



**Validation de la méthode
iQ-Check™ *Listeria* spp.**

Rapport de synthèse

Etudes comparative et interlaboratoire selon le référentiel
EN ISO 16140

IQLspp - synthèse 2007 v01

Date de validation : 24.05.2007
Numéro d'attestation : BRD 0713 – 05/07

Etude réalisée 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
92 430 MARNES LA COQUETTE

1 Introduction

1.1 Référentiels de validation

La méthode iQ-Check™ *Listeria spp* a été validée intégralement (étude comparative des méthodes et étude collaborative) selon le référentiel EN ISO 16140 :2003.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

1.2.1 Principe

Le test iQ-Check *Listeria spp* repose sur l'amplification génique et les détections par la technique PCR en temps réel. Il utilise des amorces et une sonde d'ADN spécifiques de *Listeria*. Après l'étape d'enrichissement en bouillon spécifique LSB, la lyse des bactéries libère l'ADN bactérien, puis les étapes d'amplification et de détection ont lieu dans un thermocycleur. A l'issue de la réaction, une fluorescence est émise et mesurée directement par le thermocycleur. Le logiciel associé à l'appareil analyse les résultats qui sont visualisés sous forme de courbes à interpréter.

1.2.2 Protocoles

Un bouillon spécifique, le bouillon LSB, a été développé par BIO-RAD pour permettre une meilleure revivification des *Listeria* et l'utilisation d'un protocole de lyse simplifiée s'affranchissant de la première étape de centrifugation.

Les différentes **étapes analytiques** sont les suivantes (protocole en annexe A) :

- Enrichissement
24 heures +/- 2 heures à 30°C en bouillon LSB pour le protocole de lyse standard
25 heures +/- 1 heure à 30°C en bouillon LSB pour le protocole de lyse simplifié
- Lyse des bactéries pour libérer l'ADN bactérien
Deux protocoles de lyse bactérienne sont possibles :
 - 1) Protocole de lyse standard
 - 2) Protocole de lyse simplifié
- Amplification - détection

- Confirmations

Les échantillons positifs à l'issue du test iQ-Check™ *Listeria* spp. sont confirmés :

- 1) selon les tests des méthodes normalisées, après isolement du bouillon d'enrichissement sur géloses sélectives telles que la gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti ou des géloses PALCAM ou Oxford
- 2) par isolement sur gélose RAPID'*Listeria* spp. ou sur gélose RAPID'*L.mono*.

Une option 2 de confirmation est proposée : en cas de présence de colonies caractéristiques sur ces géloses, le résultat iQ-Check™ sera considéré comme confirmé.

La conservation des bouillons LSB pendant au moins 72 heures à 2–8°C avant la réalisation du test iQ check™ *Listeria* spp. a également été vérifiée : les essais ont été faits sur les échantillons positifs de l'étude d'exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative.

1.3 Domaine d'application demandé

Le protocole décrit ci dessus s'applique à tous produits d'alimentation humaine, ainsi qu'aux prélèvements d'environnement.

1.4 Méthode de référence

L'étude de validation a été réalisée par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 11290-1/A1 : 2005 : « Méthode horizontale pour la recherche de *Listeria monocytogenes* », en réalisant l'identification de toutes les espèces de *Listeria* susceptibles de se développer sur les géloses sélectives.

2 Etude comparative

2.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

L'objectif de cette étude est de comparer les deux méthodes :

- la méthode de référence NF EN ISO 11290-1 :2005,
 - la méthode iQ-Check™ *Listeria* spp. (BIO-RAD),
- sur des échantillons contaminés et non contaminés en *Listeria*.

2.1.1 Nombre et nature des échantillons

Un minimum de 60 produits par catégorie ont été analysés, avec environ 50% de produits positifs et 50% de produits négatifs par catégorie, et un minimum de 30 échantillons positifs par catégorie.

Catégories	Types	Positifs*	Négatifs	Total
Produits carnés	crus	26	11	37
	crus et préparés, prêts à cuire	29	6	35
	charcuteries, plats cuisinés, ...	11	13	24
	Total	66	30	96
Produits laitiers	fromages au lait de vache	14	12	26
	fromages au lait de chèvre ou de brebis	9	8	17
	desserts, poudres de lait, laits crus	16	10	26
	Total	39	30	69
Produits de la pêche	filets de poissons frais et crustacés	14	10	24
	poissons fumés	11	9	20
	plats cuisinés à base de poisson	10	11	21
	Total	35	30	65
Produits végétaux	surgelés	12	7	19
	frais ou 4ème gamme	14	14	28
	légumes cuits, préparés	11	10	21
	Total	37	31	68
Environnement	eaux diverses	6	6	12
	prélèvements de surface	19	20	39
	résidus	10	4	14
	Total	35	30	65
TOTAL		212	151	363

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

2.1.2 Contamination artificielle des échantillons et pourcentage

Le mode de contaminations était le suivant : contamination par une souche de *Listeria* ayant subi une combinaison de cycles de chauffage et de réfrigération ou congélation

Le stress a été évalué en calculant la différence en log obtenue entre le dénombrement sur gélose TSAYE et le dénombrement obtenu sur gélose PALCAM. Cette différence devait être d'au minimum 0,5 log.

Neuf souches de *Listeria monocytogenes* d'origine et de sérotype différents ont été utilisées pour réaliser ces contaminations artificielles.

Au total, 30 résultats positifs sur 212 résultats positifs en *Listeria*, ont été obtenus suite à des contaminations artificielles, soit 14 %.

2.1.3 Résultats des essais

Les résultats obtenus pour les 363 échantillons analysés se répartissent de la manière suivante.

Les résultats sont identiques avec les deux protocoles de lyse testés :

- 1) bouillon LSB incubé 22 heures et protocole de lyse standard
- 2) bouillon LSB incubé 24 heures et protocole de lyse simplifié

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 177	Déviations positives (R-/A+) PD = 22	199
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 13 ⁽¹⁾	Accord négatif (A-/R-) NA = 151 ⁽²⁾	164
Total	190	173	363

Légende :

A+ = positifs confirmés

A- = négatifs immédiats et négatifs après confirmation quand présomptifs positifs

(1) : dont 2 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatif après confirmation

(2) : dont 8 échantillons présumés positifs par la méthode alternative avec le protocole de lyse standard, négatifs après confirmation et dont 6 échantillons présumés positifs par la méthode alternative avec le protocole de lyse simplifié, négatifs après confirmation

Les mêmes tableaux de résultats par catégories d'échantillons figurent en annexe B.

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

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.

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	52	30	5	9	96	85,4	57	91,2	39	76,9
Produits laitiers	33	30	3	3	69	91,3	36	91,7	33	90,9
Pêche	29	30	0	6	65	90,8	29	100	36	83,3
Végétaux	31	31	3	3	68	91,2	34	91,2	34	91,2
Environnement	32	30	2	1	65	95,4	34	94,1	31	96,8
TOTAL	177	151	13	22	363	90,4	190	93,2	173	87,3

L'ensemble de ces résultats permet de calculer les trois critères suivants pour la méthode alternative :

<i>exactitude relative</i> : AC	90,4 %
<i>spécificité relative</i> : SP	87,3 %
<i>sensibilité relative</i> : SE	93,2 %

D'après les calculs suivants imposés par le Bureau technique, la **sensibilité** a été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
<i>Protocole de lyse standard et protocole de lyse simplifiée</i>	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = \mathbf{93,9 \%}$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = \mathbf{89,6 \%}$

2.1.5 Analyse des discordances

2.1.4.1 Test statistique

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 est mis en œuvre pour la méthode iQ Check™ *Listeria spp.*, puisque le nombre de résultats discordants est de 35 quel que soit le protocole de lyse utilisé.

Rappel : les deux méthodes utilisent un bouillon d'enrichissement différent et le pourcentage d'échantillons naturellement contaminés est important (86%), facteurs influençant fortement le nombre de résultats discordants.

Lorsque le nombre de résultats discordants est supérieur à 22, il s'agit d'utiliser le test de McNemar avec la distribution du χ^2 pour un degré de liberté.

Il s'agit de déterminer $d = |PD - ND|$ et de comparer d à une valeur de d minimale définie pour chaque nombre de résultats discordants. Les deux méthodes seront considérées comme différentes si $d \geq d$ minimal (Annexe F).

	Nombre de résultats discordants	d minimal	d	Conclusion
	35	12	$22 - 13 = 9$	Equivalence

La méthode alternative est équivalente à la méthode de référence.

2.1.6 Commentaires sur les inhibitions

- 5 résultats inhibés après test iQ Check™ *Listeria spp.* à partir de l'ADN pur ont été observés avec le protocole de lyse standard :
 - 2 produits carnés, négatifs
 - 2 produits laitiers, dont un négatif et un positif,
 - 1 produit de la pêche négatif
- 1 résultat inhibé après test iQ Check™ *Listeria spp.* à partir de l'ADN pur a été observé avec le protocole de lyse simplifié, pour un prélèvement d'environnement positif.

Toutes ces inhibitions ont été levées en diluant l'ADN au 1/10 avant réalisation du test et les résultats étaient tous conformes à ceux attendus (pas de résultat devenant faux négatif notamment).

2.1.7 Commentaires sur le protocole de confirmation

L'isolement du bouillon LSB sur géloses RAPID'*Listeria spp.* et RAPID'*L.mono* a toujours permis de retrouver les *Listeria* (hormis le cas particulier des résultats faux positifs, ne contenant pas de *Listeria*).

Dans un cas (brochettes de saumon frais), les *Listeria monocytogenes* n'ont pas été retrouvées sur gélose RAPID'*L.mono*, même après repiquage du bouillon LSB en bouillon Fraser. Par contre, ces *Listeria monocytogenes* ont été retrouvées sur gélose RAPID'*Listeria spp.*

Parmi les échantillons positifs, certains échantillons ne sont pas positifs en méthode de référence pour les mêmes souches que celles identifiées en méthode alternative :

- 13 échantillons ne sont positifs en méthode de référence que pour une des deux souches retrouvées en méthode alternative et parmi ces 13 échantillons, *Listeria monocytogenes* n'a pas été retrouvée à 6 reprises.
- 7 échantillons ne sont positifs en méthode alternative que pour une des deux souches retrouvées en méthode de référence et parmi ces 7 échantillons, *Listeria monocytogenes* a été mise en évidence à 6 reprises.
- 2 échantillons sont positifs en méthode alternative pour *Listeria monocytogenes*, alors qu'ils sont positifs en méthode de référence pour une autre *Listeria*.

2.1.8 Commentaires sur la conservation des bouillons LSB à 2-8°C pendant 72 heures

Les bouillons LSB ont été conservés 72 heures à 2-8°C et un second test iQ Check™ *Listeria spp.* a été réalisé.

Quelques résultats sont différents :

Résultats faux positifs :

- un produit carné et trois produits de la pêche, négatifs, deviennent faux positifs

Résultats positifs supplémentaires :

- un résultat négatif pour un échantillon de saumon fumé, qui était concordant négatif, devient positif supplémentaire en *Listeria innocua*.

Inhibitions :

- un test iQ Check™ *Listeria spp.* présente une inhibition, alors que le résultat était positif en ADN pur lorsque le test avait été réalisé directement après incubation du bouillon LSB,
- l'échantillon de lait cru ne présente plus d'inhibition en protocole de lyse standard.

Globalement, les résultats sont comparables à ceux obtenus lorsque le test est réalisé directement après incubation.

Il est à noter qu'aucun résultat faux négatif n'est obtenu suite à la conservation du bouillon LSB.

2.2 Niveau de détection relatif de la méthode iQ-Check™ *Listeria spp.* et de la méthode de référence

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' ont été étudiés en parallèle avec la méthode de référence et la méthode iQ-Check™ *Listeria spp.*, pour cinq catégories.

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 artisanales	<i>L.welshimeri</i>	0,4 [0,2 – 0,6]	0,3 [0,2 – 0,5]
lait cru	<i>L.monocytogenes</i> 1/2b	0,7 [0,4 – 1,3]	0,9 [0,6 – 1,5]
mélange de crudités 4 ^{ème} gamme	<i>L.seeligeri</i>	0,6 [0,3 – 0,9]	0,7 [0,3 – 1,4]
saumon fumé	<i>L.monocytogenes</i> 1/2a	0,6 [0,3 – 1,1]	0,6 [0,3 – 1,2]
eau de process	<i>L.innocua</i> 1/2c	0,6 [0,4 – 1,1]	0,6 [0,3 – 1,1]

Les résultats iQ-Check sont identiques quel que soit le protocole de lyse utilisé.

Conclusion

Le niveau de détection obtenu pour la méthode alternative avec le bouillon LSB est compris entre 0,2 et 1,5 cellules par 25 grammes, contre 0,2 et 1,3 cellules par 25 grammes pour la méthode de référence.

* "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".

2.3 Inclusivité / exclusivité

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

2.3.1 Protocoles d'essai

2.3.1.1 Protocole pour l'inclusivité

Pour chacune des souches de *Listeria*, une culture en bouillon nutritif a été réalisée. Un bouillon LSB a ensuite été inoculé avec environ 10 *Listeria* par 225 mL et incubé à 30°C. Le protocole de lyse simplifié et le test iQ-Check™ *Listeria spp* ont ensuite été réalisés.

2.3.1.2 Protocole pour l'exclusivité

Les différentes souches négatives ont été cultivées en bouillon nutritif pendant 24 heures à 30°C,ensemencées dans 10 ml de bouillon nutritif afin d'obtenir des niveaux d'environ 10⁵ cellules par ml, puis incubées pendant 24 heures à 30°C avant réalisation du protocole de lyse simplifié et du test iQ-Check™ *Listeria spp*.

2.3.2 Résultats et conclusion

Les résultats figurent en annexe C.

Les **50** souches de *Listeria monocytogenes* et les **34** souches de *Listeria autres que monocytogenes* ont toutes été mises en évidence. Le test iQ-Check™ *Listeria spp* est bien spécifique des *Listeria*.

Les **32** souches d'autres genres ont répondu négativement au test iQ-Check™ *Listeria spp*. Aucune réaction croisée n'a été observée.

3 Etude interlaboratoire

L'étude collaborative a comme objectif de déterminer la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires analysant des échantillons identiques.

Les laboratoires participant ont réalisé l'analyse selon la méthode iQ-Check™ *Listeria spp*. (protocole en bouillon LSB et lyse simplifiée) et selon la méthode de référence.

3.1 Organisation

- Nombre de laboratoires participants

13 laboratoires étaient destinataires des échantillons.

- Matrice utilisée

La matrice « lait pasteurisé » a été utilisée pour la réalisation de l'étude interlaboratoire. La flore naturelle présente dans la matrice est de l'ordre 10 cellules par mL.

- Souche utilisée

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

- Nombre d'échantillons par laboratoire

48 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 dans la matrice 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	1-2-3-10 11-12-19-20	0	0		
Niveau bas	4-5-6-13 14-15-21-22	3	3,7	0,8	10,7
Niveau haut	7-8-9-16 17-18-23-24	30	34	24	47

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

Les températures à réception obtenues par les laboratoires variaient de 2,1°C à 4,7°C pour les laboratoires ayant réceptionné leurs échantillons à J+1.

Elles étaient conformes aux exigences (entre 0°C et 8°C) pour 11 laboratoires.

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 0,1°C et 4,7°C pour les laboratoires ayant réceptionné les échantillons à J+1.

3.2.3 Résultats et conclusion : description des problèmes éventuels rencontrés et motif d'exclusion des laboratoires

11 laboratoires ont reçu les échantillons le lendemain de leur envoi.

Deux laboratoires ont réceptionné les échantillons 48 heures après envoi. Les températures à réception étaient supérieures à 8°C. Ces laboratoires ont réalisés les analyses, mais leurs résultats ne sont pas introduits dans les calculs.

Un autre laboratoire avait annoncé une température à réception supérieures à 15°C. L'analyse de la température pendant le transport et à réception montre une température comprise entre 0,1°C et 3,6°C. Ses résultats ont été exploités.

Parmi les 13 laboratoires participants, il a été donc possible d'analyser les résultats de 11 d'entre-eux à l'issue des conditions relatives au transport.

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	6	8	8	8
Laboratoire C	0	8	8	8	8	8
Laboratoire D	0	8	8	8	8	8
Laboratoire E	0	8	7	8	8	8
Laboratoire F	0	8	8	8	8	8
Laboratoire G	0	8	8	8	8	8
Laboratoire H	0	8	8	8	8	8
Laboratoire I	0	8	8	8	8	8
Laboratoire J	0	8	8	8	8	8
Laboratoire K	0	8	8	8	8	8
Laboratoire L	0	8	7	8	8	8
Laboratoire M	0	8	8	8	8	8

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	6	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	8	8	8	8
Laboratoire G	0	8	8	8	8	8
Laboratoire H	0	8	8	8	8	8
Laboratoire I	0	8	8	8	8	8
Laboratoire J	0	8	8	8	8	8
Laboratoire K	0	8	7	8	8	8
Laboratoire L	0	8	8	8	8	8
Laboratoire M	0	8	8	8	8	8

En grisé : laboratoires n'ayant pas reçu les échantillons dans les délais

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

Parmi les résultats des 11 laboratoires retenus, les résultats de la méthode de référence et de la méthode alternative sont **concordants** pour **8** laboratoires : ils retrouvent les 8 échantillons non contaminés, négatifs et les 16 échantillons contaminés, positifs.

Deux **laboratoires** ont retrouvé un des échantillons contaminés au faible taux, négatif par la méthode de référence et positif par la méthode alternative pour un des laboratoires, et inversement pour le deuxième laboratoire. Ces résultats sont toutefois cohérents car les flacons destinés à la méthode de référence étaient différents de ceux destinés à la méthode alternative puisque les premiers milieux d'enrichissement sont différents dans les deux méthodes.

Un troisième laboratoire a obtenu un résultat positif non confirmé sur un échantillon non contaminé, à une valeur de Ct plus élevée que celle obtenue pour les échantillons contaminés. Il a donc retesté l'extrait d'ADN qui s'est révélé négatif.

Un dernier **laboratoire** a retrouvé 6 des 8 échantillons non contaminés positifs par le test iQ Check™ *Listeria* spp. Le laboratoire a réalisé les extractions et les tests une seconde fois sur les échantillons non contaminés à la demande du laboratoire expert et les résultats obtenus étaient tous positifs, de même que le contrôle négatif. Il est tout de même à noter que les isollements du bouillon LSB n'ont pas permis de retrouver de *Listeria*, et que par conséquent, les résultats après confirmation sont conformes à ceux attendus. Néanmoins, compte-tenu des difficultés rencontrées dans la mise en œuvre de la méthode alternative, ses résultats ont été **exclus**.

Enfin, les résultats des deux laboratoires ayant reçu les échantillons 48 heures après leur envoi ne sont pas intégrés dans les calculs ci-dessous, mais nous pouvons constater qu'ils sont cohérents par rapport à l'ensemble des résultats des laboratoires :

- Un laboratoire a obtenu deux résultats négatifs sur des échantillons non contaminés dans chacune des méthodes et deux résultats positifs non confirmés
- l'autre laboratoire a retrouvé un des échantillon contaminé au faible taux, négatif uniquement par la méthode de référence. Ses autres résultats sont conformes aux résultats attendus.

Niveaux	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités *	Nombre de résultats négatifs		Nombre de résultats positifs	
				Référence	Alternative	Référence	Alternative
0	104	104	80	80	80	0	0
1	104	104	80	1	1	79	79
2	104	104	80	0	0	80	80

* deux laboratoires n'ont pas reçu les échantillons dans les délais et un laboratoire a été exclus suite à des problèmes de manipulation

3.4 Calculs

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

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

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

avec FP, nombre de faux positifs
N-, nombre total de tous les essais L0

Pour les niveaux L1 et L2, il est demandé de calculer le pourcentage de sensibilité de chacune des méthodes :

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

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

Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous :

	Méthode de référence		Méthode alternative	
		LCL*		LCL*
Niveau L0	SP = 100%	98%	SP = 100%	98%
Niveau L1	SE = 98,8%	96%	SE = 98,8%	96%
Niveau L2	SE = 100%	98%	SE = 100%	98%
Niveaux L1 et L2	SE = 99,4%	97%	SE = 99,4%	97%

* LCL : low critical limit

3.4.2 Calcul de l'exactitude relative (AC), exprimée en pourcentage

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 = 158	Déviaton positive (R-/A+) PD = 1	(N+) = 159
Méthode alternative négative (A-)	Déviaton négative (A-/R+) ND = 1*	Accord négatif (A-/R-) NA = 80**	(N-) = 81
Total	(N+) = 159	(N-) = 81	N = 240

* dont aucun résultat positif, non confirmé

** dont 1 résultat positif, non confirmé

Dans cette étude, l'exactitude relative est de 99,2%.

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 2 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 interlaboratoire	Etude préliminaire (protocole utilisé dans l'étude interlaboratoire)
Exactitude relative (AC)	99,2 %	90,4 %
Sensibilité (SE)	98,8 %	93,2 %
Spécificité (SP)	100 %	87,3 %

Les valeurs obtenues suite à l'étude collaborative sont plus élevées que celles obtenues lors de l'étude préliminaire pour l'exactitude relative et la spécificité, ce qui est cohérent puisqu'une seule matrice artificiellement contaminée est étudiée.

Les résultats obtenus lors de l'étude comparative s'expliquent par le fait que les deux méthodes utilisent un bouillon d'enrichissement différent et que le pourcentage d'échantillons naturellement contaminés qui ont été testés est important (86%).

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	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = \mathbf{99,4 \%}$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = \mathbf{99,4 \%}$

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 D et les degrés d'accord pour chacune des méthodes, à chacun des niveaux sont repris dans le tableau ci-dessous :

	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau L0	DA = 100%	DA = 100%
Niveau L1	DA = 98%	DA = 98%
Niveau L2	DA = 100%	DA = 100%

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 E et les pourcentages de concordance pour chacune des méthodes et à chacun des niveaux sont repris dans le tableau ci-dessous :

	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau L0	Concordance = 100%	Concordance = 100%
Niveau L1	Concordance = 97,5%	Concordance = 97,5%
Niveau L2	Concordance = 100%	Concordance = 100%

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 :

	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau L0	COR = 1,00	COR = 1,00
Niveau L1	COR = 1,15	COR = 1,15
Niveau L2	COR = 1,00	COR = 1,00

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 à la méthode IQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (BIO-RAD).

Les critères définis par l'AFNOR sont renseignés ci-dessous :

<p>1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode (cf notice) 2. Volume des réactifs (cf notice et emballage des flacons)</p>	<p>Le kit contient la quantité de réactif nécessaire pour 96 analyses :</p> <ul style="list-style-type: none"> - un flacon de réactif de lyse (20 mL) - un flacon de billes de lyse - un tube de sondes fluorescentes (0,55 mL) - deux tubes de solution d'amplification (2 x 2,2 mL) - un tube de contrôle PCR négatif (0,5 mL) - un tube de contrôle PCR positif (0,25 mL)
<p>3. Condition de stockage des éléments (cf notice) – Péréemption des produits non ouverts (cf notice)</p>	<p>Le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé entre +2°C et +8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péréemption indiquée sur le tube</p> <p>La validité du kit est d'environ 1 an.</p>
<p>4. Modalités d'utilisation après première utilisation (cf notice)</p>	<p>Chaque réactif doit être conservé entre +2°C et +8°C.</p> <p>Le mélange réactionnel, obtenu en mélangeant la solution d'amplification et les sondes fluorescentes peut être conservé pendant 1h à 2 – 8°C après préparation. Le réactif de lyse reconstitué (tampon de lyse + billes de lyse) peut être conservé 6 mois à 2 – 8°C.</p>
<p>5. Equipements ou locaux spécifiques nécessaires (cf notice)</p>	<p>Equipement nécessaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Etuve à 30°C - Agitateur vibrant - Bloc chauffant (95-100°C), pour tubes coniques - Centrifugeuse de paillasse (max.10.000 à 12.000g) - Thermocycleur iCycler avec module optique et iCycler iQ® ou système Chromo4™ <p>Locaux :</p> <p>4 zones distinctes de travail sont recommandées : une pour l'extraction des acides nucléiques, une réservée à la préparation du mélange réactionnel, une pour la distribution des ADN extraits sur la plaque PCR et une quatrième dédiée à l'amplification et détection.</p>
<p>6. Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (cf notice)</p>	<p>Tous les réactifs sont prêts-à-l'emploi, exceptés :</p> <ul style="list-style-type: none"> - le mélange réactionnel, qui est obtenu en mélangeant la solution d'amplification et les sondes fluorescentes - le réactif de lyse qui est additionné de billes de lyse
<p>7. Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode</p>	<p>Deux jours pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie et de PCR sont nécessaires. Pour des techniciens non formés à la technique PCR, une formation initiale de 4 à 5 jours paraît nécessaire.</p> <p>Pour l'exploitation des résultats, des contacts ponctuels avec Bio-Rad pour l'interprétation des résultats sont recommandés.</p>

8. Temps réel de manipulation – Flexibilité de la méthode par rapport au nombre d'échantillons à analyser

Etapas	Temps moyen pour un échantillon (min)		Temps moyen pour 48 échantillon (min)			
	Norme	iQ-Check™	Norme	iQ-Check™		
Préparation, pesée, dilution en bouillon d'enrichissement et broyage	7	7	120	120		
Transfert du Fraser ½ en Fraser	1		30			
Réalisation du test iQ-Check™ : - centrifugations - lyse - transfert en tube PCR, - programmation du logiciel		Lyse standard 10	Lyse simplifiée 7	Lyse standard 120 Lyse simplifiée 80		
Isolement sur géloses sélectives du Fraser ½ et du Fraser	2		40			
Lecture des géloses et sélection des colonies à identifier	2		20			
Interprétation des résultats		1		10		
Total	12 (0h12)	18 (0h18)	15 (0h15)	210 (3h30)	260 (4h10)	210 (3h30)

L'intérêt de la méthode réside notamment dans la possibilité de trier les échantillons négatifs des échantillons suspects et d'alléger ainsi les confirmations.

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 utilisant l'option 2 de confirmation, les confirmations nécessitent moins de temps : l'isolement sur gélose *RAPID>Listeria spp* ou *RAPID'L.mono* suffit en général à confirmer le résultat du test iQ-Check™ *Listeria spp* pour la présence du genre *Listeria*.

9. Délai d'obtention des résultats

échantillons négatifs :

<u>Etapas</u>	<u>Délai obtenu</u> <u>méthode de référence</u> <u>NF EN ISO 11290-1/A1</u>	<u>Délai obtenu</u> <u>méthode</u> <u>iQ-Check™ L.spp.</u>
Réalisation du bouillon d'enrichissement	J0	J0
Ensemencement du bouillon Fraser	J1	/
Réalisation du test iQ-Check™		J1
Isolement de 10 µl sur géloses sélectives	J1 et J3	
Obtention des résultats négatifs - si aucune colonie caractéristique - si confirmations de <i>Listeria non monocytogenes</i> - si test positif et confirmation négative	J5 J9 à J11	J1 J2* à J11**

* si isolement sur *RAPID'L.mono* ou *RAPID>Listeria spp*

** si confirmation par tests classiques décrits dans NF EN ISO 11290-1/A1

échantillons positifs :

Étapes	Délai obtenu méthode de référence NF EN ISO 11290-1/A1	Délai obtenu méthode iQ-Check™ <i>L.spp.</i>
Réalisation du bouillon d'enrichissement	J0	J0
Ensemencement du bouillon Fraser	J1	/
Réalisation du test iQ-Check™ <i>Lspp</i> Isolement sur géloses sélectives	J1 et J3	J1 J1
Tests de confirmation : <u>Genre</u> - Isolement sur TSAYE - Gram, catalase - Lecture RAPID' <i>Listeria spp</i> ou RAPID' <i>L.mono</i>	J2 à J5 J3 à J6	J2 J2 J2
<u>Espèce</u> - Camp-test, hémolyse, bouillon TSBYE - Utilisation des glucides	J3 à J6 J4 à J7	J3 J4
Obtention des résultats positifs		
<u>Genre</u>	J3	J2
<u>Espèce</u> - après confirmation par les tests de la méthode de référence - si tests miniaturisés - Pour <i>Listeria monocytogenes</i> , test iQ-Check™ <i>L.monocytogenes</i>	J9 à J11 J4 à J7	J9 J3 à J4 J1 à J2

10. Type de qualification de l'opérateur	L'utilisateur doit être formé aux bonnes pratiques de laboratoire de microbiologie alimentaire et de biologie moléculaire.
11. Étapes communes avec la méthode de référence	Aucune
12. Traçabilité des résultats d'analyse	L'ensemble des résultats est sauvegardé sous forme de fichiers informatiques. Les résultats peuvent être repris dans des tableurs ou des LIMS.
13. Maintenance par le laboratoire	Il est recommandé de vérifier l'alignement du masque dans le logiciel à des intervalles réguliers de 6 mois, et de refaire l'alignement lors d'un déplacement du thermocycleur iCycler iQ. Un contrat de maintenance et une assistance téléphonique client sont à la disposition des utilisateurs du iCycler iQ ou du système Chromo4.

5 Conclusion

L'étude de validation a été réalisée selon le référentiel EN ISO 16140 :2003.

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.

Deux protocoles de lyse ont été testés après un enrichissement en bouillon LSB sur l'ensemble des catégories alimentaires et les prélèvements d'environnement : un protocole de lyse standard et un protocole de lyse simplifié.

Les résultats sont identiques quel que soit le protocole de lyse.

Les performances de la méthode iQ-Check™ *Listeria spp.* sont équivalentes à celles à la méthode de référence NF EN ISO 11290-1/A1 : 2005. Elles ont été déterminées par l'analyse de 363 échantillons répartis dans cinq catégories de produits.

L'exactitude relative obtenue est de 90,4%, la **sensibilité relative** de 93,2% et la **spécificité relative** de 87,3%, selon les calculs demandés par la norme EN ISO 16140.

35 résultats discordants ont été obtenus : 22 résultats positifs supplémentaires et 13 résultats faux négatifs.

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

- 93,9% de sensibilité pour la méthode alternative,
- 89,6% de sensibilité pour la méthode de référence.

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

Le niveau de détection obtenu pour la méthode alternative avec le bouillon LSB est compris entre 0,2 et 1,5 cellules par 25 grammes, contre 0,2 et 1,3 cellules par 25 grammes pour la méthode de référence.

Les résultats de l'étude **d'inclusivité** sont satisfaisants puisque les 84 souches de *Listeria* testées ont toutes été détectées. Dans l'étude **d'exclusivité**, aucune réaction croisée n'a été observée avec les 34 souches d'autres genres testées.

Les résultats de **l'étude interlaboratoire** obtenus pour l'ensemble des 10 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.

L'intérêt de la méthode réside notamment dans la possibilité de trier les échantillons négatifs des échantillons suspects et d'alléger ainsi les confirmations. De plus, les temps de manipulations sont réduits par rapport à la méthode de référence, dans le cas de séries d'échantillons.

Les délais d'obtention des résultats négatifs sont également intéressants : 24 heures pour un résultats négatif et à partir de 48 heures pour un résultat positif s'il est confirmé sur gélose RAPID® *Listeria spp* ou RAPID® *L.mono* contre 5 à 11 jours pour la méthode de référence.

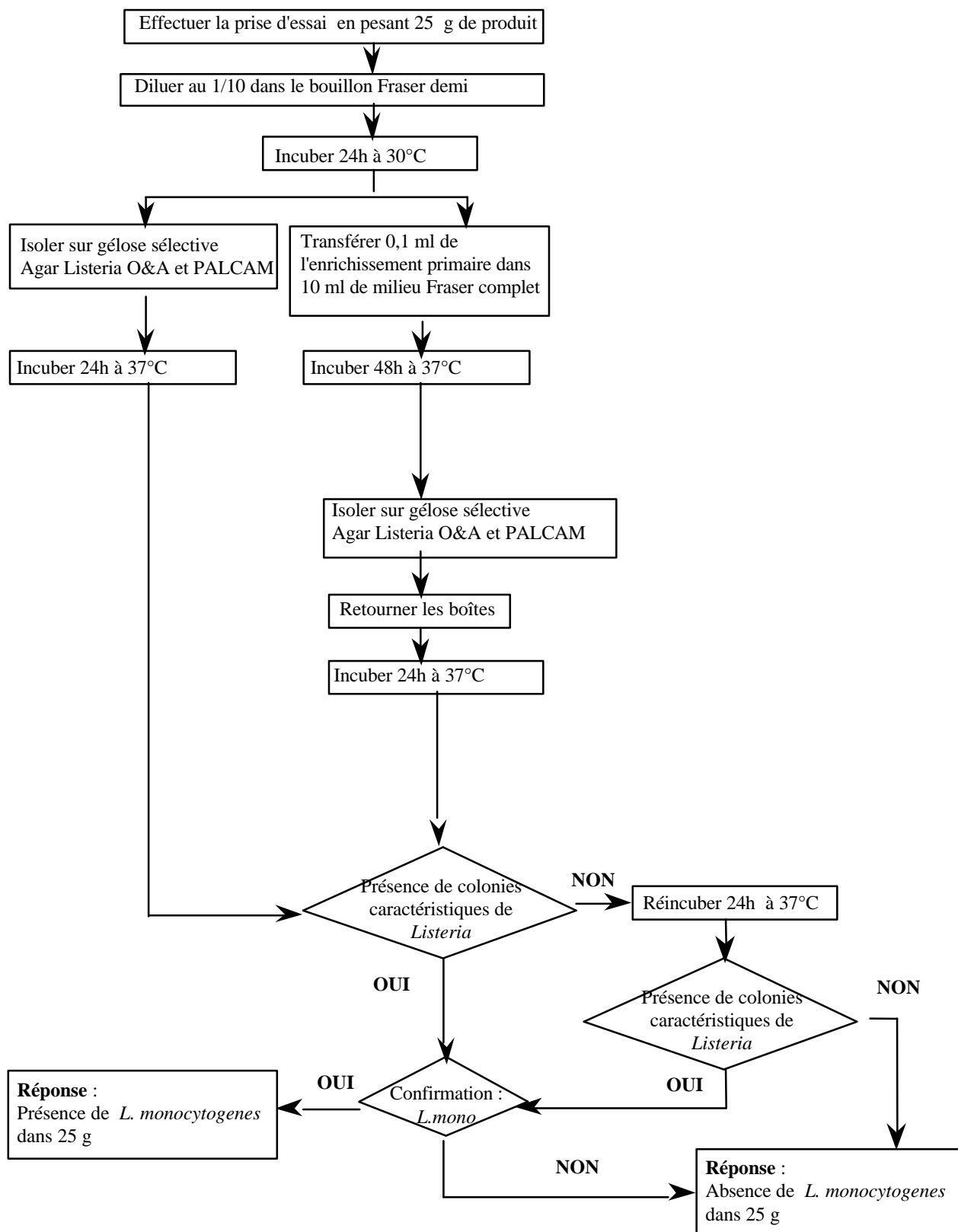
Compte-tenu de ces résultats, la méthode iQ-Check™ *Listeria spp.* (BIO-RAD) a été validée en Mai 2007, sous le numéro BRD 07/13 – 05/07.

ANNEXES

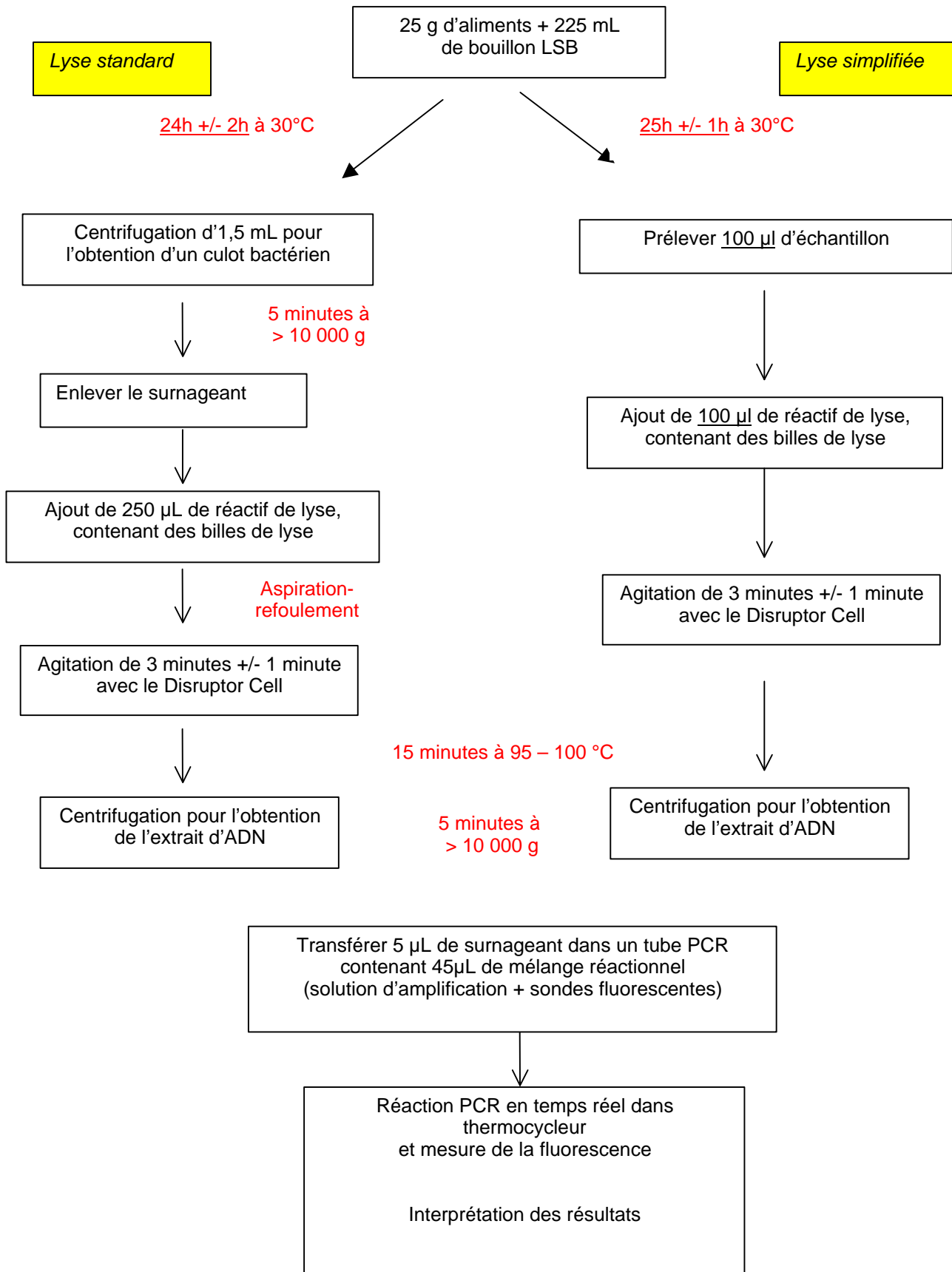
ANNEXE A :

PROTOCOLES ANALYTIQUES

NORME NF EN ISO 11290-1 : 2005



METHODE iQ-Check™ *Listeria spp.*



ANNEXE B :

ETUDE DE COMPARAISON DES METHODES - SYNTHESE DES RESULTATS PAR CATEGORIE

TABLEAUX DE RESULTATS PAR CATEGORIE D'ECHANTILLONS

<u>produits carnés (96)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 52	Déviati on positive (R-/A+) PD = 9
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 5	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

<u>produits laitiers (69)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 33	Déviati on positive (R-/A+) PD = 3
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 3	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

<u>produits de la pêche (65)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviati on positive (R-/A+) PD = 6
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

<u>produits végétaux (68)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 31	Déviati on positive (R-/A+) PD = 3
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 3	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

<u>prélèvements d'environnement (64)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 32	Déviati on positive (R-/A+) PD = 1
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

ANNEXE C :

ETUDE DE SELECTIVITE - TABLEAUX DE RESULTATS

Référence	Souche	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de bouillon LSB	Lyse simplifiée après bouillon LSB		
				Ct C.int	Ct FAM	Résultat
L5	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Lardons saumon fumé	13,0	N/A	21.67	+
L6	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pizza	12,0	N/A	21.71	+
L7	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster croûte	11,0	31.76	26.35	+
L9	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster croûte	6,0	N/A	25.17	+
L10	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Rillettes	6,0	N/A	24.29	+
L11	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster croûte	12,0	N/A	21.82	+
L12	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Saumon fumé	11,0	32.73	25.48	+
L13	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Oreille de porc	7,0	30.80	32.80	+
L14	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Steak haché	5,0	N/A	17.49	+
L15	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Bœuf MP	9,0	N/A	20.17	+
L16	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Viande hachée	7,0	N/A	16.88	+
L17	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Poitrine	6,0	N/A	18.73	+
L18	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Munster croûte	7,0	N/A	19.41	+
L20	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Brisures de saumon fumé	5,0	N/A	22.16	+
L25	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Poule	10,0	N/A	21.19	+
L28	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Eponge de surface	6,0	N/A	20.25	+
L32	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	Munster	6,0	N/A	20.60	+
L37	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Maroille lait cru	8,0	N/A	16.79	+
L39	<i>Listeria monocytogenes</i>	Saucisson sec jambon	6,0	N/A	17.49	+
L40	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster fermier	8,0	N/A	18.61	+
L42	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Escalope de poulet	6,0	N/A	21.91	+
L43	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Steak haché	11,0	N/A	22.90	+
L44	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Saucisson	5,0	N/A	23.41	+
L45	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Terrine de lapin noisette	8,0	N/A	24.06	+
L47	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pommes rissolées	6,0	N/A	23.89	+
L48	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Langue de porc	11,0	N/A	22.14	+
L49	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Crème foie de volaille	8,0	N/A	22.78	+
L51	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Germain affiné	5,5	N/A	23.39	+
L53	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Steak haché	6,6	N/A	21.65	+
L54	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Bœuf bourguignon	6,0	N/A	25.44	+
L55	<i>Listeria monocytogenes</i> 3b	SLCC 2540	6,0	30.81	28.29	+
L56	<i>Listeria monocytogenes</i> 3c	SLCC 2479	6,0	31.77	25.79	+
L58	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	Salade	8,0	N/A	22.07	+
L62	<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	Reblochon	7,2	N/A	21.62	+
L63	<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	Munster	6,5	N/A	19.36	+
L116	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Coquille de poisson	4,5	N/A	19.12	+
L117	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Saucisse de Montbéliard	5,5	N/A	19.89	+
L119	<i>Listeria monocytogenes</i>	Epinard	6,5	N/A	19.08	+
L121	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fromage de Neufchâtel	6,0	N/A	19.00	+
L123	<i>Listeria monocytogenes</i>	Mozzarella	5,5	N/A	20.09	+
L124	<i>Listeria monocytogenes</i>	Filet de perche	5,5	N/A	19.36	+
L128	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Tourteaux de soja	4,5	N/A	18.93	+
L129	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pommes rissolées	7,0	N/A	19.71	+
L130	<i>Listeria monocytogenes</i>	Steak haché	6,0	N/A	19.82	+
L137	<i>Listeria monocytogenes</i>	Coulommier lait cru	6,0	N/A	19.57	+
L141	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prélèvement environnement	6,0	N/A	22.79	+
L149	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prélèvement environnement	5,0	N/A	20.37	+
L152	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prélèvement environnement	6,5	N/A	19.81	+
L156	<i>Listeria monocytogenes</i>	Pommes frites	6,0	N/A	19.20	+
L176	<i>Listeria monocytogenes</i>	Entrecôte de bœuf	4,5	N/A	20.39	+
L 190	<i>Listeria grayi</i>	Frites surgelées	10,0	N/A	18.31	+
L80	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120	10,0	N/A	18.13	+
L188	<i>Listeria grayi</i>	Environnement	11,0	N/A	22.88	+
L 143	<i>Listeria grayi</i>	Frites surgelées	9,0	30.48	31.66	+
L108	<i>Listeria innocua</i>	Gorgonzola	10,0	N/A	17.95	+
L113	<i>Listeria innocua</i>	Flétan fumé	10,0	N/A	18.25	+
L64	<i>Listeria innocua</i>	Epoisses	3,0	N/A	18.19	+
L65	<i>Listeria innocua</i>	Epoisses	4,5	N/A	20.23	+
L66	<i>Listeria innocua</i>	Epinard	4,0	N/A	18.46	+
L72	<i>Listeria innocua</i>	Boulettes d'Avesnes	4,0	N/A	20.19	+
L78	<i>Listeria innocua</i>	Coquelet	3,5	N/A	20.38	+
L175	<i>Listeria innocua</i>	Eau environnement	8,0	N/A	21.52	+
L88	<i>Listeria innocua</i>	Saucisson	6,0	N/A	21.44	+
L77	<i>Listeria innocua</i> 6a	Saucisse de Toulouse	4,0	N/A	23.49	+
L1	<i>Listeria innocua</i> 6a	ATCC 33090	15,0	N/A	18.01	+
L2	<i>Listeria innocua</i> 6b	Steak haché	4,5	N/A	19.39	+
L161	<i>Listeria ivanovii</i>	Steak haché	4,5	N/A	21.64	+
L153	<i>Listeria ivanovii</i>	Prélèvement environnement	12,0	N/A	19.51	+
L80	<i>Listeria ivanovii</i>	Collection	3,7	N/A	16.83	+
L82	<i>Listeria ivanovii</i>	Filet anti-oiseaux	15,0	33.03	26.74	+
L 151	<i>Listeria ivanovii</i>	Steak haché	8,0	N/A	24.91	+
L179	<i>Listeria ivanovii</i>	Prélèvement environnement	4,0	31.59	28.45	+
L 154	<i>Listeria ivanovii</i>	Saucisse aux herbes	6,0	N/A	24.82	+
L115	<i>Listeria seeligeri</i>	Eau d'égoût	10,0	N/A	18.28	+
L84	<i>Listeria seeligeri</i>	Steak haché	14,0	N/A	17.17	+
L140	<i>Listeria seeligeri</i>	Frites surgelées	6,0	N/A	21.96	+
L83	<i>Listeria seeligeri</i> 1/2b	Langue	3,0	N/A	18.27	+
L100	<i>Listeria welshimeri</i>	Pâte à tartiner	10,0	N/A	19.09	+
L101	<i>Listeria welshimeri</i>	Jambon à l'ancienne	10,0	N/A	17.78	+
L 155	<i>Listeria welshimeri</i>	Filet de saumon	5,0	N/A	23.48	+
L 174	<i>Listeria welshimeri</i>	Epinard	7,0	N/A	21.26	+
L91	<i>Listeria welshimeri</i>	Rosette Aoste	5,0	N/A	22.40	+
L89	<i>Listeria welshimeri</i> 6a	Steak haché	2,0	30.83	28.10	+
L 90	<i>Listeria welshimeri</i> 6b	Steak haché	7,0	N/A	22.72	+

Référence	Souche	Origine	Taux dans 10mL de bouillon nutritif non sélectif (UFC/mL)	Protocole de lyse simplifié		
				Ct C.int	Ct FAM	Résultat
BA2	<i>Bacillus cereus</i>	Betteraves	3,0E+05	33.96	N/A	-
BA 1	<i>Bacillus cereus</i>	Oeuf entier	5,0E+05	32.04	N/A	-
BA 15	<i>Bacillus cereus</i>	Crème anglaise	3,0E+05	32.56	N/A	-
BA 19	<i>Bacillus cereus</i>	Environnement	3,0E+05	32.68	N/A	-
BA 3	<i>Bacillus cereus</i>	Collection	3,6E+05	32.89	N/A	-
BA7	<i>Bacillus coagulans</i>	Collection	5,0E+05	34.42	N/A	-
BA22	<i>Bacillus pumilus</i>	Taboulé volaille	6,0E+05	33.94	N/A	-
15	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	Viande hachée	5,0E+00	33.87	N/A	-
38	<i>Corynebacterium variabilis</i>	ATCC 15753	4,9E+05	34.00	N/A	-
E10	<i>Enterococcus durans</i>	Produit carné	6,0E+05	32.38	N/A	-
E8	<i>Enterococcus durans</i>	Collection	6,0E+05	32.71	N/A	-
E1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ovoproduit	7,0E+00	34.49	N/A	-
E6	<i>Enterococcus faecalis</i>	Collection ATCC 19433	4,0E+05	34.20	N/A	-
E2	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection ATCC 3286	3,0E+05	34.04	N/A	-
E7	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection CIP 5433	6,7E+05	36.75	N/A	-
E9	<i>Enterococcus faecium</i>	Tarama	3,0E+05	32.47	N/A	-
L139	<i>Jonesia denitrificans</i>	Collection	1,6E+05	31.07	N/A	-
33	<i>Lactobacillus lactis</i>	Produit laitier	2,3E+05	34.21	N/A	-
B1	<i>Lactobacillus casei</i>	Collection ATCC 9595	2,3E+05	31.79	N/A	-
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Collection	3,0E+05	33.98	N/A	-
B2	<i>Lactobacillus spp</i>	Collection ATCC 11506	5,0E+05	31.05	N/A	-
Le1	<i>Rhodotorula rubra</i>	Pâtisserie	2,0E+05	34.47	N/A	-
ST17	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yaourt glacé	2,3E+05	34.08	N/A	-
B3	<i>Streptococcus anginosus</i>	Collection 1068	6,7E+05	32.82	N/A	-
B4	<i>Streptococcus anginosus</i>	Collection 611	5,0E+05	31.34	N/A	-
E3	<i>Streptococcus bovis</i>	Collection	2,3E+05	34.96	N/A	-
B5	<i>Streptococcus bovis</i>	Collection	2,8E+05	33.62	N/A	-
B6	<i>Streptococcus bovis</i>	Produit carné	7,7E+05	30.85	N/A	-
B7	<i>Streptococcus equinus</i>	Collection 1074	3,0E+05	32.19	N/A	-
B8	<i>Streptococcus intermedius</i>	Collection 1201	3,0E+05	31.04	N/A	-
B9	<i>Streptococcus salivarius</i>	Collection 1115	6,7E+05	30.83	N/A	-
B10	<i>Streptococcus salivarius</i>	Collection 1075	2,3E+05	32.95	N/A	-

ANNEXE D :

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 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 I	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 M	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 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 I	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,98
Degré d'accord :							98%

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 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 I	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 M	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 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 I	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 M	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 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	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
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 I	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 M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,98
Degré d'accord :							98%

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 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 I	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 M	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

ANNEXE E :

ETUDE INTERLABORATOIRE
-
CONCORDANCE

METHODE ALTERNATIVE

Nombre de laboratoires 10

Nombre de négatifs par laboratoire 8

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	576	576
Laboratoire C	8	8	576	576
Laboratoire D	8	8	576	576
Laboratoire E	8	8	576	576
Laboratoire F	8	8	576	576
Laboratoire G	8	8	576	576
Laboratoire H	8	8	576	576
Laboratoire I	8	8	576	576
Laboratoire K	8	8	576	576
Laboratoire M	8	8	576	576
Total			5760	5760
Concordance	100,00%			

Nombre de laboratoires 10

Nombre de positifs par laboratoire 8

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	568	576
Laboratoire C	8	8	568	576
Laboratoire D	8	8	568	576
Laboratoire E	8	8	568	576
Laboratoire F	8	8	568	576
Laboratoire G	8	8	568	576
Laboratoire H	8	8	568	576
Laboratoire I	8	8	568	576
Laboratoire K	8	7	504	576
Laboratoire M	8	8	568	576
Total			5616	5760
Concordance	97,50%			

Nombre de laboratoires 10

Nombre de positifs par laboratoire 8

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	576	576
Laboratoire C	8	8	576	576
Laboratoire D	8	8	576	576
Laboratoire E	8	8	576	576
Laboratoire F	8	8	576	576
Laboratoire G	8	8	576	576
Laboratoire H	8	8	576	576
Laboratoire I	8	8	576	576
Laboratoire K	8	8	576	576
Laboratoire M	8	8	576	576
Total			5760	5760
Concordance	100,00%			

METHODE DE REFERENCE

Nombre de laboratoires 10

Nombre de négatifs par laboratoire 8

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	576	576
Laboratoire C	8	8	576	576
Laboratoire D	8	8	576	576
Laboratoire E	8	8	576	576
Laboratoire F	8	8	576	576
Laboratoire G	8	8	576	576
Laboratoire H	8	8	576	576
Laboratoire I	8	8	576	576
Laboratoire K	8	8	576	576
Laboratoire M	8	8	576	576
Total			5760	5760
Concordance	100,00%			

Nombre de laboratoires 10

Nombre de positifs par laboratoire 8

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	568	576
Laboratoire C	8	8	568	576
Laboratoire D	8	8	568	576
Laboratoire E	8	7	504	576
Laboratoire F	8	8	568	576
Laboratoire G	8	8	568	576
Laboratoire H	8	8	568	576
Laboratoire I	8	8	568	576
Laboratoire K	8	8	568	576
Laboratoire M	8	8	568	576
Total			5616	5760
Concordance	97,50%			

Nombre de laboratoires 10

Nombre de positifs par laboratoire 8

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	576	576
Laboratoire C	8	8	576	576
Laboratoire D	8	8	576	576
Laboratoire E	8	8	576	576
Laboratoire F	8	8	576	576
Laboratoire G	8	8	576	576
Laboratoire H	8	8	576	576
Laboratoire I	8	8	576	576
Laboratoire K	8	8	576	576
Laboratoire M	8	8	576	576
Total			5760	5760
Concordance	100,00%			