus suite à des contaminations artificielles.

2.1.3 Résultats des essais

Les analyses ont été réalisées en simple par les deux méthodes.

Les géloses RAPID *Listeria spp.* ont été lues :

- directement après incubation,
 - et après prolongation de cette incubation pendant 24 heures supplémentaires,
- afin de pouvoir proposer une lecture **dès 22 heures**, mais aussi **jusqu'à 48 heures** d'incubation.

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA (22H) = 187 PA (48H) = 189	Déviations positives (R-/A+) PD = 1	(22H) :188 (48H) :190
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND (22H) = 4 * ND (48H) = 2 *	Accord négatif (A-/R-) NA = 168 **	(22H) :172 (48H) :168
Total	191	169	360

Légende : A+ = positifs confirmés
A- = négatifs immédiats et négatifs après confirmation quand présomptifs positifs
* dont aucun résultat positif non confirmé
** dont deux échantillons douteux, non confirmés

Les tableaux de résultats par catégories d'échantillons figurent ci-dessous :

produits carnés	22 heures		48 heures	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 30	Déviations positives (R-/A+) PD = 0	Accord positif (A+/R+) PA = 31	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 37	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 37

	22 heures	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>produits laitiers</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 44	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

48 heures	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 45	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

	22 heures	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>produits de la pêche</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 33	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 33

48 heures	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 33	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 33

	22 heures	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>produits végétaux</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

48 heures	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Déviati on négative (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

	22 heures	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>prélèvements d'environnement</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 51	Déviati on positive (R-/A+) PD = 1
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 38

48 heures	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 51	Déviati on positive (R-/A+) PD = 1
Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 38

2.1.4 Calcul de l'exactitude relative (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

L'ensemble de ces résultats permet de calculer l'exactitude relative, la sensibilité relative et la spécificité relative pour chacune des catégories et pour l'ensemble des catégories, selon les formules de la norme EN ISO 16140.

Lectures des géloses RLSP après 22 heures d'incubation

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
Produits carnés	30	37	2	0	69	97,1	32	93,8	37	100
Produits laitiers	44	30	1	0	75	98,7	45	97,8	30	100
Pêche	33	33	0	0	66	100	33	100	33	100
Végétaux	29	30	1	0	60	98,3	30	96,7	30	100
Environnement	51	38	0	1	90	98,9	51	100	39	97,4
TOTAL	187	168	4	1	360	98,6	191	97,9	169	99,4

Lectures des géloses RLSP après 48 heures d'incubation

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
Produits carnés	31	37	1	0	69	98,6	32	96,9	37	100
Produits laitiers	45	30	0	0	75	100	45	100	30	100
Pêche	33	33	0	0	66	100	33	100	33	100
Végétaux	29	30	1	0	60	98,3	30	96,7	30	100
Environnement	51	38	0	1	90	98,9	51	100	39	97,4
TOTAL	189	168	2	1	360	99,2	191	99,0	169	99,4

Pour la méthode alternative, les valeurs en pourcentage calculées pour les trois critères suivants selon la norme NF EN ISO 16140 sont :

	22 heures d'incubation	48 heures d'incubation
<i>exactitude relative</i> : AC	98,6 %	99,2 %
<i>spécificité relative</i> : SP	99,4 %	99,4 %
<i>sensibilité relative</i> : SE	97,9 %	99,0 %

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

Le Bureau Technique AFNOR demande que la sensibilité des deux méthodes soit recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
22 heures d'incubation	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,9 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,5 \%$
48 heures d'incubation	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,0 \%$	

2.1.5 Analyse des discordants

Selon l'annexe F de la norme NF EN ISO 16140, le nombre de discordants pour lequel un test statistique doit être réalisé afin de comparer les deux méthodes est de 6.

Ce test statistique n'est donc pas mis en œuvre puisque le nombre de résultats discordants est de 5, obtenus suite à l'incubation de géloses RLSP pendant 22 heures à 37°C.

Les deux méthodes peuvent donc être considérées comme équivalentes.

2.1.6 Commentaires sur la conservation des bouillons Fraser ½ pendant 72 heures

Suite à la conservation des bouillons Fraser ½ pendant 72 heures à 3°C +/- 2°C, des isolements ont été réalisés sur les échantillons positifs testés lors de l'étude d'exactitude.

Les résultats sont équivalents à ceux de la méthode de référence.

2.1.7 Commentaires sur les lectures des géloses RAPID'*L.spp* après 48 heures d'incubation, et après conservation à 3°C +/- 2°C

L'incubation des géloses RAPID'*Listeria spp* jusqu'à 48 heures a changé la nature de deux résultats faux négatifs qui sont devenus positifs concordants avec la méthode de référence.

Et aucune évolution des géloses n'a été observée après conservation de celles-ci pendant 48 heures à 3°C +/- 2°C.

2.2 Niveau de détection relatif

L'objectif de ces essais est de déterminer le niveau de contamination pour lequel moins de 50% des réponses obtenues sont positives et celui pour lequel plus de 50% des réponses obtenues sont positives.

Différents couples 'matrice alimentaire-souche', représentatifs des 5 catégories étudiées, ont été analysés en parallèle avec la méthode de référence et la méthode RAPID'*L.spp*.

Les contaminations artificielles ont été réalisées selon les exigences de la norme EN ISO 16140 et du bureau technique microbiologie.

Les niveaux de détection, calculés selon la méthode de Spearman – Kärber* (LOD₅₀), obtenus pour chaque combinaison « matrice – souche » sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif de la méthode de référence (UFC / 25 g ou 25 mL)	Niveau de détection relatif de la méthode alternative (UFC / 25 g ou 25 mL)
Rillettes	<i>L.welshimeri</i>	0,4 [0,2 – 0,6]	0,4 [0,3 – 0,7]
Lait cru	<i>L.monocytogenes 1/2b</i>	0,8 [0 5 – 1,2]	0,8 [0 5 – 1,2]
	<i>L.ivanovii</i>	0,8 [0 5 – 1,4]	0,8 [0 5 – 1,4]
Saumon fumé	<i>L.monocytogenes 1/2a</i>	0,6 [0,3 – 1,1]	0,6 [0,3 – 1,1]
Chou rouge	<i>L.seeligeri</i>	0,6 [0,4 – 1,0]	0,7 [0,4 – 1,1]
Eau de process	<i>L.innocua</i>	0,9 [0,5 – 1,5]	0,9 [0,5 – 1,5]

* "Hitchins A. Proposed Use of a 50 % Limit of Detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of Presence-Absence Microbial Detection Methods, Draft 10th December, 2003".

Conclusion

Le niveau de détection obtenu pour la méthode alternative est compris entre 0,2 et 1,5 cellules par 25 grammes. Il est identique à celui obtenu pour la méthode de référence.

2.3 Inclusivité / exclusivité

L'inclusivité et l'exclusivité de la méthode sont définies dans la norme EN ISO 16140 par l'analyse, respectivement, de 50 souches positives et de 30 souches négatives.

2.3.1 Inclusivité

Protocole d'essais

Pour chacune des souches de *Listeria*, une culture en bouillon nutritif a été réalisée pendant 24 heures à 30°C. Un bouillon Fraser ½ a été inoculé avec environ 10 *Listeria* par mL et incubé à 30°C, puis étalé – isolé sur gélose RAPID'*Listeria* spp.

Résultats

Les résultats figurent en annexe B.

Les 50 souches de *Listeria* (25 souches de *Listeria monocytogenes* et 25 souches d'autres *Listeria*) ont toutes été mises en évidence après 22 heures d'incubation, sauf une souche de *Listeria ivanovii*. Trois autres souches de cette espèce ont été testées et ont répondu dès 22 heures d'incubation des géloses RAPID'*Listeria* spp..

2.3.2 Exclusivité

2.3.2.1 Etude de validation

Protocole pour l'exclusivité

Les différentes souches négatives ont été cultivées et diluées en bouillon nutritif afin d'obtenir des niveaux d'environ 10⁵ cellules par mL. Un étalement-isolement de 0,1 mL a ensuite été réalisé à partir de ces dilutions préalablement incubées 24 heures à 30°C.

Résultats

Les résultats figurent en annexe B.

Parmi les souches testées en exclusivité, deux souches ont donné des **traces** bleues sur gélose RAPID'*Listeria* spp. mais pas de colonies clairement isolées caractéristiques de *Listeria*, même après 48 heures d'incubation.

Il s'agit :

- 1) d'une souche d'*Enterococcus faecalis*, qui après coloration de Gram n'est pas typique d'une *Listeria*, et qui après spot sur PALCAM ou RAPID'*L.Mono* donne des colonies jaunes, non typiques de *Listeria*.
- 2) d'une souche de *Jonesia denitrificans* qui ne donne aucune colonie après spot sur PALCAM et RAPID'*L.Mono*

Une autre souche d'*Enterococcus faecium* a donné des **colonies bleues après 48 heures d'incubation**, des géloses, ressemblant à des colonies de *Listeria* : les tests de confirmation (coloration de GRAM ou spots sur PALCAM et RAPID'*L.Mono*) se sont révélés négatifs.

Enfin, une souche de *Bacillus* a donné **des colonies bleues après 48 heures d'incubation** des géloses, mais ces colonies n'avaient pas l'aspect typiques de *Listeria* : elles étaient irrégulières à contours crénelés.

Pour ces 4 souches, la méthode alternative dans son ensemble et la méthode de référence ont été réalisées : les souches ont été inoculées dans du bouillon Fraser ½, incubé 24 heures à 30°C, avant étalement-isolement de 0,1mL sur gélose RAPID'*Listeria* spp. et isolement sur géloses PALCAM et gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti. Après 24 heures d'incubation, seule la souche d'*Enterococcus faecium* a donné des colonies sur les différents milieux inoculés, mais ces colonies ne sont pas caractéristiques (jaunes sur PALCAM, bleu marine sur « Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti », bleu marine et très petites sur RAPID'*Listeria* spp.).

2.3.2.2 Essais complémentaires

Objectif

Suite à la demande du bureau technique microbiologie, des essais complémentaires ont été mis en œuvre afin de vérifier la pertinence de l'option 2 de confirmation consistant à réaliser une piqûre sur gélose PALCAM à partir d'une colonie isolée, caractéristique, sur gélose RAPID'*Listeria* spp.

Cette option avait été testée lors de l'étude comparative des méthodes et lors de l'étude interlaboratoire sans présenter de problème particulier. Ces données complémentaires ont servi à statuer définitivement sur la validité de cette option de confirmation.

L'argumentaire en faveur du milieu PALCAM en option de confirmation repose sur :

- l'utilisation des principes sélectifs différents dans les milieux PALCAM et RAPID'*Listeria* spp. : ainsi, les souches de non *Listeria* pouvant présenter une croissance sur RAPID'*Listeria* spp. sont majoritairement inhibées sur PALCAM.
- la mise en évidence de la fermentation du mannitol dans le milieu PALCAM : ce critère supplémentaire permettant de discriminer les souches non *Listeria* et mannitol positif qui pourraient cultiver sur PALCAM, des souches de *Listeria*, mannitol négatif.

Pour réaliser l'étude complémentaire, il s'agissait de vérifier que les souches **susceptibles** de donner des colonies bleues sur RAPID'*Listeria* spp (β -D-glucosidase positive) ne pouvaient pas se développer sur gélose PALCAM et le cas échéant, ne pouvaient pas produire des spots caractéristiques de *Listeria*.

Ces souches sont essentiellement des *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ou autres bactéries lactiques et des *Bacillus*.

Un panel de 36 souches appartenant à ces différents genres a donc été testé afin de compléter l'étude d'exclusivité.

Protocole

Les différentes souches sélectionnées ont été cultivées et diluées en bouillon nutritif. Un isolement sur gélose RAPID'*Listeria* spp et un isolement sur gélose TSAYE ont ensuite été réalisés à partir des cultures obtenues.

Les colonies bleues qui ont été obtenues sur RAPID'*Listeria* spp ou les colonies obtenues sur gélose TSAYE, ont été « spotées » sur gélose PALCAM, incubée 24 heures à 37°C. En parallèle des isolements sur gélose PALCAM ont également été réalisés.

Résultats

Les résultats figurent en annexe B.

La plupart des souches testées ne se développe pas sur gélose RAPID'*Listeria* spp.

Lors de ces essais complémentaires, seules deux souches sur les 36 testées ont donné des colonies sur RAPID'*Listeria* spp :

- 1) une souche d'*Enterococcus faecium*, qui a donné des **colonies bleues après 48 heures d'incubation** des géloses RAPID'*Listeria* spp, ressemblant à des colonies de *Listeria*, et qui après spot sur PALCAM donne des colonies jaunes, non typiques de *Listeria*.
- 2) une souche d'*Enterococcus durans*, qui a donné deux **colonies bleu très clair** (couleur moins franche que pour une colonie de *Listeria*) et qui, et qui après spot sur PALCAM, ne donne aucune colonie.

Des spots sur PALCAM ont également été réalisés à partir des mêmes souches isolées sur TSAYE. Seules quelques souches ont pu se développer sur gélose PALCAM. Aucun spot n'avait un aspect caractéristique de *Listeria*.

3 Etude interlaboratoire

3.1 Organisation

- Nombre de laboratoires participants

15 laboratoires étaient destinataires des échantillons.

- Matrice utilisée

La matrice « lait pasteurisé » a été utilisée pour la réalisation de l'étude interlaboratoire.

- Souche utilisée

La souche utilisée pour les contaminations est une souche de *Listeria innocua* (L64), origine « fromage au lait cru ».

- Nombre d'échantillons par laboratoire

24 échantillons par laboratoire ont été préparés, répartis en 3 niveaux, avec 8 échantillons par niveau.

3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

3.2.1 Taux de contamination obtenus après contamination artificielle

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

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (b/25ml)	taux réel (b/25ml)	Estimation de la limite inférieure de la contamination par 25ml d'échantillon	Estimation de la limite supérieure de la contamination par 25ml d'échantillon
Niveau 0 (L0)	7-8-9-13-14-18-21-24	0	0		
Niveau bas (L1)	3-4-6-11-12-15-19-22	3	3,3	1,9	5,4
Niveau haut (L2)	1-2-5-10-16-17-20-23	30	33,8	28	41

3.2.2 Problèmes de température relevée au cours du transport, température à réception et délais de réception

3.2.2.1 Analyse des courbes de suivi de température au cours du transport

Les courbes de températures obtenues suite à l'exploitation des données des thermoboutons montrent que les températures sont stables au cours du transport et comprises entre -1,6°C et 4,9°C pour l'ensemble des laboratoires.

3.2.2.2 Températures à réception et délais de réception

Les températures obtenues sont reprises dans les tableaux ci-dessous :

Laboratoire	Températures à réception (°C)		Commentaires
	communiquée par le laboratoire	indiquée par le thermobouton	
A	2,5	0,4	/
B	3,0	1,4	/
C	2,7	4,9	/
D	4,0	0,4	/
E	1,2	0,9	Echantillon 4 partiellement congelé
F	1,5	0,4	/
G	5,6	3,4	/
H	3,9	2,9	/
I	12,0	Non réceptionné	Réception à J+2
J	2,0	1,4	/
K	9,4	3,5	/
L	4,0	0,4	/
M	3,5	2,4	/
N	7,0	5,9	/
O	7,0	4,0	/

3.2.2 Conclusion : description des problèmes éventuels rencontrés et motif d'exclusion des laboratoires

Parmi les 15 laboratoires participants, un laboratoire a reçu les échantillons 2 jours après envoi à une température de 12°C. Ses résultats ne sont donc pas exploités.

Le laboratoire E nous a annoncé un échantillon partiellement congelé. Ce paramètre n'a pas eu d'incidence lors de l'exploitation des résultats.

Les résultats de 14 laboratoires à l'issue des conditions relatives au transport ont donc été exploités.

3.3 Résultats des analyses

3.3.1 Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs

Les résultats positifs après confirmation obtenus par les laboratoires collaborateurs sont repris dans les tableaux suivants :

Résultats positifs obtenus par la méthode de référence

Laboratoires	Niveaux de contamination					
	L0		L1		L2	
	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons
Laboratoire A	0	8	8	8	8	8
Laboratoire B	0	8	8	8	8	8
Laboratoire C	0	8	8	8	8	8
Laboratoire D	0	8	8	8	8	8
Laboratoire E	0	8	8	8	8	8
Laboratoire F	0	8	6	8	8	8
Laboratoire G	0	8	8	8	8	8
Laboratoire H	0	8	8	8	8	8
Laboratoire J	0	8	7	8	8	8
Laboratoire K	0	8	8	8	8	8
Laboratoire L	0	8	8	8	8	8
Laboratoire M	0	8	8	8	8	8
Laboratoire N	0	8	8	8	8	8
Laboratoire O	0	8	8	8	8	8
Total	0	112	109	112	112	112
	(a)		(b)		(c)	

Résultats positifs obtenus par la méthode alternative

Laboratoires	Niveaux de contamination					
	L0		L1		L2	
	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons
Laboratoire A	0	8	8	8	8	8
Laboratoire B	0	8	8	8	8	8
Laboratoire C	0	8	8	8	8	8
Laboratoire D	0	8	8	8	8	8
Laboratoire E	0	8	8	8	8	8
Laboratoire F	0	8	4	8	8	8
Laboratoire G	0	8	8	8	8	8
Laboratoire H	0	8	8	8	8	8
Laboratoire J	0	8	7	8	8	8
Laboratoire K	0	8	8	8	8	8
Laboratoire L	0	8	8	8	8	8
Laboratoire M	0	8	8	8	8	8
Laboratoire N	0	8	8	8	8	8
Laboratoire O	0	8	8	8	8	8
Total	0	112	107	112	112	112
	(a)		(b)		(c)	

(a) : faux positif

(b) : vrai positif obtenu au niveau 1

(c) : vrai positif obtenu au niveau 2

3.3.2 Commentaires (discordances par rapport aux résultats attendus, exclusions,... par exemple)

Les résultats de la méthode de référence et de la méthode alternative sont **concordants** pour 13 laboratoires. Parmi ces laboratoires, seul le laboratoire J a retrouvé un échantillon contaminé au faible taux, négatif par les deux méthodes.

Quant au 14^{ème} laboratoire, le laboratoire F, il a retrouvé deux des échantillons contaminés au faible taux, négatifs à la fois par la méthode de référence et par la méthode alternative, et il a également retrouvé deux des échantillons contaminés au faible taux, négatifs par la méthode alternative et positifs par la méthode de référence, mais uniquement après isolement des bouillons Fraser complet.

3.4 Calculs

3.4.1 Calcul des pourcentages de spécificité (%SP) et de sensibilité (%SE) pour les deux méthodes

Les pourcentages de spécificité (SP) et de sensibilité (SE) pour les deux méthodes ont été calculés selon les formules données par la norme EN ISO 16140.

Pour le niveau L0, il est demandé de calculer le pourcentage de spécificité (%SP) de chacune des méthodes :

$$SP = \{1 - (FP/N_-)\} \times 100$$

avec FP, nombre de faux positifs
N₋, nombre total des essais L0

Pour les niveaux L1 et L2, il est demandé de calculer le pourcentage de sensibilité (%SE) de chacune des méthodes, par rapport au nombre de résultats positifs attendus :

$$SE = (TP/N_+) \times 100$$

avec TP, nombre de vrais positifs
N₊, nombre total des essais L1 ou L2

Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	SP/SE	LCL* %	SP/SE	LCL* %
L0	SP% = 100	98	SP% = 100	98
L1	SE% = 97,3	94	SE% = 95,5	93
L2	SE% = 100	98	SE% = 100	98
L1+L2	SE% = 98,7	96	SE% = 97,8	96

* LCL : low critical value, définie par la norme ISO 16140

3.4.2 Calcul de l'exactitude relative (AC)

L'exactitude relative est calculée selon la formule suivante :

$$AC = \{(PA + NA) / N\} \times 100$$

avec PA, nombre d'accords positifs
NA, nombre d'accords négatifs

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 219	Déviaton positive (R-/A+) PD = 0	(N+) = 219
Méthode alternative négative (A-)	Déviaton négative (A-/R+) ND = 2*	Accord négatif (A-/R-) NA = 115*	(N-) = 117
Total	(N+) = 221	(N-) = 115	N = 336

* dont aucun échantillon positif, non confirmé

Dans cette étude, l'exactitude relative est de 99,4%.

3.4.3 Etude des résultats discordants

Selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140, le nombre de discordants au delà duquel un test statistique doit être réalisé afin de comparer les deux méthodes est de 6. Ce test statistique n'est donc pas mis en œuvre puisque deux discordances entre les deux méthodes ont été observées.

3.5 Interprétation

3.5.1 Comparaison des valeurs d'exactitude relative(AC), de spécificité (SP) et de sensibilité (SE)

Les valeurs obtenues dans les deux parties de l'étude de validation sont reportées dans le tableau ci-dessous :

	Etude collaborative	Etude préliminaire
Exactitude relative (AC)	99,4 %	98,6 %
Sensibilité (SE)	98,7 %	97,9 %
Spécificité (SP)	100 %	99,4 %

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

Les valeurs obtenues suite à l'étude collaborative sont du même ordre que celles obtenues lors de l'étude préliminaire pour l'exactitude relative et la spécificité.

La valeur de sensibilité obtenue pour l'étude collaborative, et calculée par rapport aux résultats attendus, est due au fait que quelques échantillons, contaminés au niveau le plus faible, se sont révélés non contaminés.

Le Bureau Technique AFNOR demande que la sensibilité des deux méthodes soit recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (échantillons réellement positifs) :

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
sensibilité	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,1 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100 \%$

3.5.2 Degré d'accord (DA)

Le degré d'accord est le pourcentage de chances de trouver le même résultat pour deux prises d'essai identiques analysées dans le même laboratoire dans des conditions de répétabilité, c'est-à-dire un seul opérateur utilisant le même appareillage et les mêmes réactifs dans l'intervalle de temps le plus court possible.

Pour calculer le degré d'accord, il faut calculer la probabilité que deux échantillons identiques donnent le même résultat, et ceci pour chacun des laboratoires participants, et déterminer ensuite la moyenne des probabilités de l'ensemble des laboratoires.

Les différents tableaux permettant de déduire le degré d'accord figurent en annexe C et les degrés d'accord pour chacune des méthodes, à chacun des niveaux sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	DA % = 100 %	DA % = 100 %
L1	DA % = 96%	DA % = 95 %
L2	DA % = 100 %	DA % = 100 %

Les valeurs sont différentes entre la méthode de référence et la méthode alternative pour le niveau L1 du fait des deux résultats du laboratoire F retrouvés positifs par la méthode de référence et négatifs par la méthode alternative.

3.5.3 Concordance

La concordance est le pourcentage de chances de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents.

Il s'agit donc de calculer le pourcentage de toutes les paires donnant les mêmes résultats sur toutes les paires possibles de résultats.

Les tableaux de résultats permettant de réaliser ces calculs figurent en annexe D et les pourcentages de concordance pour chacune des méthodes et à chacun des niveaux sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	Concordance % = 100 %	Concordance % = 100 %
L1	Concordance % = 94,7 %	Concordance % = 91,2%
L2	Concordance % = 100 %	Concordance % = 100 %

Les valeurs sont différentes entre la méthode de référence et la méthode alternative pour le niveau L1 du fait des deux résultats du laboratoire F retrouvés positifs par la méthode de référence et négatifs par la méthode alternative.

3.5.4 Odds Ratio (COR)

Il est calculé selon la formule suivante :

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

Les odds ratio pour chacune des méthodes et à chacun des niveaux figurent dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode alternative	Méthode de référence
L0	COR % = 1,00	COR % = 1,00
L1	COR % = 1,83	COR % = 1,34
L2	COR % = 1,00	COR % = 1,00

Pour la méthode alternative, la valeur du Odds Ratio est un peu plus élevée pour le niveau L1, du fait des résultats négatifs obtenus par la méthode alternative sur quatre des échantillons contaminés au faible taux, contre deux échantillons pour la méthode de référence.

Une valeur pour le Odds ratio de 1,00 signifie que le degré d'accord et la concordance sont égaux. Plus le Odds ratio est élevé, plus la variation interlaboratoire est prédominante.

4 Praticabilité

La praticabilité est étudiée en fonction des 13 critères définis par le bureau technique en comparant la méthode de référence NF EN ISO 11290-1 à la méthode de recherche de *Listeria* utilisant le milieu RAPID'*L.spp*.

- mode de conditionnement des éléments de la méthode :

Deux modes de conditionnement existent :

- en coffret de 20 boîtes de Petri précoulées
- en déshydraté (une poudre de milieu de base et deux flacons de supplément)

- volumes des réactifs :

- boîtes précoulées : 18 ml par boîte de Petri de Ø 90 mm
- déshydraté (qsp 1L) : 71,5g de poudre , deux flacons de supplément (Suppl1) à reconstituer avec 25 ml d'eau stérile et deux flacons de supplément de 5 mL (suppl 2)

- conditions de stockage :

La température de stockage est indiquée sur les coffrets.

La température de stockage est de 2-8°C pour les boîtes et les suppléments et température ambiante pour la poudre.

- péremption :

Précisions sur les coffret et sur chaque boîte et flacon.

- boîtes précoulées : 3 mois
- poudre : 3 ans + suppléments : 1 an

- modalités d'utilisation après première utilisation :

Les suppléments sont à utiliser extemporanément.

Les boîtes de Pétri réalisées au laboratoire sont à utiliser maximum une semaine après répartition du milieu complet.

- équipements ou locaux spécifiques nécessaires :

Configuration normale et matériel courant d'un laboratoire de microbiologie.

- réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer :

Précisions sur la fiche technique.

Le supplément 1 est à reconstituer avec 25 mL d'eau distillée stérile.

- 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.

- temps réel de manipulation et flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser :

Etapes	Temps moyen pour un échantillon (min)	
	Norme ISO 11 290-1	RAPID' <i>L.spp</i>
Préparation, pesée, dilution en Fraser ½ et broyage	7	7
Transfert du Fraser ½ en Fraser	1	/
Isolement sur géloses sélectives du Fraser ½ et du Fraser	4	/
Étalement isolement sur RLSP	/	1
Lecture des géloses et sélection des colonies à identifier	2	1
Temps total moyen	14 minutes	9 minutes

Ces temps correspondent à des échantillons négatifs pour lesquels aucune confirmation n'est nécessaire

Dans le cas d'échantillons positifs, il faut rajouter le temps nécessaire aux confirmations.

A titre d'exemple, la confirmation de 5 colonies par les tests de la méthode de référence peut être évaluée à environ 21 minutes, sans la préparation des milieux.

Pour la méthode alternative, les confirmations selon ce même protocole nécessite moins de temps : généralement, la confirmation d'une seule colonie caractéristique conduit à un résultat positif.

- délais d'obtention des résultats :

Etapes	Délai obtenu méthode de référence NF EN ISO 11290-1	Délai obtenu méthode RAPID'L.spp
Réalisation du bouillon Fraser ½	J0	J0
Ensemencement du bouillon Fraser	J1	/
Isolement sur géloses sélectives Étalement isolement sur RLSP	J1 et J3	J1
Obtention des résultats négatifs (absence de colonies caractéristiques)	J5	J2
Tests de confirmation :		
<u>Genre</u>		
- Isolement sur TSAYE	J2 à J5	J2
- Gram, catalase	J3 à J6	J2
- Spot sur PALCAM ou RLM		J2
<u>Espèce</u>		
- Camp-test, hémolyse, bouillon TSBYE	J3 à J6	J3
- Utilisation des glucides	J4 à J7	J4
- Spot sur RLM		J2
Obtention des résultats positifs (ou négatifs après confirmation)		
<u>Genre</u>	J3 à J6	J2 à J3
<u>Espèce</u>		
- après confirmation par les tests de la méthode de référence	J9 à J12	J5 à J10
- si tests miniaturisés		J3 à J4
- si spot sur RLM (<i>Listeria monocytogenes</i>)		J3 à J4

- type de qualification de l'opérateur :

niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence

- étapes communes avec la méthode de référence :

étape d'enrichissement en bouillon Fraser ½

confirmations des colonies caractéristiques à partir de l'isolement sur TSAYE

- traçabilité des résultats d'analyse : /

- maintenance par le laboratoire : /

5 Conclusion

L'étude de validation a été réalisée selon le référentiel EN ISO 16140.

L'étude comparative des méthodes a permis d'obtenir des résultats :

- d'exactitude relative, de spécificité relative et de sensibilité relative,
- de niveau de détection relative,
- d'inclusivité et d'exclusivité.

Les performances de la méthode RAPID'*Listeria spp.* sont équivalentes à celles à la méthode de référence NF EN ISO 11290-1 :2005. Elles ont été déterminées par l'analyse de 360 échantillons répartis dans cinq catégories de produits.

L'exactitude relative obtenue est de 98,6%, la sensibilité relative de 97,9% et la spécificité relative de 99,4%, selon les calculs demandés par la norme EN ISO 16140.

5 résultats discordants ont été obtenus : 1 résultat positif supplémentaire et 4 résultats faux négatifs.

Les échantillons positifs par la méthode alternative étant des échantillons positifs confirmés, les sensibilités et spécificités ont été recalculées par rapport à l'ensemble des résultats positifs et sont de :

- 97,9% de sensibilité pour la méthode alternative,
- 99,5% de sensibilité pour la méthode de référence.

Le niveau de détection relatif de la méthode RAPID'*Listeria spp.* et de la méthode de référence a été évalué par contaminations artificielles de cinq produits différents, représentatifs des cinq catégories testées.

Il est compris entre 0,2 et 1,5 cellules de *Listeria* par 25 g ou mL d'échantillon pour les deux méthodes.

La spécificité de la méthode est bonne puisque toutes les souches de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* autres que *monocytogenes* ont été détectées (inclusivité).

Dans l'étude d'exclusivité, 66 souches autres que *Listeria* ont été testées, dont 53 susceptibles de produire des réactions croisées par la méthode RAPID'*Listeria spp.* : seules 6 souches se sont développées sur gélose RAPID'*Listeria spp.* après une culture en bouillon nutritif. Aucune d'entre-elles n'a permis d'observer un spot caractéristique de *Listeria* sur gélose PALCAM.

Les résultats de **l'étude interlaboratoire** obtenus pour l'ensemble des 14 laboratoires retenus montrent que la méthode alternative et la méthode de référence ont des valeurs d'exactitude relative, de spécificité et de sensibilité équivalentes, du même ordre que celles obtenues lors de l'étude préliminaire.

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

Compte-tenu de ces résultats, la validation de la méthode RAPID'*L.spp* a été validée en décembre 2006, sous le numéro BRD 07/12 – 12/06.

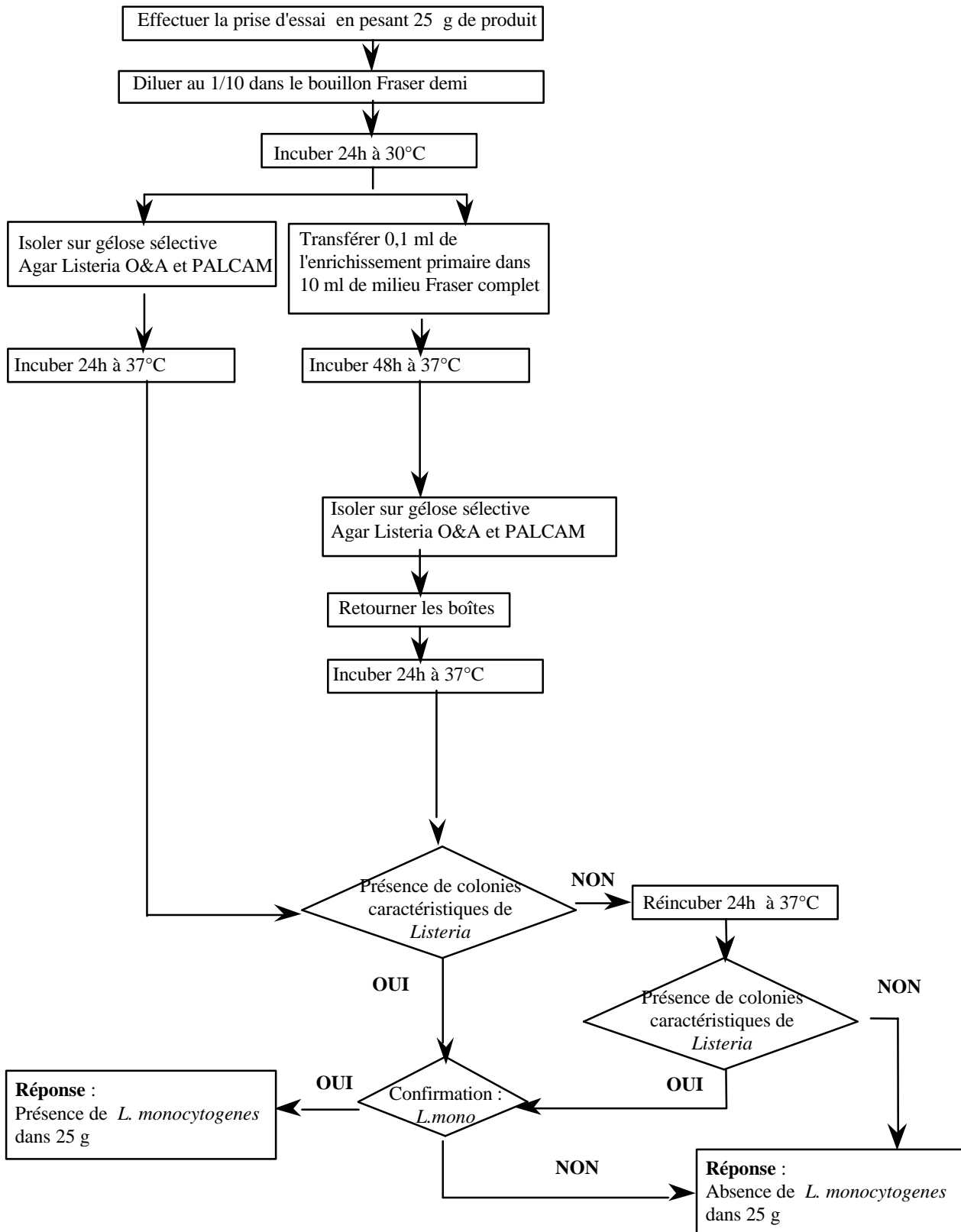
L'option de confirmation par spot sur gélose PALCAM a été acceptée en Mars 2007.

ANNEXES

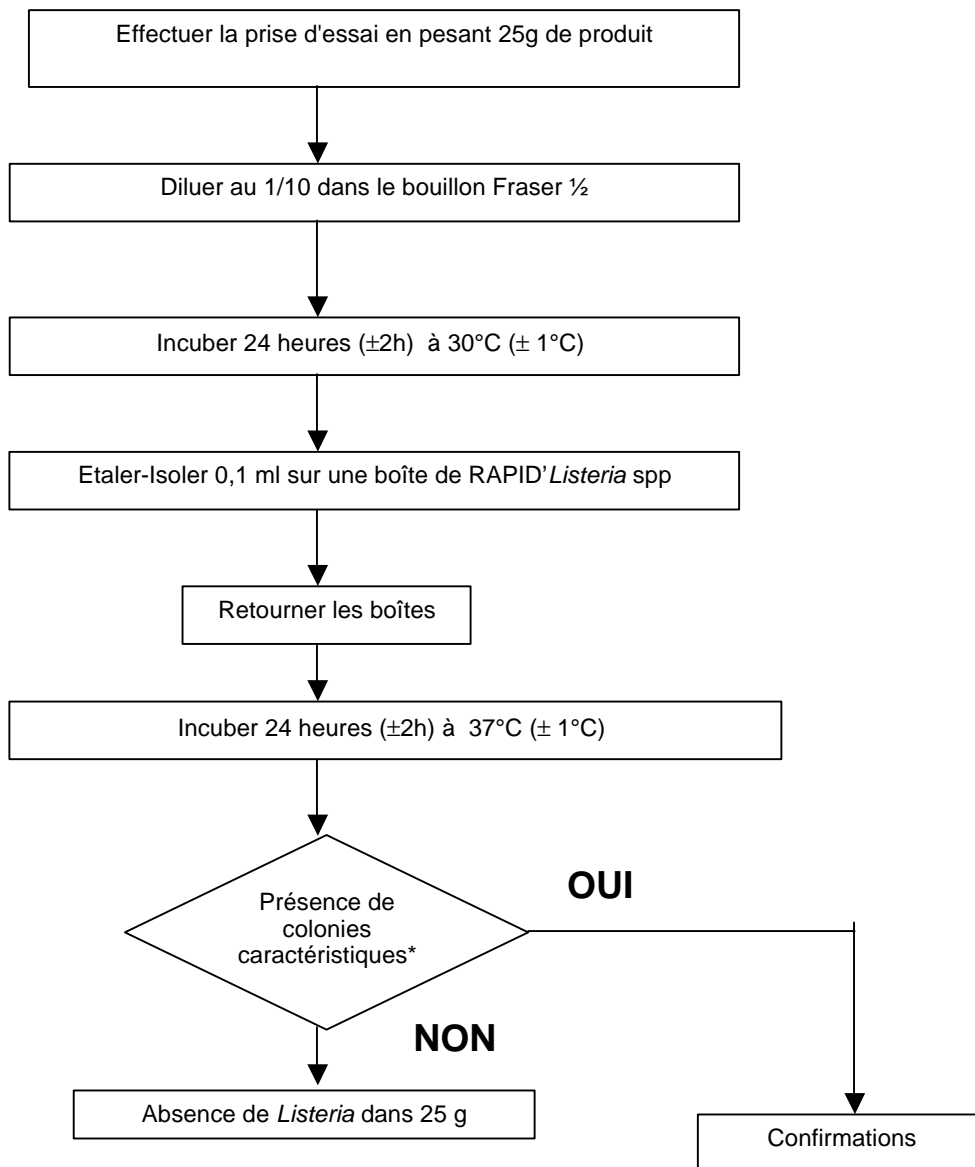
ANNEXE A :

PROTOCOLES ANALYTIQUES

NORME EN ISO 11290-1/A1 : 2005



METHODE RAPID'*LISTERIA* spp



* colonies caractéristiques de *Listeria* : bleues

*NB : la lecture des géloses RAPID'*Listeria* spp est possible jusqu'à 48 heures d'incubation.*

ANNEXE B :

ETUDE D'INCLUSIVITE / EXCLUSIVITE - TABLEAUX DE RESULTATS

Inclusivité

Référence	Souche	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de bouillon Fraser 1/2	Colonies sur RAPID'Lspp après 22 heures d'incubation à 37°C		Résultat
				Couleur	Aspect	
L 143	<i>Listeria grayi</i>	Frites surgelées	4,7E+05	Bleue	Typique	+LA
L 81	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120	81,0	Bleue	Typique	+LA
L 108	<i>Listeria innocua</i>	Gorgonzola	10,3	Bleue	Typique	+MA
L 113	<i>Listeria innocua</i>	Flétan fumé	12,9	Bleue	Typique	+LA
L 3	<i>Listeria innocua</i>	Epoisses	84,0	Bleue	Typique	+MA
L 64	<i>Listeria innocua</i>	Epoisses	8,4	Bleue	Typique	+MA
L 66	<i>Listeria innocua</i>	Epinard	7,4	Bleue	Typique	+MA
L 72	<i>Listeria innocua</i>	Boulettes d'Avesnes	13,8	Bleue	Typique	+MA
L 78	<i>Listeria innocua</i>	Coquelet	10,0	Bleue	Typique	+MA
L 77	<i>Listeria innocua 6 a</i>	Saucisse de Toulouse	7,4	Bleue	Typique	+MA
L 76	<i>Listeria innocua 6 b</i>	Steak haché	1,4	Bleue	Typique	+LA
L 1	<i>Listeria innocua 6a</i>	ATCC 33090	11,0	Bleue	Typique	+MA
L 151	<i>Listeria ivanovii</i>	Steak haché	7,1	Bleue	Typique	+MA
L 153	<i>Listeria ivanovii</i>	Prélèvement environnement	3,1	Bleue	Typique	+MA
L 80	<i>Listeria ivanovii</i>	Collection	80,0	Bleue	Typique	+MA
L185	<i>Listeria ivanovii</i>	Filet anti-oiseaux	6,0	Bleue (48h)	Typique (48h)	+LA (48h)
L 116	<i>Listeria monocytogenes</i>	Coquille de poisson	8,7	Bleue	Typique	+HA
L 123	<i>Listeria monocytogenes</i>	Mozzarella	14,0	Bleue	Typique	+MA
L 39	<i>Listeria monocytogenes</i>	Saucisson sec jambon	12,0	Bleue	Typique	+HA
L 20	<i>Listeria monocytogenes ½</i>	Brisure de Saumon fumé	12,0	Bleue	Typique	+HA
L 25	<i>Listeria monocytogenes ½</i>	Poule	6,0	Bleue	Typique	+MA
L 40	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Munster croûte	9,0	Bleue	Typique	+HA
L 10	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Rillettes	6,0	Bleue	Typique	+MA
L 11	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Munster croûte	7,0	Bleue	Typique	+HA
L 12	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Saumon fumé	8,9	Bleue	Typique	+HA
L 129	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Pommes rissolées	3,3	Bleue	Typique	+LA
L 4	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	ATCC 35152	11,0	Bleue	Typique	+MA
L 44	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Saucisson	1,2	Bleue	Typique	+MA
L 47	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Pommes rissolées	14,7	Bleue	Typique	+MA
L 5	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Saumon fumé	8,3	Bleue	Typique	+MA
L 6	<i>Listeria monocytogenes ½ a</i>	Pizza	7,0	Bleue	Typique	+HA
L 37	<i>Listeria monocytogenes ½ b</i>	Maroilles lait cru	13,4	Bleue	Typique	+MA
L 51	<i>Listeria monocytogenes ½ b</i>	Germain affiné	12,3	Bleue	Typique	+MA
L 117	<i>Listeria monocytogenes ½ c</i>	Saucisse montbéliard	6,7	Bleue	Typique	+MA
L 14	<i>Listeria monocytogenes ½ c</i>	Steak haché	12,0	Bleue	Typique	+MA
L 17	<i>Listeria monocytogenes ½ c</i>	Poitrine	10,8	Bleue	Typique	+MA
L 18	<i>Listeria monocytogenes ½ c</i>	Munster croûte	7,4	Bleue	Typique	+HA
L 53	<i>Listeria monocytogenes ½ c</i>	Steak haché	10,8	Bleue	Typique	+MA
L 61	<i>Listeria monocytogenes 4 e</i>	ATCC 19118	3,2	Bleue	Typique	+LA
L 62	<i>Listeria monocytogenes 4 e</i>	Reblochon	10,6	Bleue	Typique	+MA
L 58	<i>Listeria monocytogenes 4b</i>	Salade	8,0	Bleue	Typique	+MA
L 115	<i>Listeria seeligeri</i>	Eau d'égout	3,7	Bleue	Typique	+LA
L 84	<i>Listeria seeligeri</i>	Steak haché	5,0	Bleue	Typique	+MA
L 83	<i>Listeria seeligeri ½ b</i>	Langue	6,4	Bleue	Typique	+MA
L 100	<i>Listeria welshimeri</i>	Pâte à tartiner	5,8	Bleue	Typique	+MA
L 101	<i>Listeria welshimeri</i>	Jambon à l'ancienne	5,1	Bleue	Typique	+MA
L 91	<i>Listeria welshimeri</i>	Rosette Aoste	9,5	Bleue	Typique	+MA
L 89	<i>Listeria welshimeri 6 a</i>	Steak haché	2,8	Bleue	Typique	+MA
L 86	<i>Listeria welshimeri 6 b</i>	ATCC 35897	11,0	Bleue	Typique	+MA
L 87	<i>Listeria welshimeri 6 b</i>	Steak haché	7,6	Bleue	Typique	+MA

Exclusivité

Référence	Souche	Origine	Taux d'inoculation dans 225mL de bouillon nutritif non sélectif (UFC)	Colonies sur RAPID'Lsp après 22 (48) heures d'incubation à 37°C		Résultat
				Couleur	Aspect	
BA5	<i>Bacillus sphaericus</i>	Produit carné	3,00E+05	∅	∅	-
BA2	<i>Bacillus cereus</i>	Betteraves	3,00E+05	∅	∅	-
BA4	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Produit laitier	2,00E+05	∅	∅	-
BA7	<i>Bacillus coagulans</i>	Collection	5,00E+05	∅	∅	-
15	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	Viande hachée	2,50E+05	∅	∅	-
Le1	<i>Rhodotorula rubra</i>	Pâtisserie	2,00E+05	colonies blanches	non typique	-
Le3	<i>Candida albicans</i>	Collection	9,00E+05	∅	∅	-
Le5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Extrait de café	1,10E+05	∅	∅	-
E1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ovoproduit	3,00E+05	∅ (traînées bleues)	∅ (non typique)	- (coques)
E6	<i>Enterococcus faecalis</i>	Collection ATCC 19433	4,00E+05	∅	∅	-
E2	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection ATCC 3286	3,00E+05	∅	∅	-
E7	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection CIP 5433	6,70E+05	∅ (colonies bleues)	∅ (typique)	- (coques)
L139	<i>Jonesia denitrificans</i>	Collection	1,60E+05	traînées bleues	non typique	-
33	<i>Lactobacillus casei</i>	Produit laitier	2,30E+05	∅	∅	-
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Produit laitier	1,20E+05	∅	∅	-
35	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Produit laitier	2,80E+05	∅	∅	-
LL	<i>Lactococcus lactis</i>	Produit laitier	1,60E+05	∅	∅	-
PS87	<i>Pseudomonas putida</i>	Poisson	1,20E+05	∅	∅	-
PS90	<i>Pseudomonas putida</i>	Poisson	2,30E+05	∅	∅	-
32	<i>Rhodococcus equi</i>	Produit carné	9,00E+05	colonies blanches	non typique	-
R2	<i>Rhodococcus equi</i>	Collection	1,30E+05	∅	∅	-
COR1	<i>Corynebacterium</i>	Collection (695)	6,50E+05	∅	∅	-
COR2	<i>Corynebacterium</i>	Collection (102112)	1,40E+05	∅	∅	-
E3	<i>Streptococcus bovis</i>	Collection	2,30E+05	∅	∅	-
ST3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Yaourt	4,80E+05	∅	∅	-
ST17	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yaourt	2,40E+05	∅ (colonies blanches)	∅ (non typique)	-
ST16	<i>Staphylococcus</i>	Collection	2,80E+05	∅	∅	-
ST21	<i>Staphylococcus</i>	Collection	2,60E+05	∅	∅	-
BA22	<i>Bacillus</i>	Collection	1,10E+05	∅ (colonies bleues)	∅ (non typique)	-
BA23	<i>Bacillus</i>	Collection	8,10E+05	∅	∅	-

Compléments d'exclusivité

Référence	Souche	Taux d'inoculation dans 225mL de bouillon nutritif non sélectif (UFC)	Colonies sur RAPID'Lspp après 22 (48) heures d'incubation à 37°C	Spot sur PALCAM	Colonies sur TSAYE après 22 (48) heures d'incubation à 37°C	Spot sur PALCAM	Colonies caractéristiques de <i>Listeria</i> sur PALCAM après 48 heures d'incubation à 37°C
Lb 2885	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,50E+08	∅	/	+	∅	∅
Lb 120	<i>Lactobacillus delbrurkii bulgar</i>	1,00E+08	∅	/	+	∅	∅
Pd 29358	<i>Pediococcus damnosus</i>	2,30E+08	∅	/	+	∅	∅
Pd 102264	<i>Pediococcus damnosus</i>	3,50E+08	∅	/	+	∅	∅
Lb 9338	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,80E+08	∅	/	+	∅	∅
Lb 11506	<i>Lactobacillus spp</i>	4,80E+07	∅	/	+	∅	∅
Lb 9595	<i>Lactobacillus casei</i>	3,60E+07	∅	/	+	∅	∅
Lc 7056	<i>Lactococcus lactis</i>	1,50E+08	∅	/	+	∅	∅
Str1201	<i>Streptococcus intermedius</i>	6,70E+08	∅	/	++	∅	∅
Str1115	<i>Streptococcus salivarius</i>	8,80E+08	∅	/	++	∅	∅
Str637	<i>Streptococcus bovis</i>	1,50E+07	∅	/	++	∅	∅
Str1068	<i>Streptococcus anginosus</i>	4,80E+07	∅	/	++	∅	∅
Str5623	<i>Streptococcus bovis</i>	3,60E+07	∅	/	++	∅	∅
Str1075	<i>Streptococcus salivarius</i>	1,50E+08	∅	/	++	∅	∅
Str1074	<i>Streptococcus equinus</i>	1,50E+06	∅	/	++	∅	∅
Str611	<i>Streptococcus anginosus</i>	1,50E+08	∅	/	++	∅	∅
E8	<i>Enterococcus durans</i>	4,80E+07	∅	/	++	∅	∅
E9	<i>Enterococcus faecium</i>	3,60E+07	∅ (colonies bleues)	jaune	++	jaune	non (colonies jaunes)
E10	<i>Enterococcus durans</i>	1,50E+08	2 colonies bleu clair minuscules	∅	++	jaune	non (colonies jaunes)
BA1	<i>Bacillus cereus</i>	8,80E+06	∅	/	++	blanc	∅
BA3	<i>Bacillus cereus</i>	5,00E+06	∅	/	++	∅	∅
BA9	<i>Bacillus cereus</i>	5,50E+06	∅	/	++	∅	∅
BA14	<i>Bacillus cereus</i>	5,00E+06	∅	/	++	jaune	∅
BA15	<i>Bacillus cereus</i>	9,80E+06	∅	/	++	∅	∅
BA19	<i>Bacillus cereus</i>	5,00E+06	∅	/	++	blanc	∅
BA21	<i>Bacillus cereus</i>	1,50E+08	∅	/	++	jaune	non (colonies jaunes)
E331	<i>Enterococcus durans</i>	9,50E+07	∅	/	++	∅	∅
E332	<i>Enterococcus durans</i>	1,50E+08	∅	/	++	∅	∅
E19432	<i>Enterococcus durans</i>	1,40E+08	∅	/	++	∅	∅
Str44	<i>Streptococcus bovis</i>	3,20E+08	∅	/	++	∅	∅
BA6452	<i>Bacillus cereus</i>	8,80E+06	∅	/	++	∅	∅
BA11778	<i>Bacillus cereus</i>	5,00E+06	∅	/	++	∅	∅
BA123	<i>Bacillus coagulans</i>	1,00E+07	∅	/	++	∅	∅
Pd240	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4,80E+07	∅	/	++	∅	∅
Pd119	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3,60E+07	∅	/	++	∅	∅
Pd239	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,30E+07	∅	/	++	∅	∅

ANNEXE C :
ETUDE INTERLABORATOIRE
-
DEGRE D'ACCORD

METHODE ALTERNATIVE

Niveau L0

Laboratoire	Nb de négatifs attendus	Nb de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire O	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	4	0,50	0,25	0,50	0,25	0,50
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire O	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,95
Degré d'accord :							95%

Niveau L2

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire O	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

METHODE DE REFERENCE

Niveau L0

Laboratoire	Nb de négatifs attendus	Nb de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire O	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	6	0,75	0,56	0,25	0,06	0,63
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire O	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,96
Degré d'accord :							96%

Niveau L2

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire O	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

ANNEXE D :
ETUDE COLLABORATIVE
-
CONCORDANCE

METHODE ALTERNATIVE

Niveau L0

Laboratoire	Nb de négatifs attendus	Nb de négatifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	832	832
Laboratoire B	8	8	832	832
Laboratoire C	8	8	832	832
Laboratoire D	8	8	832	832
Laboratoire E	8	8	832	832
Laboratoire F	8	8	832	832
Laboratoire G	8	8	832	832
Laboratoire H	8	8	832	832
Laboratoire J	8	8	832	832
Laboratoire K	8	8	832	832
Laboratoire L	8	8	832	832
Laboratoire M	8	8	832	832
Laboratoire N	8	8	832	832
Laboratoire O	8	8	832	832
Total			11648	11648
Concordance	100,00%			

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	792	832
Laboratoire B	8	8	792	832
Laboratoire C	8	8	792	832
Laboratoire D	8	8	792	832
Laboratoire E	8	8	792	832
Laboratoire F	8	4	416	832
Laboratoire G	8	8	792	832
Laboratoire H	8	8	792	832
Laboratoire J	8	7	704	832
Laboratoire K	8	8	792	832
Laboratoire L	8	8	792	832
Laboratoire M	8	8	792	832
Laboratoire N	8	8	792	832
Laboratoire O	8	8	792	832
Total			10624	11648
Concordance	91,21%			

Niveau L2

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	832	832
Laboratoire B	8	8	832	832
Laboratoire C	8	8	832	832
Laboratoire D	8	8	832	832
Laboratoire E	8	8	832	832
Laboratoire F	8	8	832	832
Laboratoire G	8	8	832	832
Laboratoire H	8	8	832	832
Laboratoire J	8	8	832	832
Laboratoire K	8	8	832	832
Laboratoire L	8	8	832	832
Laboratoire M	8	8	832	832
Laboratoire N	8	8	832	832
Laboratoire O	8	8	832	832
Total			11648	11648
Concordance	100,00%			

METHODE DE REFERENCE

Niveau L0

Laboratoire	Nb de négatifs attendus	Nb de négatifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	832	832
Laboratoire B	8	8	832	832
Laboratoire C	8	8	832	832
Laboratoire D	8	8	832	832
Laboratoire E	8	8	832	832
Laboratoire F	8	8	832	832
Laboratoire G	8	8	832	832
Laboratoire H	8	8	832	832
Laboratoire J	8	8	832	832
Laboratoire K	8	8	832	832
Laboratoire L	8	8	832	832
Laboratoire M	8	8	832	832
Laboratoire N	8	8	832	832
Laboratoire O	8	8	832	832
Total			11648	11648
Concordance	100,00%			

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	808	832
Laboratoire B	8	8	808	832
Laboratoire C	8	8	808	832
Laboratoire D	8	8	808	832
Laboratoire E	8	8	808	832
Laboratoire F	8	6	620	832
Laboratoire G	8	8	808	832
Laboratoire H	8	8	808	832
Laboratoire J	8	7	716	832
Laboratoire K	8	8	808	832
Laboratoire L	8	8	808	832
Laboratoire M	8	8	808	832
Laboratoire N	8	8	808	832
Laboratoire O	8	8	808	832
Total			11032	11648
Concordance	94,71%			

Niveau L2

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	832	832
Laboratoire B	8	8	832	832
Laboratoire C	8	8	832	832
Laboratoire D	8	8	832	832
Laboratoire E	8	8	832	832
Laboratoire F	8	8	832	832
Laboratoire G	8	8	832	832
Laboratoire H	8	8	832	832
Laboratoire J	8	8	832	832
Laboratoire K	8	8	832	832
Laboratoire L	8	8	832	832
Laboratoire M	8	8	832	832
Laboratoire N	8	8	832	832
Laboratoire O	8	8	832	832
Total			11648	11648
Concordance	100,00%			