

BIO-RAD

3 boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE

Marque NF VALIDATION
Validation des méthodes alternatives d'analyse
Application à la microbiologie alimentaire

Rapport de synthèse

**Etude de validation de la méthode
iQ-Check™ *Salmonella* II
selon le référentiel EN ISO 16140 dans
les produits d'alimentation humaine et animale,
et les échantillons de l'environnement**

Méthode qualitative

Ce rapport comprend 65 pages dont 8 annexes.

La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par le symbole♦.

Synthèse IQ Check *Salmonella* II (Version 0)

30 novembre 2011

ADRIA DEVELOPPEMENT

Creac'h Gwen - F. 29196 QUIMPER Cedex - Tél. (33) 02.98.10.18.18 - Fax (33) 02.98.10.18.08

E-mail : adria.developpement@adria.tm.fr - Site web : <http://www.adria.tm.fr>

ASSOCIATION LOI DE 1901 - N° SIRET 306 964 271 00036 - N° EXISTENCE 532900006329 - N°TVA FR4530696427100036

Sommaire

1	INTRODUCTION	5
1.1	Référentiel de validation	5
1.2	Protocoles et principe de la méthode alternative	5
1.3	Domaine d'application demandé	6
1.4	Méthode de référence	6
1.5	Historique	7
2	ETUDE COMPARATIVE DES METHODES	8
2.1	Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de l'étude d'extension sur les <u>produits carnés</u> , avec le <u>protocole simplifié II</u> et un <u>enrichissement court</u> (étude réalisée en 2011 par ADRIA Développement)	8
2.2	Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de l'étude d'extension sur les <u>viandes crues</u> , avec le <u>protocole standard II</u> et un <u>enrichissement court</u> (étude réalisée en 2008 par ADRIA Développement)	10
2.3	Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de l'extension avec le <u>protocole simplifié II</u> pour les <u>viandes de bœuf crues</u> (étude réalisée en 2008 par ADRIA Développement)	12
2.4	Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative des <u>protocoles de lyse standard et lyse simplifiée</u> (étude réalisée en 2007 par ADRIA Développement)	14
2.5	Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative du <u>protocole alternatif en cas d'inhibition</u> (étude réalisée en 2004 par l'Institut Pasteur de Lille)	23
2.6	Niveau de détection relatif	29
2.7	Inclusivité et exclusivité	31
3	ETUDES INTERLABORATOIRES	33
3.1	Etude menée avec le kit iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II (étude réalisée en 2008 par ADRIA Développement)	33
3.2	Etude interlaboratoire menée avec le kit iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II (étude réalisée en 2004 par l'Institut Pasteur de Lille)	41
4	PRATICABILITE	48
5	CONCLUSION	52

✚	<i>Annexe 1 - Méthode alternative iQ Check™ Salmonella II</i> _____	53
✚	<i>Annexe 2 - Méthode alternative : protocole spécifique pour les viandes crues (protocole court standard II)</i> _____	54
✚	<i>Annexe 3 - Méthode alternative : protocole alternatif d'extraction pour les viandes crues de bœuf (protocole simplifié II)</i> _____	55
✚	<i>Annexe 4 - Méthode alternative : Easy Extraction II Deepwell Protocol pour les produits carnés (protocole simplifié II)</i> _____	56
✚	<i>Annexe 5 - Méthode de référence ISO 6579 : 2002 : Microbiologie des aliments Méthode horizontale pour la recherche de Salmonella</i> _____	57
✚	<i>Annexe 6 - Résultats de l'inclusivité et de l'exclusivité (Etude réalisée en 2007-2008)</i> _____	58
✚	<i>Annexe 7 - Calcul du degré d'accord</i> _____	64
✚	<i>Annexe 8 - Calcul de la concordance</i> _____	65

Avant Propos

L'ensemble des renseignements permettant de valider la garantie des analyses est tenu à la disposition de la Société Bio-Rad.

Les résultats sont synthétisés au sein de tableaux et interprétés selon la norme EN ISO 16140.

- ✓ **Fabricant :** BIO-RAD
3 boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE

- ✓ **Laboratoire expert :** ADRIA Développement
ZA Creac'h Gwen
29196 QUIMPER Cedex

- ✓ **Méthode à valider :** Méthode iQ-Check *Salmonella* II

- ✓ **Référentiel de validation :** Norme EN ISO 16140 (octobre 2003) :
microbiologie des aliments - Protocole pour la
validation des méthodes alternatives

- ✓ **Méthode de référence[♦] :** ISO 6579 : Méthode horizontale pour la recherche
de *Salmonella*

- ✓ **Etendue de la validation :** Produits d'alimentation humaine et animale
Echantillons de l'environnement

- ✓ **Organisme de validation :** AFNOR

[♦] Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

1 INTRODUCTION

1.1 Référentiel de validation

Le référentiel de validation utilisé est la norme EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives.

1.2 Protocoles et principe de la méthode alternative

Après un enrichissement en eau peptonée tamponnée, une extraction des acides nucléiques est réalisée selon divers protocoles, tel que préconisé dans la notice. Le test repose sur l'amplification génique par PCR en temps réel d'une séquence nucléique spécifique de *Salmonella* spp.

Différents protocoles sont disponibles et sont listés ci-dessous :

- **protocole simplifié I** (Cf. annexe 1) :
 - * enrichissement en eau peptonée tamponnée 21 h \pm 1 h à 37°C \pm 1°C
 - * extraction simplifiée : 100 μ l de réactif de lyse + 100 μ l de bouillon d'enrichissement
 - * amplification - détection par PCR en temps réel,

- **protocole standard I** (Cf. annexe 1) :
 - * enrichissement en eau peptonée tamponnée 18 h \pm 2 h à 37°C \pm 1°C
 - * extraction sur 1 ml d'enrichissement
 - * amplification - détection par PCR en temps réel,

- **protocole standard II pour viandes crues** (Cf. annexe 2) :
 - * enrichissement en eau peptonée tamponnée préchauffée 10 h \pm 2 h à 37°C \pm 1°C
 - * extraction sur 1 ml d'enrichissement et avec broyage mécanique
 - * amplification - détection par PCR en temps réel,

- **protocole simplifié II pour viandes crues de bœuf** (Cf. annexe 3) :
 - * enrichissement en eau peptonée tamponnée préchauffée 21 h \pm 1 h à 37°C \pm 1°C
 - * extraction simplifiée : 100 μ l de réactif de lyse + 100 μ l de bouillon d'enrichissement, avec broyage mécanique
 - * amplification - détection par PCR en temps réel.

- **protocole simplifié II pour produits carnés** (Cf. annexe 4) :
 - * enrichissement de 18 h \pm 2 h à 37°C
 - * extraction sur 100 μ l d'enrichissement
 - * PCR en temps réel.

En cas d'inhibition, l'utilisateur a **deux solutions** :

- la réalisation d'une dilution au dixième,
- ou le recours à un protocole alternatif (non applicable aux échantillons de l'environnement) proposé par le fabricant et décrit dans la notice technique.

Ce **protocole alternatif** en cas d'inhibition est résumé comme suit :

- enrichissement en eau peptonée tamponnée 18 h \pm 1 h à 37°C \pm 1°C,
- transfert de 20 μ l dans 1 ml d'eau peptonée tamponnée et incubation 4 h \pm 1 h à 37°C,
- extraction sur 1 ml d'enrichissement,
- amplification - détection par PCR en temps réel.

Les confirmations des résultats sont réalisées par les tests de la méthode de référence ISO 6579 ou la méthode alternative validée ISO 16140 et de principe différent.

1.3 **Domaine d'application demandé**

Produits d'alimentation humaine et animale
Echantillons de l'environnement.

1.4 **Méthode de référence[♦]**

La méthode de référence est la norme ISO 6579 (2002) : méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella*. Le protocole est schématisé en annexe 5.

[♦] Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

1.5 Historique

La méthode iQ Check™ *Salmonella* II a été validée en 2004, étude au cours de laquelle le protocole alternatif a été testé et l'étude interlaboratoire réalisée. L'ensemble de ces travaux a été mené par l'Institut Pasteur de Lille.

En mai 2007, une étude d'extension a été menée afin de :

- tester un protocole d'extraction d'ADN simplifié et plus rapide,
- raccourcir le temps d'enrichissement,
- tester les nouveaux réactifs de lyse et d'amplification.

En septembre 2008, deux études d'extension ont été réalisées :

- extension pour un raccourcissement du temps d'enrichissement pour la catégorie « Viandes crues » (incubation 10 h ± 2 h à 37°C),
- extension pour une modification du protocole d'extraction d'ADN pour les matrices « Viandes de bœuf crues » : utilisation du protocole « Simplifié II » impliquant l'utilisation de billes de broyage.

En décembre 2008, une nouvelle étude interlaboratoire a été réalisée lors de la reconduction de validation de la méthode.

En janvier 2009, une nouvelle étude a permis d'étendre la validation à l'utilisation d'une nouvelle version du logiciel Opticon Monitor™ avec option de retraitement automatique des résultats.

En février 2011, une nouvelle étude d'extension a permis de valider le protocole simplifié II avec incubation en 18 h ± 2 h à 37°C et applicable aux produits carnés. Les paramètres suivants ont été testés : exactitude/spécificité/sensibilité relatives et niveau de détection relatif.

2 ETUDE COMPARATIVE DES METHODES

2.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de l'étude d'extension sur les produits carnés, avec le protocole simplifié II et un enrichissement court (étude réalisée en 2011 par ADRIA Développement)

2.1.1 Nombre et nature des échantillons

Soixante-sept échantillons de produits carnés ont été analysés ; la répartition est donnée dans le tableau ci-après :

Catégorie	Type	Positifs *	Négatifs	Total
Produits carnés	Volaille	11	13	24
	Porc	12	19	31
	Bœuf	7	5	12
TOTAL		30	37	67

* Il s'agit de résultats positifs par l'une ou l'autre des méthodes.

2.1.2 Contamination artificielle des échantillons

Treize échantillons ont été contaminés artificiellement ; ils ont tous donné un résultat positif. Le pourcentage d'échantillons naturellement contaminés est donc de 56,7 %.

2.1.3 Protocole de confirmation

Les résultats positifs obtenus par la méthode iQ-CheckTM *Salmonella* II ont été confirmés par les tests classiques de la méthode de référence.

2.1.4 Résultats des essais

Réponses	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
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 37

A+ = positifs confirmés

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

Tableau 1 - Calcul de l'exactitude relative (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

Matrice	PA	NA	ND	PD	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	0	0	67	100,0	30	100,0	37	100,0

PA = Accord positif (R+/A+)

NA = Accord négatif (R-/A-)

PD = déviation positive (R-/A+)

ND = déviation négative (A-/R+)

Les valeurs en pourcentage calculées pour la méthode alternative sont les suivantes :

Exactitude relative	100 %
Spécificité relative	100 %
Sensibilité relative	100 %

2.1.5 Analyse des discordants

Aucun résultat discordant n'a été observé ; les méthodes sont équivalentes.

2.1.6 Conservation des bouillons d'enrichissement 72 h à 4°C

Une modification de résultat est observée pour l'échantillon n° 4526 (viande blanche de poulet broyée) après stockage de l'eau peptonée 72 h à 4°C. Le résultat PCR devient négatif alors qu'il était positif après incubation, mais avec un Ct tardif (39,74). L'analyse des discordants devient alors :

**Y = ND + PD = 1 + 0 = 1
Y < 6, aucun test n'est disponible ;
les méthodes ne sont pas différentes.**

2.2 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de l'étude d'extension sur les viandes crues, avec le protocole standard II et un enrichissement court (étude réalisée en 2008 par ADRIA Développement)

2.2.1 Nombre et nature des échantillons

Des viandes crues ont été analysées, de façon à obtenir au minimum 30 échantillons positifs et 30 échantillons négatifs. 89 échantillons ont été analysés et sont répartis de la façon suivante :

Catégories	Positifs* (nombre)	Négatifs (nombre)	Total (nombre)
Viandes crues	52	37	89

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

2.2.2 Contamination artificielle des échantillons

40 échantillons ont été contaminés artificiellement par des souches ayant subi un stress ; 37 ont donné un résultat positif par l'une ou l'autre des méthodes. **Le pourcentage de produits positifs naturellement contaminés est de 28,8 %.**

2.2.3 Protocole de confirmation

Les résultats positifs obtenus par la méthode iQ Check™ *Salmonella* II ont été confirmés par les tests classiques de la méthode de référence.

2.2.4 Résultats des essais

Tableau 2 - Confirmation par la méthode de référence

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative positifs (A+)	51	0
Méthode alternative négatifs (A-)	1	37 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dont 1 échantillon (795) positif présomptif par la méthode iQ-Check *Salmonella* II et non confirmé

Tableau 3 - Calcul de l'exactitude relative (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

Méthode de confirmation	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)/N]	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+]	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-]
Confirmation par la méthode de référence	51	37	1	0	89	98,9	52	98,1	37	100,0

PA = Accord positif (R+/A+)
PD = déviation positive (R-/A+)

NA = Accord négatif (R-/A-)
ND = déviation négative (A-/R+)

Les valeurs en pourcentage calculées pour ces trois critères pour la méthode alternative sont les suivantes :

Exactitude relative AC	98,9
Spécificité relative SP	100,0
Sensibilité relative SE	98,1

Les sensibilités des deux méthodes, en tenant compte des positifs supplémentaires obtenus pour la méthode alternative, sont les suivantes :

Méthode alternative	Méthode de référence
98,1	100,0

2.2.5 Analyse des discordants

Une seule déviation négative est observée. Il s'agit de l'échantillon n° 3209 (Tartare de bœuf) pour lequel un test PCR négatif est observé ; le seuil de détection de la méthode n'était probablement pas atteint après une incubation de 8 heures à 37°C.

Le nombre de discordants entre la méthode de référence et la méthode alternative est de :

$$y = ND + PD = 1 + 0 = 1$$

$$y < 6$$

Aucun test statistique n'est disponible.

2.3 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de l'extension avec le protocole simplifié II pour les viandes de bœuf crues (étude réalisée en 2008 par ADRIA Développement)

2.3.1 Nombre et nature des échantillons

Des viandes crues de bœuf ont été analysées, de façon à obtenir au minimum 30 échantillons positifs et 30 échantillons négatifs.

66 échantillons ont été analysés et sont répartis de la façon suivante :

Catégories	Positifs* (nombre)	Négatifs (nombre)	Total (nombre)
Viandes crues de bœuf	32	34	66

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

2.3.2 Contamination artificielle des échantillons

35 échantillons ont été contaminés artificiellement par des souches ayant subi un stress. 32 produits ont donné un résultat positif (par l'une ou l'autre des méthodes).

2.3.3 Protocole de confirmation

Les résultats positifs obtenus par la méthode iQ Check™ *Salmonella* II ont été confirmés par les tests classiques de la méthode de référence.

2.3.4 Résultats des essais

Tableau 4 – Viandes crues de boeuf

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative positifs (A+)	31	0
Méthode alternative négatifs (A-)	1	34

**Tableau 5 - Calcul de l'exactitude relative (AC),
de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)**

Catégories	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N]	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+]	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-]
Viandes crues de boeuf	31	34	1	0	66	98,5	32	96,9	34	100,0

Les valeurs en pourcentage calculées pour ces trois critères pour la méthode alternative sont les suivantes :

Exactitude relative AC	98,5
Spécificité relative SP	100,0
Sensibilité relative SE	96,9

Les sensibilités des deux méthodes, en tenant compte des positifs supplémentaires obtenus pour la méthode alternative, sont les suivantes :

Méthode alternative	Méthode de référence
96,9	100,0

2.3.5 Analyse des discordants

Une déviation négative observée est liée à l'obtention d'un résultat PCR négatif (échantillon n° 3208) ; la présence de *Salmonella* a cependant été mise en évidence dans l'enrichissement. Le seuil de détection n'a probablement pas été atteint.

Aucune déviation positive n'a été observée.

Le nombre de discordants entre la méthode de référence et la méthode alternative est de :

$y = ND + PD = 1 + 0 = 1$ Aucun test statistique n'est disponible	$y < 6$
--	---------

2.4 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative des protocoles de lyse standard et lyse simplifiée (étude réalisée en 2007 par ADRIA Développement)

2.4.1 Nombre et nature des échantillons

Au total, 427 échantillons ont été analysés et sont répartis de la façon suivante :

Catégories	Types	Positifs*		Négatifs		Total	
		Protocole standard I	Protocole simplifié I	Protocole standard I	Protocole simplifié I	Protocole standard I	Protocole simplifié I
Produits carnés	Volailles, porc, bœuf, charcuterie	30	30	30	30	60	60
Produits laitiers	Laits crus, fromages au lait cru, poudres de lait, glaces	47	46	41	42	88	88
Produits de la pêche et végétaux	Produits de la pêche, végétaux, divers	32	32	39	39	71	71
Ovoproduits	Coules, mayonnaises, crèmes, flans, pâtisseries	30	30	31	31	61	61
Produits d'alimentation animale	Aliments pour animaux de compagnie, aliments pour bétail, produits déshydratés, farines	30	31	33	32	63	63
Echantillons de l'environnement	Environnement abattoir, biscuiterie, pâtisserie, divers	30	30	54	54	84	84
TOTAL		199	199	228	228	427	427

2.4.2 Contamination artificielle des échantillons

212 échantillons ont été contaminés artificiellement, soit par des souches ayant subi un stress, soit par contamination croisée avec des produits de même type. 150 produits ont donné un résultat positif (par l'une ou l'autre des méthodes) sur un total de 199 échantillons positifs.

Le pourcentage de produits positifs naturellement contaminés est de 25%.

2.4.3 Protocole de confirmation

Les résultats positifs obtenus par la méthode iQ Check™ *Salmonella* II ont été confirmés par les tests classiques de la méthode de référence.

Lors de l'obtention de positifs supplémentaires par la méthode alternative, la confirmation a également été réalisée par isolement des bouillons RVS et MKTTn sur géloses SMID2. La méthode RAPID' *Salmonella* avec un enrichissement de 24 h à 48 h en bouillon RVS a également été mise en œuvre.

2.4.4 Résultats des essais

Tableau 6 - Toutes catégories confondues

Protocole standard I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	191	3
Méthode alternative Négatifs (A-)	5	228*

* Dont 6 échantillons positifs présomptifs non confirmés par la méthode iQ Check™ *Salmonella* II.

Protocole simplifié I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	188	3
Méthode alternative Négatifs (A-)	8	228*

* Dont 20 échantillons positifs présomptifs non confirmés par la méthode iQ Check™ *Salmonella* II.

Tableau 7 - Produits carnés

Protocole standard I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	29	0
Méthode alternative Négatifs (A-)	1	30

Protocole simplifié I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	29	0
Méthode alternative Négatifs (A-)	1	30

Tableau 8 - Produits laitiers

Protocole standard I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	43	2
Méthode alternative Négatifs (A-)	2	41

Protocole simplifié I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	42	1
Méthode alternative Négatifs (A-)	3	42

Tableau 9 - Produits de la pêche, végétaux et divers**Protocole standard I**

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	32	0
Méthode alternative Négatifs (A-)	0	39

Protocole simplifié I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	30	0
Méthode alternative Négatifs (A-)	2	39

Tableau 10 - Ovoproduits**Protocole standard I**

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	29	1
Méthode alternative Négatifs (A-)	0	31

Protocole simplifié I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	29	1
Méthode alternative Négatifs (A-)	0	31

Tableau 11 - Produits d'alimentation animale

Protocole standard I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	30	0
Méthode alternative Négatifs (A-)	0	33

Protocole simplifié I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	29	1
Méthode alternative Négatifs (A-)	1	32

Tableau 12 - Echantillons de l'environnement

Protocole standard I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	28	0
Méthode alternative Négatifs (A-)	2	54

Protocole simplifié I

Réponses	Méthode de référence Positifs (R+)	Méthode de référence Négatifs (R-)
Méthode alternative Positifs (A+)	29	0
Méthode alternative Négatifs (A-)	1	54

**Tableau 13 - Calcul de l'exactitude (AC), de la sensibilité relative (SE)
et de la spécificité relative (SP)**

Protocole standard I

Matrices	PA	NA	ND	PD	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	29	30	1	0	60	98,3	30	96,7	30	100,0
Produits laitiers	43	41	2	2	88	95,6	45	95,6	43	95,3
Produits de la pêche, végétaux et divers	32	39	0	0	71	100,0	32	100,0	39	100,0
Ovoproduits	29	31	0	1	61	98,4	29	100,0	32	96,9
Alimentation animale	30	33	0	0	63	100,0	30	100,0	33	100,0
Environnement	28	54	2	0	84	97,6	30	93,3	54	100,0
TOTAL	191	228	5	3	427	98,1	196	97,4	231	98,7

Protocole simplifié I

Matrices	PA	NA	ND	PD	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	29	30	1	0	60	98,3	30	96,7	30	100,0
Produits laitiers	42	42	3	1	88	95,5	45	93,3	43	97,7
Produits de la pêche, végétaux et divers	30	39	2	0	71	97,2	32	93,8	39	100,0
Ovoproduits	29	31	0	1	61	98,4	29	100,0	32	96,9
Alimentation animale	29	32	1	1	63	96,8	30	96,7	33	97,0
Environnement	29	54	1	0	84	98,8	30	96,7	54	100,0
TOTAL	188	228	8	3	427	97,4	196	95,9	231	98,7

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

Les valeurs en pourcentage calculées pour ces trois critères pour la méthode alternative sont les suivantes :

	Protocole standard I	Protocole simplifié I
Exactitude relative AC	98,1	97,4
Spécificité relative SP	98,7	98,7
Sensibilité relative SE	97,4	95,9

Les sensibilités des deux méthodes, en tenant compte des positifs supplémentaires obtenus pour la méthode alternative, sont les suivantes :

	Méthode alternative	Méthode de référence
Protocole standard I	97,5	98,5
Protocole simplifié I	96,0	98,5

2.4.6 Analyse des discordants

Déviations négatives - Protocole standard I (5 échantillons)	
Produits carnés (1)	
Echantillon 1412 (Gras de porc)	Echantillon naturellement contaminé pour lequel des colonies de <i>Salmonella</i> ont été isolées uniquement sur gélose Hektoen à partir du bouillon RVS
Produits laitiers (2)	
Echantillon 570 (Lait cru)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Infantis. Des colonies caractéristiques ont été obtenues sur les géloses sélectives de la méthode de référence.
Echantillon 646 (St Nectaire fermier)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella arizonae</i> . Des colonies caractéristiques ont été obtenues sur les géloses sélectives de la méthode de référence.
Echantillons de l'environnement (2)	
Echantillon 420 (Tapis éviscération)	Echantillon naturellement contaminé. Des colonies caractéristiques ont été retrouvées sur les géloses sélectives de la méthode de référence. L'analyse par lyse directe a montré un résultat positif.
Echantillon 696 (Chariot salle de cuisson)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella arizonae</i> . Des colonies caractéristiques ont été isolées uniquement à partir du bouillon MKTTn.

Déviations négatives - Protocole simplifié I (8 échantillons)	
Produits carnés (1)	
Echantillon 1412 (Gras de porc)	Echantillon naturellement contaminé pour lequel des colonies de <i>Salmonella</i> ont été isolées uniquement sur gélose Hektoen à partir du bouillon RVS
Produits laitiers (3)	
Echantillon 567 ((Raclette au lait cru)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Heidelberg. Des colonies caractéristiques ont été obtenues sur les géloses sélectives de la méthode de référence.
Echantillon 570 (Lait cru)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Infantis. Des colonies caractéristiques ont été obtenues sur les géloses sélectives de la méthode de référence.
Echantillon 646 (St Nectaire fermier)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella arizonae</i> . Des colonies caractéristiques ont été obtenues sur les géloses sélectives de la méthode de référence.
Produits de la pêche, végétaux et divers (2)	
Echantillon 720 (Riz au safran)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Indiana. Des colonies caractéristiques ont été isolées sur les géloses sélectives de la méthode de référence.
Echantillon 1334 (Riz au crabe)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Brandenburg. Des colonies caractéristiques ont été isolées sur les géloses sélectives de la méthode de référence.
Produits d'alimentation animale (1)	
Echantillon 1303 (Graines pour oiseaux)	Echantillon artificiellement contaminé par contamination croisée. Des colonies caractéristiques ont été isolées uniquement à partir du bouillon RVS.
Echantillons de l'environnement (1)	
Echantillon 696 (Chariot salle de cuisson)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella arizonae</i> . Des colonies caractéristiques ont été isolées uniquement à partir du bouillon MKTTn.

Déviations positives - Protocole standard I (3 échantillons)	
Produits laitiers (2)	
Echantillon 148 (Fromage à pâte persillée)	Echantillon naturellement contaminé. Aucune colonie caractéristique n'a été mise en évidence en méthode de référence. La présence de <i>Salmonella</i> a été obtenue par la méthode RAPID' <i>Salmonella</i> avec un enrichissement de 48h en milieu RVS.
Echantillon 1066 (Crottin de chèvre au lait cru)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Montevideo 606. Aucune colonie caractéristique n'a été mise en évidence sur les géloses sélectives de la méthode de référence. La confirmation de la présence de <i>Salmonella</i> a été obtenue par la méthode RAPID' <i>Salmonella</i> .
Ovoproduits (1)	
Echantillon 161 (Mayonnaise)	Echantillon naturellement contaminé. Des colonies caractéristiques ont été isolées sur gélose XLD à partir du bouillon MKTTn, mais identifiées à l'espèce <i>Citrobacter youngae</i> . La présence de <i>Salmonella</i> a été observée à partir d'un isolement du bouillon RVS sur gélose SMID 2.

Déviations positives - Protocole simplifié I (3 échantillons)	
Produits laitiers (1)	
Echantillon 1066 (Crottin de chèvre au lait cru)	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Montevideo 606. Aucune colonie caractéristique n'a été mise en évidence sur l'ensemble des géloses sélectives de la méthode de référence. La confirmation de la présence de <i>Salmonella</i> a été obtenue par la méthode RAPID' <i>Salmonella</i> .
Ovoproduits (1)	
Echantillon 161 (Mayonnaise)	Echantillon naturellement contaminé. Des colonies caractéristiques ont été isolées sur gélose XLD à partir du bouillon MKTTn, mais identifiées à l'espèce <i>Citrobacter youngae</i> . La présence de <i>Salmonella</i> a été confirmée par isolement du bouillon RVS sur gélose SMID 2.
Produits d'alimentation animale (1)	
Echantillon 388 (Protéines déshydratées de volaille)	Echantillon naturellement contaminé. Aucune colonie caractéristique n'a été observée sur l'ensemble des géloses sélectives de la méthode de référence. La présence de <i>Salmonella</i> a été confirmée par la méthode RAPID' <i>Salmonella</i> avec un enrichissement de 48h en bouillon RVS.

Le nombre de discordants entre la méthode de référence et la méthode alternative est de :

- Protocole standard I

$$y = ND + PD = 5 + 3 = 8$$

$$M = 0 \qquad m = PD = 3$$

$m > M$, les deux méthodes ne sont pas différentes à $\alpha 0,05$.

- Protocole simplifié I

$$y = ND + PD = 8 + 3 = 11$$

$$M = 1 \qquad m = PD = 3$$

$m > M$, les deux méthodes ne sont pas différentes à $\alpha 0,05$.

2.5 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative du protocole alternatif en cas d'inhibition (étude réalisée en 2004 par l'Institut Pasteur de Lille)

2.5.1 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.

La validation étant demandée pour l'alimentation humaine et animale, cinq catégories ont été étudiées.

Chaque catégorie a été divisée en différents types :

Catégories	Types	Positifs *	Négatifs	Total
Produits carnés	- viandes et abats crus	15	18	33
	- viandes et abats de volaille crus	6	20	26
	- charcuteries et produits assaisonnés	9	9	18
	Total	30	47	77
Produits laitiers	- laits crus	10	10	20
	- fromages au lait cru	14	9	23
	- autres produits laitiers (poudres de lait, crèmes glacées, fromages pasteurisés)	14	13	27
	Total	38	32	70
Produits à base de poisson et produits végétaux	- poissons et crustacés	9	14	23
	- végétaux et épices	9	17	26
	- jus de fruits et de légumes	12	13	25
	Total	30	44	74
Divers	- ovoproduits	15	16	31
	- pâtisseries	13	14	27
	- plats cuisinés	4	17	21
	Total	32	47	79
Alimentation animale	- tourteaux	11	9	20
	- farines	8	13	21
	- aliments pour animaux de compagnie	11	10	21
	Total	30	32	62
TOTAL		160	202	362

* il s'agit d'échantillons positifs par au moins l'une des méthodes

2.5.2 Contamination artificielle des échantillons et pourcentage de contaminations artificielles

Pour certains produits, des contaminations artificielles ont été réalisées. Les modes de contaminations étaient les suivants :

- contamination par une souche de *Salmonella* ayant subi un stress froid (combinaison de cycles de congélation et de réfrigération pendant des durées variant de 24 heures à 7 jours),
- contamination par une souche de *Salmonella* ayant subi un stress à la chaleur (passage de la suspension contaminante à 55°C pendant 30 minutes à 60 minutes, suivie d'un refroidissement très rapide)

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

Les produits ont été contaminés par ces souches stressées à des taux variant de 1 à 30 cellules par 25 grammes, en fonction des souches utilisées. Une vingtaine de souches de *Salmonella* d'origine et de sérotype différents ont été utilisées pour réaliser ces contaminations artificielles.

Au total, 113 résultats positifs sur 160 ont été obtenus suite à des contaminations artificielles, soit 70%. 47 échantillons étaient naturellement contaminés.

2.5.3 Résultats du protocole alternatif, hors prélèvements d'environnement

Les résultats se répartissent de la manière suivante :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 155	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 4 (1)	Accord négatif (A-/R-) NA = 203 (2)

A+ = positifs confirmés

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

(1) : dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(2) : dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

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

Tableau 14 - Produits carnés

Réponses	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
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 47

Tableau 15 - Produits laitiers

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 35	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 33

Tableau 16 - Produits à base de poisson et produits végétaux

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 44

Tableau 17 - Ovoproduits, pâtisseries, plats cuisinés

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 32	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 47

Tableau 18 - Alimentation animale

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 32

Tableau 19 - Calcul de l'exactitude (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

Matrices	PA	NA	ND	PD	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	15	18	0	0	33					
	6	20	0	0	26					
	9	9	0	0	18					
	30	47	0	0	77	100,0	30	100,0	47	100,0
Produits laitiers	9	11	0	0	20					
	14	9	0	0	23					
	12	13	2	0	27					
	35	33	2	0	70	97,1	37	94,6	33	100,0
Produits végétaux et produits à base de poissons	9	17	0	0	26					
	8	14	1	0	23					
	12	13	0	0	25					
	29	44	1	0	74	98,6	30	96,7	44	100,0
Divers	15	16	0	0	31					
	13	14	0	0	27					
	4	17	0	0	21					
	32	47	0	0	79	100,0	32	100,0	47	100,0
Alimentation animale	10	9	1	0	20					
	8	13	0	0	21					
	11	10	0	0	21					
	29	32	1	0	62	98,4	30	96,7	32	100,0
TOTAL	155	203	4	0	362	98,9	159	97,5	203	100,0

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

Résultats du protocole alternatif

- 1) exactitude relative : **AC = 98,9%**
- 2) spécificité relative : **SP = 100,0%**
- 3) sensibilité relative : **SE = 97,5%**

La sensibilité des deux méthodes a été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés :

Méthode alternative : (PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,4%	Méthode de référence : (PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100%
---	---

2.5.5 Analyse des discordants (protocole alternatif)

Néanmoins, nous pouvons examiner les résultats de ces échantillons.

Dans cette étude, sur les 362 échantillons analysés et les 159 résultats positifs, quatre résultats sont discordants entre les deux méthodes : il s'agit de déviations négatives.

A l'exception de l'échantillon de poudre de lait, tous les autres échantillons sont positifs avec le protocole général.

Il est possible que le niveau de détection ne soit plus atteint dans le protocole alternatif, du fait de la dilution au 1/50 de l'eau peptonée tamponnée.

Déviations négatives - Protocole alternatif (4 échantillons)	
Poudre de lait	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Cerro, à un taux estimé à 1 cellule par 25 grammes : il est fort probable que le niveau de détection de la méthode n'ait pas été atteint et que le stress appliqué à la salmonelle n'ait pas permis à celle-ci de se développer suffisamment. Les confirmations réalisées après passage de l'eau peptonée tamponnée pendant une nuit à +4°C n'ont d'ailleurs pas permis de retrouver la souche, ni directement à partir de l'eau peptonée tamponnée, ni après repiquage en bouillons sélectifs RVS et MKTTn. Il est à noter que dans la méthode de référence, les bouillons RVS et MKTTn ont été réalisés directement à partir du bouillon de préenrichissement, sans conservation de celui-ci à +4°C et que les salmonelles ont été retrouvées sur géloses sélectives.
Crème glacée au chocolat	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Typhimurium. La souche de salmonelle a été trouvée lors des confirmations réalisées à partir de l'eau peptonée tamponnée.
Champignon	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella</i> Blockley. Cet échantillon était fort contaminé en flore interférente.
Tourteau pour animaux	Echantillon naturellement contaminé

Commentaires :**- sur les résultats donnés positifs par le test et non confirmés :**

Un échantillon de plat cuisiné a été retrouvé positif par le protocole alternatif alors qu'il était négatif par le protocole général et par la méthode de référence. Les confirmations n'ont pas permis de retrouver de *Salmonella*.

L'analyse PCR a été refaite une seconde fois et le résultat était toujours positif : il ne s'agissait donc pas d'une contamination inter-puits lors de la préparation de la plaque PCR.

- sur les inhibitions :

Aucune inhibition n'a été mise en évidence avec le protocole alternatif de la méthode iQ-Check™ *Salmonella* II.

Le nombre de discordants entre la méthode de référence et la méthode alternative est de :

- Protocole alternatif

$$y = ND + PD = 4 + 0 = 4$$

y étant inférieur à 6, aucun test statistique ne peut être réalisé.

Les deux méthodes ne sont pas différentes.

2.6 Niveau de détection relatif

Cette étude a pour objectif de déterminer les quantités minimales de *Salmonella spp.* détectables dans la matrice alimentaire et de les comparer à celles obtenues par la méthode de référence

Les résultats obtenus pour les différents protocoles sont donnés dans le tableau ci-après :

Tableau 20 - Valeurs des niveaux de détection relatifs obtenus pour les protocoles Lyse standard et Lyse simplifiée pour toutes catégories

Couples (souche, matrice)	Niveau de détection relatif (UFC / 25 g ou 25 ml)		
	Méthode de référence	Méthode alternative (Lyse standard)	Méthode alternative (Lyse simplifiée)
Steak haché / <i>Salmonella infantis</i> 14	0,6 [0,2; 1,7]	0,6 [0,2; 1,7]	0,6 [0,2; 1,7]
Lait cru / <i>Salmonella typhimurium</i> 305	0,4 [0,1 ; 1,7]	0,7 [0,3 ; 2,0]	0,9 [0,3 ; 2,8]
Filet de perche / <i>Salmonella St Paul</i> F31	0,5 [0,2 ; 1,5]	0,5 [0,2 ; 1,5]	0,8 [0,4 ; 1,5]
Coule d'œuf / <i>Salmonella enteritidis</i> 2532	0,5 [0,2 ; 1,6]	0,5 [0,2 ; 1,6]	0,5 [0,2 ; 1,6]
Bouchées pour chien / <i>Salmonella agona</i> A00V038	0,3 [0,1 ; 1,1]	0,3 [0,1 ; 1,1]	0,2 [0,1 ; 0,7]
Eau de process / <i>Salmonella derby</i> A00E084	0,4 [0,2;1,1]	0,4[0,2;1,1]	0,4[0,2;1,1]

Tableau 21 - Valeurs des niveaux de détection relatifs obtenus pour le protocole court d'enrichissement (standard II)

Couple (souche / matrice)	Niveau de détection relatif (UFC/25 g ou 25 ml)	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Viande de bœuf hachée crue / <i>Salmonella infantis</i> 128	0,4 [0,1 ; 1,4]	0,4 [0,1 ; 1,4]

Tableau 22 - Valeurs des niveaux de détection relatifs obtenus pour le protocole « simplifié II »

Couple souche / matrice	Niveau de détection relatif (UFC/25 g ou 25 ml)	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Viande de bœuf hachée crue / <i>Salmonella infantis</i> 128	0,2 [0,1 ; 0,7]	0,2 [0,1 ; 0,7]
Steak haché / <i>Salmonella Typhimurium</i> A00V0060	0,3 [0,1 ; 1,2]	0,3 [0,1 ; 1,2]


Les niveaux de détection de la méthode alternative (quel que soit le protocole testé) sont similaires à ceux de la méthode de référence.

2.7 Inclusivité et exclusivité

2.7.1 Protocoles d'essai (Inclusivité)

 Etude réalisée en 2007 et 2008

- **Protocole long pour l'inclusivité (standard I)** : 50 souches *Salmonella* ont été décongelées et mises en culture en bouillon BHI à 37°C. Les souches ont été inoculées à un taux compris entre 10 et 100 cellules pour 225 ml d'eau peptonée tamponnée. Les protocoles complets de la méthode iQ-Check™ *Salmonella* II ont ensuite été appliqués.
- **Protocole court pour l'inclusivité (standard II)** : 106 souches *Salmonella* ont été décongelées et mises en culture en bouillon BHI à 37°C. Les souches ont été inoculées à un taux d'environ 100 cellules pour 225 ml d'eau peptonée incubée 8 h à 37°C.

 Etude réalisée en 2004 par l'Institut Pasteur de Lille

Pour chacune des souches de *Salmonella*, une culture en eau peptonée tamponnée a été réalisée, à partir de laquelle une nouvelle eau peptonée tamponnée a été inoculée avec environ 10 *Salmonella* par ml et incubée 20 h avant réalisation du test iQ-Check™ *Salmonella*.

Le protocole alternatif a également été testé en réalisant une incubation de l'eau peptonée tamponnée de 17 h, suivi d'un repiquage en eau peptonée tamponnée et d'une seconde incubation de 3 heures, avant réalisation du test iQ-Check™ *Salmonella*.

2.7.2 Protocoles d'essai (Exclusivité)

Les souches négatives ont été décongelées et mises en culture en bouillon BHI à 37°C. Les souches ont ensuite été inoculées à un taux de 10^5 UFC/225 ml d'eau peptonée tamponnée. Les protocoles complets de la méthode iQ-Check™ *Salmonella* ont ensuite été appliqués.


2.7.3 Résultats

Les résultats des études réalisées 2007-2008 sont donnés en annexe 6.

- **Inclusivité :**

 Etude réalisée en 2007 - 2008

Sur les 50 souches testées, toutes ont donné un résultat positif par la méthode iQ-Check™ *Salmonella* II, quel que soit le protocole testé (standard ou simplifié). Les 106 souches testées avec le protocole court d'enrichissement ont donné un résultat PCR positif.


 Etude réalisée en 2004 (Institut Pasteur de Lille)

Les 31 souches de *Salmonella* testées ont répondu positivement. Néanmoins, une souche de *Salmonella arizonae* a répondu négativement par le protocole alternatif lors d'un premier essai, alors qu'elle avait répondu positivement par le protocole général. Un second essai a été réalisé avec cette même souche, en essayant d'augmenter le niveau de contamination initial de l'eau peptonée tamponnée. La souche a alors répondu positivement. En parallèle, la méthode de référence a été réalisée et a permis d'isoler cette salmonelle sur géloses sélectives.

- **Exclusivité :**

 Etude réalisée en 2007

Les 30 souches testées ont donné un résultat négatif par la méthode iQ-Check™ *Salmonella* II, quel que soit le protocole testé (standard ou simplifié).

 Etude réalisée en 2004 (Institut Pasteur de Lille)

Les 31 souches non *Salmonella* ont toutes répondu négativement.

La méthode iQ-Check™ *Salmonella* II est spécifique et sélective.

3 ETUDES INTERLABORATOIRES

Lors de la reconduction de la validation ISO 16140 de la méthode iQ-Check™ *Salmonella* II, il a été convenu d'organiser une nouvelle étude interlaboratoire, les résultats de la première étude ayant été obtenus avec une version précédente de la méthode alternative.

Les résultats de ces deux études sont présentés dans le rapport de synthèse

3.1 Etude menée avec le kit iQ-Check™ *Salmonella* II (étude réalisée en 2008 par ADRIA Développement)

3.1.1 Mise en œuvre

19 laboratoires ont participé à l'étude. L'étude a porté sur du lait pasteurisé inoculé par *Salmonella Typhimurium* 305. Chaque laboratoire a reçu 24 échantillons (répartis sur 3 niveaux) à analyser à la fois par la méthode de référence et la méthode alternative.

Pour le test iQ-Check *Salmonella* II, le protocole simplifié I a été mis en œuvre par les laboratoires participants.

3.1.2 Contrôles des paramètres expérimentaux

✓ *Taux de contamination obtenus après contamination artificielle*

Les taux de contamination obtenus dans la matrice sont donnés dans le tableau suivant :

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (bactéries / 25g)	Taux réel	Estimation de la limite supérieure de la contamination (25 g échantillon)	Estimation de la limite supérieure de la contamination
1	3 - 7 - 8 - 13 - 17 - 20 - 21 - 24	0	0	/	/
2	1 - 4 - 5 - 10 - 12 - 15 - 18 - 23	5	8,2	7,1	9,4
3	2 - 6 - 9 - 11 - 14 - 16 - 19 - 22	25	36,2	31,4	41,6

✓ *Stabilité des échantillons*

Le dénombrement a été réalisé sur trois échantillons pour le taux d'inoculation fort. Une recherche a été réalisée pour le taux d'inoculation faible sur trois échantillons. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Jour	UFC/25 g (XLD)			Recherche / 25 g		
	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3
J0	38	45	30	+	+	+
J1	33	43	33	+	+	+

Aucune évolution de la souche inoculée n'est observée après 24 h de conservation des échantillons à 4°C.

✓ *Température relevée au cours du transport, température à réception et délais de réception*

Les températures au cours du transport et mesurées à réception, ainsi que le délai de réception des échantillons sont donnés dans le Tableau 23.

Tableau 23 - Température des échantillons à réception

Laboratoires	Température relevée par le thermobouton (°C)	Température mesurée à réception (°C)	Date de réception des échantillons
A	4,0	6,5	J1
B	3,0	3,1	J1
C	2,5	13,5	J1
D	2,5	4,1	J1
E	4,5	8,0	J2
F	3,5	8,4	J1
G	4,0	7,0	J1
H	1,5	4,3	J1
I	-40,0 ?	3,4	J1
J	4,0	5,1	J1
K	2,0	7,9	J1
L	2,0	5,4	J1
M	3,0	9,4	J1
N	2,0	10,0	J1
O	4,5	5,4	J1
P	3,0	9,5	J1
Q	2,5	6,0	J1
R	2,5	8,5	J1
S	3,0	5,5	J1

✓ *Conclusion*

Le laboratoire E a reçu ses échantillons le mercredi 22 octobre 2008, soit à J2. Ces résultats n'ont donc pas été pris en compte.

Les laboratoires C, M, N, P et R ont relevé une température supérieure à 8,4°C à réception ; après vérification de l'enregistrement des thermoboutons, il s'avère que les températures étaient inférieures.

Le thermobouton du laboratoire I était défectueux, la température mesurée à réception était correcte.

3.1.3 Résultats des analyses

✓ *Dénombrement de la flore aérobie mésophile*

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile de la matrice a été effectué sur un échantillon selon la méthode ISO 4833. Les résultats varient entre $1,7 \cdot 10^6$ et $1,6 \cdot 10^8$ UFC/ml.

✓ *Résultats obtenus par le laboratoire expert*

Tous les échantillons inoculés au taux fort ont donné un résultat positif par les deux méthodes.

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	0/8	0/8
L1	8/8	8/8
L2	8/8	8/8

✓ *Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs*

Les résultats de tous les laboratoires ayant réalisé les analyses sont reportés dans les tableaux suivants :

Tableau 24 - Résultats positifs obtenus par la méthode de référence

Laboratoire	L0	L1	L2
A	2/8	8/8	8/8
B	5/8	8/8	8/8
C	3/8	8/8	8/8
D	0/8	8/8	8/8
E	0/8	8/8	8/8
F	4/8	8/8	8/8
G	0/8	8/8	8/8
H	0/8	8/8	8/8
I	5/8	8/8	8/8
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	7/8	8/8	8/8
M	6/8	8/8	8/8
N	2/8	8/8	8/8
O	0/8	8/8	8/8
P	5/8	8/8	8/8
Q	8/8	8/8	8/8
R	0/8	8/8	8/8
S	0/8	8/8	8/8

Tableau 25 - Résultats positifs obtenus par la méthode alternative

Laboratoire	L0	L1	L2
A	2/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	0/8	8/8	8/8
D	0/8	8/8	8/8
E	0/8	8/8	8/8
F	0/8	8/8	8/8
G	0/8	8/8	8/8
H	0/8	8/8	8/8
I	2/8	8/8	8/8
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	2/8	8/8	8/8
M	5/8	8/8	8/8
N	2/8	8/8	8/8
O	0/8	8/8	8/8
P	0/8	8/8	8/8
Q	8/8	8/8	8/8
R	0/8	8/8	8/8
S	0/8	8/8	8/8

Le laboratoire Q a rencontré un problème d'automate et a obtenu des résultats aberrants ; ce laboratoire n'a pas été retenu pour l'interprétation.

7 laboratoires ont obtenu, pour des échantillons non inoculés, des résultats positifs à la fois par la méthode de référence et la méthode alternative : il s'agit des laboratoires A, C, I, L, M, N et Q.

3 laboratoires ont obtenu des résultats positifs pour des échantillons non inoculés, uniquement par la méthode de référence : il s'agit des laboratoires B, F et P.

Enfin, 6 laboratoires ont obtenu des réactions PCR positives sur des échantillons témoins mais non confirmés : il s'agit des laboratoires B, D, G, K, N et S.

Il s'agit probablement d'inter-contaminations. Afin de confirmer cette hypothèse, les pulsotypes des isolats transmis par les laboratoires collaborateurs sont en cours d'analyse, et seront comparés à l'empreinte de la souche inoculée.

Afin de corrélérer ces inter-contaminations probables à des pratiques, une enquête a été menée auprès des laboratoires.

Un certain nombre de laboratoires utilise des micropipettes pour réaliser les repiquages en bouillon RVS et/ou MKTTn, et ainsi très probablement pour les prélèvements réalisés pour les extractions d'ADN ; ce genre de méthodologies peut entraîner des inter-contaminations entre les échantillons et expliquer un certain nombre des résultats observés.

Seuls trois laboratoires présentent des contaminations uniquement liées à des étapes analytiques moléculaires :

- le laboratoire D, avec une réaction PCR positive non confirmée,
- le laboratoire K, avec plusieurs réactions PCR positives non confirmées,
- le laboratoire S, avec une réaction PCR positive non confirmée.

Il semblerait ainsi que de nombreuses inter-contaminations soient davantage liées à des pratiques en analyse microbiologique, plutôt que directement liées aux étapes d'analyse moléculaire.

✓ *Conclusion*

L'interprétation a donc été réalisée avec les 10 laboratoires ayant effectué le moins d'inter-contaminations : il s'agit des laboratoires A, D, G, H, J, K, N, O, R et S.

3.1.4 Calculs✓ *Calcul des pourcentages de spécificité (%SP) et de sensibilité (%SE) pour les deux méthodes*

Le pourcentage de spécificité, pour le niveau L0 et pour chaque méthode, est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$SP = \left[1 - \left(\frac{FP}{N-} \right) \times 100\% \right]$$

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

Le pourcentage de sensibilité, pour chaque niveau de contamination positif et pour chaque méthode, est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$SE = \frac{TP}{N+} \times 100\%$$

avec : N+ = nombre total de tous les essais L1 ou L2
TP = nombre de vrais positifs

Les résultats sont reportés dans les tableaux suivants :

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	SP/SE %	LCL%	SP/SE %	LCL%
L0(SP)	95,0	89,0	95,0	89,0
L1(SE)	100,0	98,0	100,0	98,0
L2(SE)	100,0	98,0	100,0	98,0
L1+L2(SE)	100,0	98,0	100,0	98,0

✓ *Calcul de l'exactitude relative (AC)*

Les résultats pour tous niveaux confondus sont donnés ci-après :

Tableau 26 - Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence dans le cadre de l'étude interlaboratoire

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 164	PD = 0	164
-	ND = 0	NA = 76	76
Total	N+ = 164	N- = 76	N = 240

L'exactitude relative (AC), exprimée en pourcentage, est calculée à l'aide de l'équation suivante : $AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$

avec : N = nombre d'échantillons soumis à essai
 PA = nombre d'accords positifs
 NA = nombre d'accords négatifs

Les valeurs d'exactitude de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence ont été calculées pour chacun des niveaux et figurent dans les tableaux ci-après :

Niveau	AC %	LCL %
L0	100,0	98,0
L1	100,0	98,0
L2	100,0	98,0
L1 + L2	100,0	98,0
Total	100,0	98,0

✓ *Etude des résultats discordants*

Aucune discordance n'a été observée entre les deux méthodes.

3.1.5 Interprétation

✓ *Comparaison des valeurs d'exactitude relative, de spécificité et de sensibilité*

Les valeurs obtenues dans les deux parties de l'étude de validation (étude comparative des méthodes et étude interlaboratoire) sont reportées dans le tableau ci-après :

Tableau 27 - Comparaison des valeurs obtenues lors de l'étude interlaboratoire avec celles obtenues dans le cadre de l'étude comparative des méthodes, pour la méthode alternative

	Etude interlaboratoire	Etude comparative des méthodes
Exactitude relative (AC)	100,0	98,9
Sensibilité (SE)	100,0	100,0
Spécificité (SP)	95,0	97,5

✓ *Degré d'accord (DA)*

Les résultats sont donnés en **Annexe 7**.

Les degrés d'accord pour la méthode de référence et la méthode alternative et pour chaque niveau sont reportés ci-après :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	92,5	92,50
L1	100,0	100,0
L2	100,0	100,0

✓ *Concordance*

Les résultats sont donnés en **Annexe 8**.

Les pourcentages de concordance pour la méthode de référence et la méthode alternative, à chaque niveau, sont repris dans le tableau ci-après :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	90,3	90,3
L1	100,0	100,0
L2	100,0	100,0

✓ *Odds Ratio (COR)*

Il est calculé selon la formule suivante :

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

Les Odds ratio pour la méthode de référence et la méthode alternative sont donnés ci-après :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	1,0	1,0
L1	1,0	1,0
L2	1,0	1,0

✓ *Conclusion*

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

3.2 Etude interlaboratoire menée avec le kit iQ-Check™ *Salmonella* II (étude réalisée en 2004 par l'Institut Pasteur de Lille)

3.2.1 Mise en œuvre

16 laboratoires participaient à cette étude.

Une matrice "lait pasteurisé" a été utilisée pour la réalisation de l'étude interlaboratoire. La flore naturelle présente dans la matrice est de l'ordre de $9,1 \cdot 10^2$ cellules par mL.

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

Pour le test iQ-Check *Salmonella*, le protocole standard I, avec un enrichissement en 20 h, a été mis en œuvre par les laboratoires participants.

3.2.2 Contrôles des paramètres expérimentaux

✓ Taux de contamination obtenus

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

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (b/25ml)	taux réel (b/25ml d'échantillon)	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	1-4-7-10-15-16-21-22	0	0	/	/
Niveau bas	2-5-8-11-14-17-20-23	3	2,5	1,3	4,5
Niveau haut	3-6-9-12-13-18-19-24	30	23,5	14,8	35,3

✓ Stabilité des échantillons

Le suivi du niveau de contamination en salmonelles a été réalisé pendant 5 jours après envoi, dans du lait pasteurisé, sur des échantillons contaminés au taux le plus fort.

Ces résultats montrent une stabilité de la souche dans le lait pasteurisé.

✓ Températures à réception et état des échantillons

Les températures à réception obtenues par les laboratoires variaient de 2,4°C à 6,0°C. Elles étaient conformes aux exigences (entre 0°C et 8°C) pour les 16 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 restent inférieures ou égales à la température de réception des échantillons.

Un laboratoire n'a pas pu réaliser les analyses le jour de la réception des échantillons, le colis étant arrivé vers 20 heures.

Un laboratoire nous a signalé des fuites sur ses échantillons et ses analyses ont donc été annulées.

✓ *Résultats du laboratoire expert*

Les échantillons non contaminés ont été retrouvés négatifs par les deux méthodes (ISO 6579 et iQ-Check™ *Salmonella* II).

Les échantillons contaminés ont été retrouvés positifs par les deux méthodes (ISO 6579 et iQ-Check™ *Salmonella* II).

La concordance entre les deux méthodes est de 100%.

✓ *Résultats des laboratoires collaborateurs*

15 laboratoires ont réalisé les analyses, mais les résultats de deux laboratoires ont été annulés suite à des fuites des échantillons au cours du transport pour l'un, et au cours de l'incubation pour l'autre.

- Dénombrement de la flore aérobie mésophile du lait pasteurisé

Un flacon de lait pasteurisé était fourni à l'ensemble des laboratoires afin qu'ils réalisent le dénombrement des microorganismes aérobies mésophiles présents dans le lait.

Les dénombrements obtenus varient entre « moins de 1 UFC/ml » et « 2 000 UFC/ml ».

- Résultats des recherches de *Salmonella*

D'une manière générale, les résultats obtenus par la méthode alternative après confirmation, pour les 13 laboratoires retenus, sont concordants avec ceux obtenus avec la méthode de référence.

Seul un laboratoire a retrouvé un des échantillon contaminé au faible taux, positif par la méthode de référence sur le seul milieu XLT4 isolé à partir du bouillon RVS et, négatif par la méthode alternative.

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	128	120	104	104	104	0	0
1	128	120	104	7	8	97	96
2	128	120	104	0	0	104	104

* un laboratoire n'a pas réalisé les analyses

** les résultats de deux laboratoires ont été annulés suite à des fuites

3.2.3 Calculs

- ✓ *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 = 93,3%	88%	SE = 92,3%	88%
Niveau L2	SE = 100%	98%	SE = 100%	98%
Niveaux L1 et L2	SE = 96,6%	93%	SE = 96,2%	93%

* : low critical limit

- ✓ *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 = 200	Déviaton positive (R-/A+) PD = 0	200
Méthode alternative négative (A-)	Déviaton négative (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 111	112
Total	(N+) = 201	(N-) = 111	N = 312

Donc, AC = 99,7%

Les valeurs d'exactitude relative de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence ont été calculées pour chacun des niveaux et figurent dans le tableau ci-dessous.

	Exactitude relative (AC)	
		LCL*
Niveau L0	100%	98%
Niveau L1	99%	98%
Niveau L2	100%	98%
Niveau L1 + L2	99,5%	98%
Total	AC = 99,7%	98%

* : low critical limit

Etude des résultats discordants : un seul résultat étant discordant entre les deux méthodes, il n'existe donc pas de test statistique pour vérifier l'équivalence des méthodes pour le rapport sensibilité spécificité.

3.2.4 Interprétation

- ✓ *Comparaison des valeurs de AC, SE et SP obtenues dans l'étude interlaboratoire et dans l'étude comparative des méthodes pour la méthode alternative*

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

	Etude interlaboratoire	Etude comparative des méthodes
Exactitude relative (AC)	99,7%	99,3%
Sensibilité (SE)	96,2%	98,9%
Spécificité (SP)	100,0%	99,6%

Les valeurs obtenues suite à l'étude interlaboratoire sont comparables à celles obtenues lors de l'étude comparative des méthodes.

- ✓ *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.

	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau L0	DA = 100%	DA = 100%
Niveau L1	DA = 89%	DA = 87%
Niveau L2	DA = 100%	DA = 100%

✓ *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.

	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau L0	Concordance = 100%	Concordance = 100%
Niveau L1	Concordance = 86,9%	Concordance = 85,2%
Niveau L2	Concordance = 100%	Concordance = 100%

✓ *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 = 1,18	COR = 1,17
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. Mais il convient de vérifier si les valeurs supérieures à 1,00 résultent ou non de variations dues au hasard. Ici, les résultats sont répartis de telle sorte que les variations interlaboratoires sont dues au hasard.

4 PRATICABILITE

✓ **Mode de conditionnement des éléments de la méthode**

Les éléments sont donnés dans la notice. Le kit est constitué de :

- réactif de lyse
- sondes fluorescentes
- solution d'amplification
- contrôle PCR négatif
- contrôle PCR positif

✓ **Volume de réactifs**

Les volumes des réactifs sont indiqués sur chaque flacon ou tube de réactif et dans la notice.

✓ **Conditions de stockage des éléments et péremption des produits non ouverts**

La température de stockage est indiquée sur le kit et dans la notice ; elle est de 2 - 8°C. La date de péremption est indiquée sur le kit, ainsi que sur chaque flacon ou tube de réactif.

✓ **Modalités d'utilisation après première utilisation**

Les réactifs sont utilisés jusqu'à épuisement.

✓ **Equipements et locaux spécifiques nécessaires**

Le matériel et les consommables nécessaires sont indiqués dans la notice.

✓ **Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer**

La préparation du mélange réactionnel PCR est décrite dans la notice. Les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

✓ **Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode**

Un technicien connaissant les techniques de microbiologie et biologie moléculaire peut être formé en 1 jour.

✓ **Temps réel de manipulation (pour une série de 30 échantillons)
(en minutes)**

Etapas	Méthode de référence ISO 6579		Méthode alternative iQ Check™ <i>Salmonella</i> II Protocole standard		Méthode alternative iQ Check™ <i>Salmonella</i> II Protocole simplifié	
	15 éch.	30 éch.	15 éch.	30 éch.	15 éch.	30 éch.
Prélèvement, ajout de diluant, broyage	38	75	38	75	38	75
Prélèvement, enrichissement			15	30	15	30
Extraction			23	45	10	20
PCR			25	40	22	35
Repiquage en RVS et MKTTn	25	50				
Isolement sur géloses sélectives	30	60				
Lecture des géloses	30	60				
Total échantillons négatifs	123	245	101	190	85	160
Total / échantillon négatif	8,2	8,2	6,7	6,3	5,7	5,3
Repiquage en RVS et MKTTn			25	50	25	50
Isolement sur géloses sélectives			60	120	60	120
Lecture des géloses			30	60	30	60
Isolement sur gélose nutritive	15	30	15	30	15	30
Confirmations	75	150	75	150	75	150
Total échantillons positifs	213	425	306	600	290	570
Total / échantillon positif	14,2	14,2	20,4	20	19,3	19

La méthode iQ Check™ *Salmonella* II permet un gain de temps de manipulation au niveau du screening d'échantillons (obtention de résultats négatifs ou positifs présomptifs). Il faut 1,5 fois moins de temps de manipulation pour obtenir un résultat négatif par la méthode iQ Check™ *Salmonella* II en protocole simplifié que par la méthode de référence.

✓ Délai d'obtention des résultats

Pour les échantillons négatifs, les délais d'obtention des résultats sont les suivants :

Etapes	Méthode de référence ISO 6579	Méthode alternative iQ-Check™ <i>Salmonella II</i>	Méthode alternative iQ-Check™ <i>Salmonella II</i> Protocole court
Pré-enrichissement	J0	J0	J0
Enrichissement	J1		
Extraction, réalisation du test PCR, obtention du résultat		J1	J0
Isolement	J2		
Lecture des isolements	J3		

Pour les échantillons positifs ou présentant des colonies suspectes, les délais d'obtention des résultats sont les suivants :

Etapes	Méthode de référence ISO 6579	Méthode alternative iQ-Check™ <i>Salmonella II</i>	Méthode alternative iQ-Check™ <i>Salmonella II</i> Protocole court
Pré-enrichissement	J0	J0	J0
Enrichissement	J1	J1	
Extraction, réalisation du test PCR		J1	J0
Isolement	J2	J2	J2
Lecture des isolements	J3	J3	J3
Tests de confirmation	J4 à J6	J4 à J6	J4 à J6

✓ Type de qualification de l'opérateur

Technicien qualifié en microbiologie et biologie moléculaire

✓ Etapes communes avec la méthode de référence

L'étape de pré-enrichissement, ainsi que toutes les étapes de confirmation sont communes.

✓ Traçabilité des résultats

La traçabilité est celle habituellement appliquée dans un laboratoire de microbiologie. Les résultats sont conservés sous forme de fichiers informatiques.

✓ Maintenance par le laboratoire

Aucune maintenance n'est effectuée sur le thermocycleur par le laboratoire.

L'utilisation de la méthode iQ Check™ *Salmonella* II permet un gain de temps de manipulation, en particulier avec le protocole simplifié.

La méthode iQ Check™ *Salmonella* II permet d'obtenir un résultat négatif ou présumé dans la journée dans le cas de l'application du protocole court pour les viandes crues, ou en 24 h pour l'application du protocole long, contre 72 h par la méthode de référence.

5 CONCLUSION

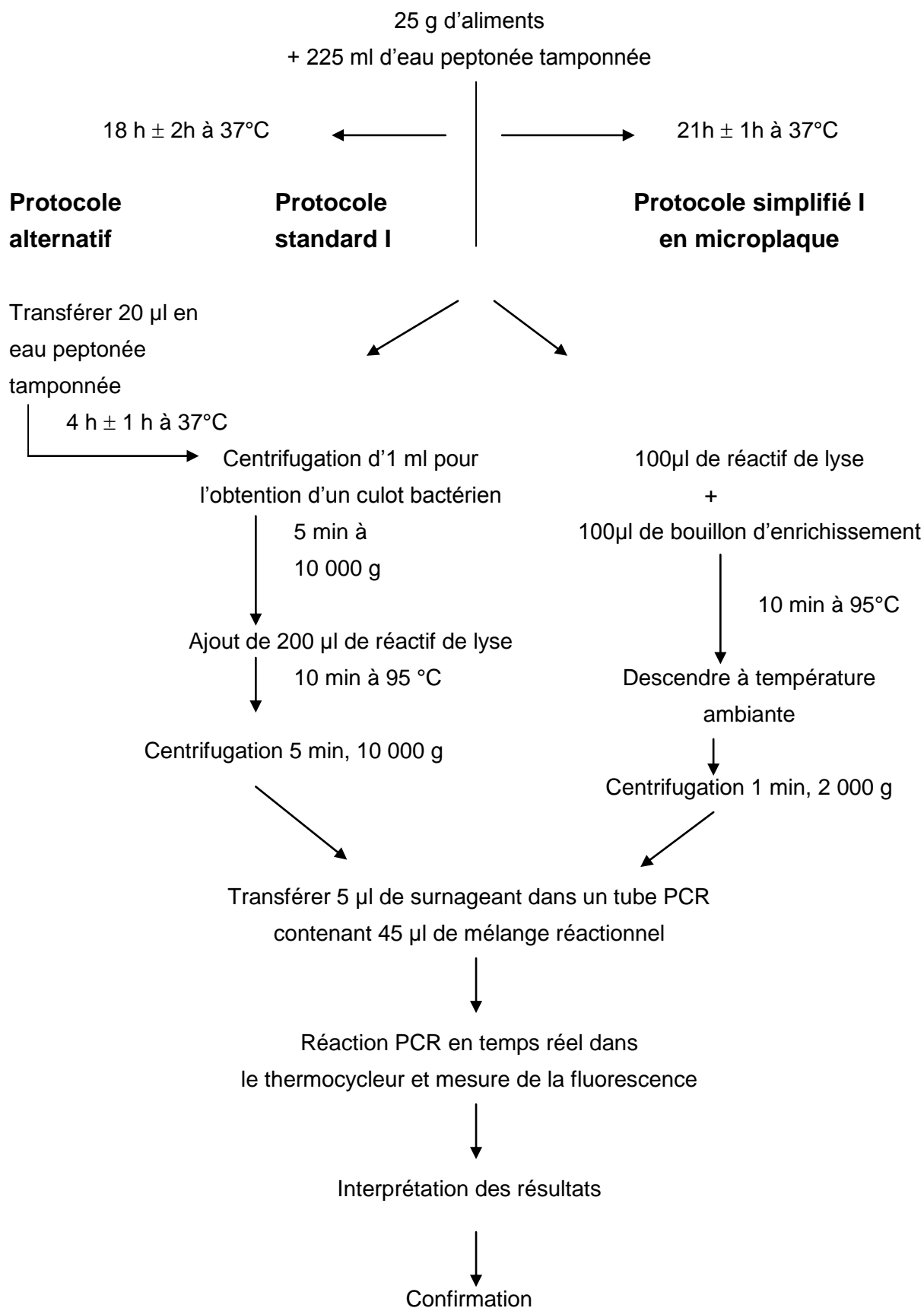
Les **conclusions pour l'étude comparative des méthodes** sont les suivantes :

- ✓ L'exactitude relative, la sensibilité relative et la spécificité relative de la méthode iQ Check™ *Salmonella* II apparaissent équivalentes à celles de la méthode de référence.
- ✓ Les niveaux de détection de la méthode alternative sont similaires à ceux de la méthode de référence.
- ✓ La méthode iQ Check™ *Salmonella* II est spécifique et sélective.
- ✓ L'utilisation de la méthode iQ Check™ *Salmonella* II permet un gain de temps de manipulation, en particulier avec le protocole simplifié.
- ✓ La méthode iQ Check™ *Salmonella* II permet d'obtenir un résultat négatif ou présomptif en 24 h, contre 72 h par la méthode de référence.
- ✓ La méthode iQ-Check™ *Salmonella* II dans les produits carnés montre une exactitude, une spécificité, une sensibilité et un niveau de détection relatifs satisfaisants.

Les **conclusions pour l'étude interlaboratoire** sont les suivantes :

- ✓ La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, Odds ratio) apparaît dans tous les cas équivalente à celle de la méthode de référence.

Annexe 1 - Méthode alternative iQ Check™ *Salmonella* II



**Annexe 2 - Méthode alternative : protocole spécifique
pour les viandes crues (protocole court standard II)**

25 g + 225 ml d'EPT préchauffée à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$



Enrichissement de $10\text{h} \pm 2\text{h}$, à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$



Extraction protocole standard
avec broyage mécanique (« standard II »)



PCR



Confirmation :

Cas 1 : tests de la méthode de référence

ou

Cas 3 : méthode alternative validée ISO 16140

**Annexe 3 - Méthode alternative : protocole alternatif d'extraction
pour les viandes crues de bœuf (protocole simplifié II)**

25 g + 225 ml d'Eau Peptonée Tamponnée
préchauffée à 37°C ± 1°C



21 h ± 1h à 37°C ± 1°C



Protocole simplifié II

Dans un 1 tube

100 µl réactif de lyse (A + F)

+ 100 µl EPT agitée puis décantée



Disruptor Genie

(3 min ± 1 min)



95 - 100°C, 10-15 min



Centrifuger 2 min

10 000 - 12 000 g



PCR sur 5 µl

d'extrait d'ADN

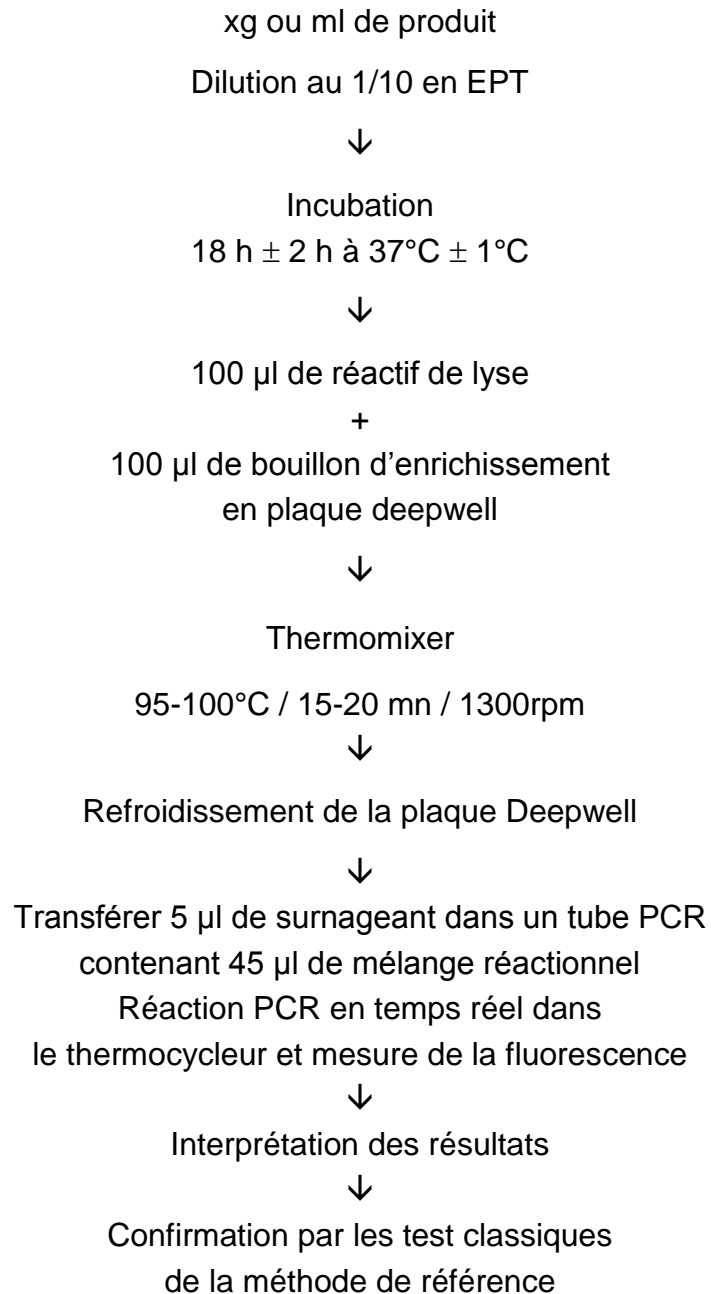
Confirmation :

Cas 1 : tests de la méthode de référence

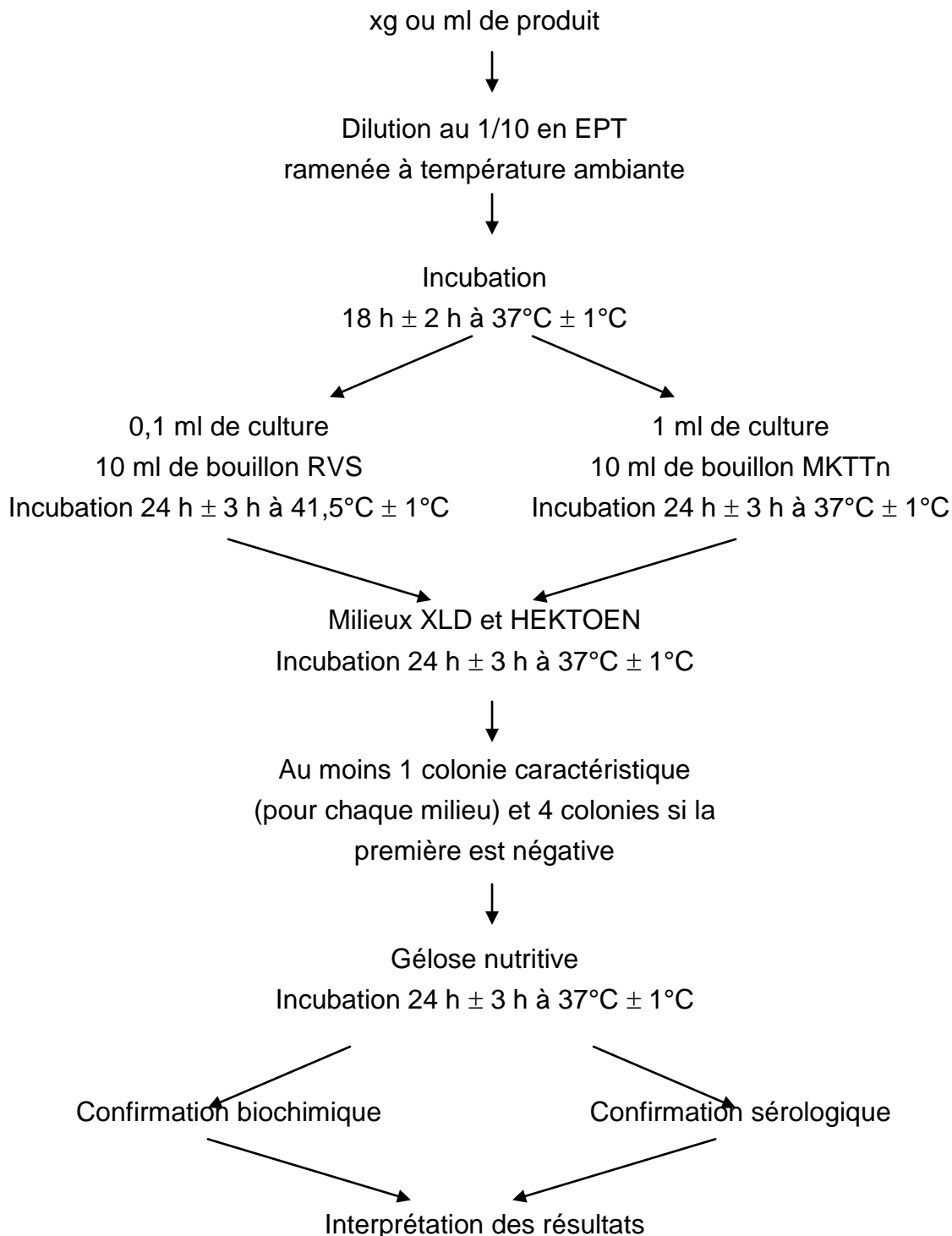
ou

Cas 3 : méthode alternative validée ISO 16140

**Annexe 4 - Méthode alternative : Easy Extraction II Deepwell Protocol
pour les produits carnés (protocole simplifié II)**



Annexe 5 - Méthode de référence
ISO 6579 : 2002 : Microbiologie des aliments
Méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella*



Annexe 6 - Résultats de l'inclusivité et de l'exclusivité (Etude réalisée en 2007-2008)

Protocoles standard et simplifié (*étude réalisée en 2007 et 2008*)

	Souches positives			iQ-Check Salmonella II					
	Souche	Référence	Origine	Protocole standard			Protocole simplifié		
				Ct CI	Ct FAM	Résultat	Ct CI	Ct FAM	Résultat
1.	<i>Salmonella arizonae</i>	Ad 450	Lait de brebis	35,35	28,47	+	35,84	30,13	+
2.	<i>Salmonella arizonae</i>	Ad478	Palourdes	N/A	22,37	+	N/A	22,43	+
3.	<i>Salmonella bovis morbificans</i>	adria 132	Poitrine fumée crue	N/A	17,83	+	47,48	19,97	+
4.	<i>Salmonella bovis morbificans</i>	adria 6629	Chipolatas	N/A	17,35	+	44,01	19,32	+
5.	<i>Salmonella Brandenburg</i>	adria 499	Saucisse de Toulouse	41,51	16,17	+	41,18	18,43	+
6.	<i>Salmonella branderup</i>	adria 111	VSM de porc	43,51	16,77	+	42,41	18,42	+
7.	<i>Salmonella bredeney</i>	adria 141	Crépinette	N/A	17,64	+	46,39	19,26	+
8.	<i>Salmonella bredeney</i>	adria 464	Pâté de tête	N/A	17,15	+	49,13	19,64	+
9.	<i>Salmonella derby</i>	adria 374	Chipolatas	47,13	16,68	+	39,4	18,84	+
10.	<i>Salmonella derby</i>	adria 17	Produit carné	46,98	18,12	+	39,45	20,78	+
11.	<i>Salmonella enteritidis</i>	adria 657	Coule d'œuf	N/A	18,49	+	N/A	19,89	+
12.	<i>Salmonella enteritidis</i>	adria 2532	Jambon cuit	N/A	17,44	+	46,4	19,35	+
13.	<i>Salmonella enteritidis</i>	aAdria 10	Poudre de blanc d'œuf	N/A	18,81	+	N/A	20,13	+
14.	<i>Salmonella gallinarum</i>	adria 1	Volaille	37,79	22,24	+	45,69	21,12	+
15.	<i>Salmonella gallinarum</i>	Ad 300	Volaille	36,83	23,22	+	N/A	24,71	+
16.	<i>Salmonella hadar</i>	aAdria 35	Volaille	N/A	17,57	+	48,22	19,28	+
17.	<i>Salmonella hadar</i>	adria 24871	Blanc de poulet	48,6	16,78	+	45,73	19,38	+
18.	<i>Salmonella heidelberg</i>	adria 36	Volaille	40,67	21,48	+	N/A	19,73	+
19.	<i>Salmonella heidelberg</i>	adria 285	Farce de tomate	48,16	17,03	+	47,58	19,55	+
20.	<i>Salmonella heidelberg</i>	adria 24876	Blanc de poulet	N/A	17,52	+	47,35	19,57	+
21.	<i>Salmonella Indiana</i>	adria 2	Farine de poisson	45,39	19,21	+	39,55	22,08	+
22.	<i>Salmonella infantis</i>	adria 14	Coule d'œuf	45,98	16,16	+	41,08	19,19	+
23.	<i>Salmonella infantis</i>	adria 401B	Lait cru	46,72	15,86	+	43,98	19,15	+
24.	<i>Salmonella infantis</i>	128	Steak haché	N/A	16,45	+	41,12	19,31	+
25.	<i>Salmonella kottbus</i>	aAdria 1	Volaille	28,88	16,23	+	32,41	19,76	+
26.	<i>Salmonella london</i>	adria 34	Aliment	26,09	15,95	+	28,39	19,39	+
27.	<i>Salmonella london</i>	adria 326	Epaule cuite	26,73	15,34	+	20,29	19,18	+
28.	<i>Salmonella mbandaka</i>	adria 81	Coule d'œuf	26,03	15,52	+	28,69	19,01	+
29.	<i>Salmonella montevideo</i>	adria 510	Lait cru	26,58	15,52	+	29	18,92	+
30.	<i>Salmonella newport</i>	adria 540	Saucisse de Toulouse	26,56	15,99	+	29,13	19,43	+
31.	<i>Salmonella newport</i>	adria 586	Carcasse de bœuf	29,23	16,54	+	28,59	19,49	+

	Souches positives			iQ-Check Salmonella II					
	Souche	Référence	Origine	Protocole standard			Protocole simplifié		
				Ct CI	Ct FAM	Résultat	Ct CI	Ct FAM	Résultat
32.	<i>Salmonella newington</i>	adria 26	Produit laitier	28,91	15,88	+	29,76	19,28	+
33.	<i>Salmonella panama</i>	adria 8	Steak haché	27,05	16,62	+	30,74	20,18	+
34.	<i>Salmonella panama</i>	adria 882	Chipolatas aux herbes	26,52	16,47	+	29,88	19,93	+
35.	<i>Salmonella paratyphi A</i>	ATCC 11511		26,33	20,48	+	31,24	19,97	+
36.	<i>Salmonella paratyphi B</i>	Ad 301	Humaine	25,92	16,53	+	28,22	18,98	+
37.	<i>Salmonella paratyphi C</i>	ATCC 13428		26,6	16,86	+	28,69	18,36	+
38.	<i>Salmonella St Paul</i>	adria 631	Volaille	26,77	16,74	+	27,91	19,27	+
39.	<i>Salmonella St Paul</i>	F31	Poisson	27,92	16,03	+	27,66	19,44	+
40.	<i>Salmonella seftenberg</i>	adria 1	Environnement	27,71	15,7	+	28,15	19,41	+
41.	<i>Salmonella seftenberg</i>	Ad 355	Coquillage	25,05	15,63	+	30,89	19,56	+
42.	<i>Salmonella tennessee</i>	A00E006	Environnement	26,8	15,74	+	30,64	21,12	+
43.	<i>Salmonella typhi</i>	Ad 302	Humaine	25,56	17,62	+	29,37	19,09	+
44.	<i>Salmonella typhimurium</i>	adria 305	Paella	26,65	16,75	+	27,57	19,15	+
45.	<i>Salmonella typhimurium</i>	adria 528	Saumure	25,12	15,59	+	27,4	19,03	+
46.	<i>Salmonella typhimurium</i>	adria 633	Pâte crue	25,65	15,73	+	28,35	19,45	+
47.	<i>Salmonella typhimurium</i>	adria 702	Saucisson sec	31,96	16,31	+	27,73	19,59	+
48.	<i>Salmonella virchow</i>	F276	Curry	26,72	15,93	+	28,48	19,81	+
49.	<i>Salmonella virchow</i>	CIP 105355		27,46	16,08	+	N/A	18,85	+
50.	<i>Salmonella worthington</i>	adria 3506	Terrine de pâté	26,51	15,6	+	28,72	19,88	+

□ **Protocole court pour viandes crues (Standard II) (étude réalisée en 2007 et 2008)**

	Souches Positives				Taux d'inoculation ufc/225ml	Ct CI	Ct FAM	Résultat
	Souche	Référence	Origine					
1	<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i>	Ad 450	Lait de brebis	192	38,53	36,36	+
2	<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i>	Ad 478	Palourdes	96	42,51	27,67	+
3	<i>Salmonella</i>	<i>Bovis morbificans</i>	Adria 132	Poitrine fumée crue	61	44,51	26,33	+
4	<i>Salmonella</i>	<i>Bovis morbificans</i>	Adria 6629	Chipolatas	109	N/A	21,24	+
5	<i>Salmonella</i>	<i>Brandenburg</i>	Adria 499	Saucisse de Toulouse	148	N/A	20,34	+
6	<i>Salmonella</i>	<i>Branderup</i>	Adria 111	VSM de porc	74	N/A	24,16	+
7	<i>Salmonella</i>	<i>Bredeney</i>	Adria 141	Crépinette	184	N/A	20,81	+
8	<i>Salmonella</i>	<i>Bredeney</i>	Adria 464	Pâté de tête	208	N/A	21,23	+
9	<i>Salmonella</i>	<i>Derby</i>	Adria 374	Chipolatas	310	N/A	19,58	+
10	<i>Salmonella</i>	<i>Derby</i>	Adria 17	Produit carné	186	N/A	22,51	+
11	<i>Salmonella</i>	<i>Enteritidis</i>	Adria 657	Coule d'œuf	131	41,52	24,35	+
12	<i>Salmonella</i>	<i>Enteritidis</i>	Adria 2532	Jambon cuit	138	N/A	21,72	+
13	<i>Salmonella</i>	<i>Enteritidis</i>	Adria 10	Poudre de blanc d'œuf	224	N/A	21,86	+
14	<i>Salmonella</i>	<i>Gallinarum</i>	Adria 1	Volaille	76	39,83	28,57	+
15	<i>Salmonella</i>	<i>Gallinarum</i>	Ad 300	Volaille	41	38,78	31,57	+
16	<i>Salmonella</i>	<i>Hadar</i>	aAdria 35	Volaille	259	N/A	20,62	+
17	<i>Salmonella</i>	<i>Hadar</i>	Adria 24871	Blanc de poulet	238	N/A	21,80	+
18	<i>Salmonella</i>	<i>Heidelberg</i>	Adria 36	Volaille	55	N/A	22,10	+
19	<i>Salmonella</i>	<i>Heidelberg</i>	Adria 285	Farce de tomate	69	N/A	20,67	+
20	<i>Salmonella</i>	<i>Heidelberg</i>	Adria 24876	Blanc de poulet	185	N/A	20,88	+
21	<i>Salmonella</i>	<i>Indiana</i>	Adria 2	Farine de poisson	106	39,27	29,61	+
22	<i>Salmonella</i>	<i>Infantis</i>	Adria 141	Coule d'œuf	84	N/A	19,98	+
23	<i>Salmonella</i>	<i>Infantis</i>	Adria 401B	Lait cru	132	40,48	25,91	+
24	<i>Salmonella</i>	<i>Infantis</i>	128	Steak haché	128	N/A	24,34	+
25	<i>Salmonella</i>	<i>Kottbus</i>	aAdria 10	Volaille	141	N/A	21,46	+
26	<i>Salmonella</i>	<i>London</i>	Adria 34	Aliment	213	N/A	20,69	+
27	<i>Salmonella</i>	<i>London</i>	Adria 326	Epaule cuite	135	N/A	24,49	+
28	<i>Salmonella</i>	<i>Mbandaka</i>	Adria 81	Coule d'œuf	64	40,23	25,75	+
29	<i>Salmonella</i>	<i>Montevideo</i>	Adria 510	Lait cru	208	N/A	21,68	+
30	<i>Salmonella</i>	<i>Newport</i>	Adria 540	Saucisse de Toulouse	120	N/A	20,09	+
31	<i>Salmonella</i>	<i>Newport</i>	Adria 586	Carcasse de bœuf	110	39,04	27,20	+
32	<i>Salmonella</i>	<i>Newington</i>	Adria 26	Produit laitier	102	N/A	19,97	+
33	<i>Salmonella</i>	<i>Panama</i>	Adria 81	Steak haché	157	N/A	22,61	+
34	<i>Salmonella</i>	<i>Panama</i>	Adria 882	Chipolatas aux herbes	205	N/A	24,25	+
35	<i>Salmonella</i>	<i>Paratyphi A</i>	ATCC 11511		27	37,73	36,48	+
36	<i>Salmonella</i>	<i>Paratyphi B</i>	Ad 301	Humaine	42	N/A	24,66	+
37	<i>Salmonella</i>	<i>Paratyphi C</i>	ATCC 13428		78	40,11	26,50	+
38	<i>Salmonella</i>	<i>Saintpaul</i>	Adria 631	Volaille	166	N/A	19,78	+

	Souches Positives			Taux d'inoculation ufc/225ml	Ct CI	Ct FAM	Résultat	
	Souche	Référence	Origine					
39	<i>Salmonella</i>	Saintpaul	F31	Poisson	85	N/A	25,29	+
40	<i>Salmonella</i>	Seftenberg	Adria 1	Environnement	86	N/A	20,08	+
41	<i>Salmonella</i>	Seftenberg	Ad 355	Coquillage	71	40,63	25,91	+
42	<i>Salmonella</i>	Tennessee	A00E006	Environnement	91	41,73	25,02	+
43	<i>Salmonella</i>	Typhi	Ad 302	Humaine	70	44,28	25,57	+
44	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	Adria 305	Paella	154	N/A	22,01	+
45	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	Adria 528	Saumure	132	N/A	21,29	+
46	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	Adria 633	Pâte crue	187	N/A	21,26	+
47	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	Adria 702	Saucisson sec	83	46,29	25,69	+
48	<i>Salmonella</i>	Virchow	F276	Curry	52	43,10	25,05	+
49	<i>Salmonella</i>	Virchow	CIP 105355		126	N/A	22,50	+
50	<i>Salmonella</i>	Worthington	Adria 3506	Terrine de pâté	121	N/A	21,62	+
51	<i>Salmonella</i>	Cerro	Ad 689	Protéine déshydratée de volaille	109	40,10	25,50	+
52	<i>Salmonella</i>	Kottbus	1	Volaille	131	N/A	21,44	+
53	<i>Salmonella</i>	Blockley	Ad923	Environnement poule	14	38,82	29,06	+
54	<i>Salmonella</i>	Havana	Ad930	Environnement poule	10	38,09	27,35	+
55	<i>Salmonella</i>	Napoli	Ad928	Bovin	8	36,81	31,46	+
56	<i>Salmonella</i>	Kedougou	Ad929	Environnement bovin	8	37,73	30,30	+
57	<i>Salmonella</i>	Agona	adria 4869	Saucisses fumées	193	N/A	20,59	+
58	<i>Salmonella</i>	Agona	A00V038	Aliment pour porc	156	N/A	19,79	+
59	<i>Salmonella</i>	Anatum	adria 225	Produit alimentaire	145	N/A	21,11	+
60	<i>Salmonella</i>	Anatum	Ad 298	Poudre de lait	77	40,12	27,97	+
61	<i>Salmonella</i>	arizonae	CIP 5526		96	36,91	29,30	+
62	<i>Salmonella</i>	Binza	adria 27	Produit alimentaire	230	42,81	25,80	+
63	<i>Salmonella</i>	bongori	Ad 598	Atelier	166	38,05	29,89	+
64	<i>Salmonella</i>	bongori	Ad 599	Elevage de dinde	68	N/A	27,07	+
65	<i>Salmonella</i>	Bovis morbificans	adria 728	Gélatine	145	N/A	21,91	+
66	<i>Salmonella</i>	Brandenburg	Ad 351	Cocktail de fruits de mer	200	N/A	19,93	+
67	<i>Salmonella</i>	Branderup	ATCC BNA 664		124	N/A	20,57	+
68	<i>Salmonella</i>	Brando	adria 569	Chair à saucisse	93	40,32	27,40	+
69	<i>Salmonella</i>	Choleresuis	ATCC 51741		104	N/A	21,04	+
70	<i>Salmonella</i>	Ciemieu	adria 230	Lièvre	207	N/A	20,97	+
71	<i>Salmonella</i>	diarizonae	Ad 594	Cuisse de grenouille	100	39,30	40,00	+
72	<i>Salmonella</i>	diarizonae	Ad 595	Fromage	178	38,49	38,64	+
73	<i>Salmonella</i>	Dublin	adria 40	Environnement volaille	120	N/A	21,63	+
74	<i>Salmonella</i>	Dublin	Ad 531	Fromage au lait cru	219	N/A	22,15	+
75	<i>Salmonella</i>	Dublin	Ad 528	Pâte à galettes	144	N/A	21,90	+
76	<i>Salmonella</i>	Duisberg	adria 42	Environnement volaille	210	N/A	19,60	+
77	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	ATCC 13076		94	N/A	21,99	+
78	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	adria 465	Coule d'œuf	61	N/A	22,31	+
79	<i>Salmonella</i>	Essen	adria 38	Environnement volaille	117	N/A	22,03	+
80	<i>Salmonella</i>	Houtanae	Ad 596	Produit laitier	62	38,78	31,89	+
81	<i>Salmonella</i>	Houtanae	Ad 597	Chiquetaille de morue cuite	235	43,82	22,64	+

	Souches Positives			Taux d'inoculation ufc/225ml	Ct CI	Ct FAM	Résultat	
	Souche	Référence	Origine					
82	<i>Salmonella</i>	<i>indica</i>	Ad 600	Atelier	61	39,68	30,55	+
83	<i>Salmonella</i>	<i>Lagos</i>	adria 173	Chipolatas	123	42,13	26,02	+
84	<i>Salmonella</i>	<i>London</i>	Ad 499		28	45,03	24,34	+
85	<i>Salmonella</i>	<i>Lille</i>	adria 37	Environnement volaille	133	39,91	28,74	+
86	<i>Salmonella</i>	<i>Livingstone</i>	adria E1	White egg powder	135	N/A	21,83	+
87	<i>Salmonella</i>	<i>Manhattan</i>	adria 900	Poussière de laiterie	70	42,98	26,46	+
88	<i>Salmonella</i>	<i>Meleagridis</i>	adria 505	Lait cru	68	N/A	21,02	+
89	<i>Salmonella</i>	<i>Montevideo</i>	adria 327	Baudruche naturelle	163	N/A	21,88	+
90	<i>Salmonella</i>	<i>Montevideo</i>	adria 604	Lait cru	76	N/A	21,41	+
91	<i>Salmonella</i>	<i>Newbrunswick</i>	adria 436	Steak haché	87	39,41	27,10	+
92	<i>Salmonella</i>	<i>Newport</i>	adria 972	VSM de dinde	93	N/A	20,55	+
93	<i>Salmonella</i>	<i>Paratyphi A</i>	ATCC 9150		38	40,11	27,75	+
94	<i>Salmonella</i>	<i>Regent</i>	adria 328	Canard	22	39,09	29,14	+
95	<i>Salmonella</i>	<i>Rissen</i>	adria 59	Environnement volaille	275	N/A	20,83	+
96	<i>Salmonella</i>	<i>Saintpaul</i>	A00C001	Faisan	87	N/A	21,32	+
97	<i>Salmonella</i>	<i>salamae</i>	Ad 592	Filet de kangourou	106	38,12	30,01	+
98	<i>Salmonella</i>	<i>salamae</i>	Ad 593	Grain	98	38,61	34,55	+
99	<i>Salmonella</i>	<i>Salkensee</i>	adria 693	Chair à saucisse	107	N/A	22,39	+
100	<i>Salmonella</i>	<i>Sternshauze</i>	Ad 500		105	39,21	27,55	+
101	<i>Salmonella</i>	<i>Thompson</i>	AER 301	Volaille	103	39,59	26,73	+
102	<i>Salmonella</i>	<i>Typhimurium</i>	ATCC 13311	Produit alimentaire	92	N/A	23,12	+
103	<i>Salmonella</i>	<i>Typhimurium</i>	ST 391	Abattoir de porc	115	N/A	22,01	+
104	<i>Salmonella</i>	<i>Urbana</i>	Ad 501		61	43,03	22,01	+
105	<i>Salmonella</i>	<i>Veneziana</i>	adria 233	Produit alimentaire	75	40,31	28,16	+
106	<i>Salmonella</i>	<i>Wayne</i>	Ad 502		19	37,39	36,30	+

□ Etude réalisée en 2007 et 2008

Souches négatives				iQ-Check Salmonella					
Souche	Référence	Origine	Protocole standard			Protocole simplifié			
			Ct CI	Ct FAM	Résultat	Ct CI	Ct FAM	Résultat	
1.	<i>Citrobacter diversus</i>	adria 140	Lait cru	37,15	N/A	-	36,96	N/A	-
2.	<i>Citrobacter koseri</i>	CIP 8294T (ATCC 27156)		37,49	N/A	-	37,04	N/A	-
3.	<i>Citrobacter freundii</i>	adria 23	Saucisse de Toulouse	38,2	N/A	-	37,51	N/A	-
4.	<i>Citrobacter freundii</i>	59	Alimentaire	33,63	N/A	-	37,13	N/A	-
5.	<i>Citrobacter freundii</i>	adria 175	VSM de canard	38,41	N/A	-	37,05	N/A	-
6.	<i>Escherichia coli</i>	adria 2B	Saucisse	37,53	N/A	-	37,13	N/A	-
7.	<i>Escherichia coli</i>	adria 6	Saucisse	37,31	N/A	-	37,33	N/A	-
8.	<i>Escherichia coli</i>	adria 19	Carottes râpées	37,64	N/A	-	37,91	N/A	-
9.	<i>Escherichia coli</i>	CIP 54117		35,12	N/A	-	37,47	N/A	-
10.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	adria 6086T (ATCC 13048)	Alimentaire	38,01	N/A	-	37,79	N/A	-
11.	<i>Enterobacter agglomerans</i>	adria 11	Fromage	37,95	N/A	-	37,44	N/A	-
12.	<i>Enterobacter cloacae</i>	adria 10	Lait cru	37,52	N/A	-	37,17	N/A	-
13.	<i>Enterobacter cloacae</i>	adria 128	Steak haché	37,23	N/A	-	33,27	N/A	-
14.	<i>Enterobacter sakazakii</i>	adria 95	Fromage blanc	37,37	N/A	-	37,12	N/A	-
15.	<i>Enterobacter sakazakii</i>	adria D7	Volaille	37,15	N/A	-	33,43	N/A	-
16.	<i>Hafnia alvei</i>	adria 167	Saucisse	36,5	N/A	-	37,24	N/A	-
17.	<i>Hafnia alvei</i>	adria 168	VSM de canard	37,5	N/A	-	37,82	N/A	-
18.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	57	Alimentaire	36,28	N/A	-	37,41	N/A	-
19.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	42	Alimentaire	37,17	N/A	-	37,12	N/A	-
20.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIP 8291T (ATCC 13883)		37,1	N/A	-	36,98	N/A	-
21.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	Alimentaire	37,04	N/A	-	35,07	N/A	-
22.	<i>Proteus mirabilis</i>	adria 54	VSM de volaille	37,33	N/A	-	36,39	N/A	-
23.	<i>Proteus mirabilis</i>	55	Alimentaire	37,55	N/A	-	37,12	N/A	-
24.	<i>Proteus vulgaris</i>	56	Alimentaire	37,38	N/A	-	37,67	N/A	-
25.	<i>Serratia liquefaciens</i>	adria 5	Ovoproduit	37,57	N/A	-	37,1	N/A	-
26.	<i>Serratia proteomaculans</i>	A00C056	Jambon	35,11	N/A	-	34,19	N/A	-
27.	<i>Shigella sonnei</i>	CIP 51.1		37,44	N/A	-	37,47	N/A	-
28.	<i>Shigella sonnei</i>	CIP 8249T (ATCC 29930)		38,07	N/A	-	37,23	N/A	-
29.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	adria 32	Lardons	37,17	N/A	-	36,96	N/A	-
30.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIP 8027T (ATCC 9610)		37,06	N/A	-	33,5	N/A	-

Annexe 7 – Calcul du degré d'accord

Méthode de référence							
Niveau L0							
Laboratoire	Nombre de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Nombre de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
A	2	0,25	0,0625	6	0,75	0,5625	0,625
D	0	0	0	8	1	1	1
G	0	0	0	8	1	1	1
H	0	0	0	8	1	1	1
J	0	0	0	8	1	1	1
K	0	0	0	8	1	1	1
N	2	0,25	0,0625	6	0,75	0,5625	0,625
O	0	0	0	8	1	1	1
R	0	0	0	8	1	1	1
S	0	0	0	8	1	1	1
Moyenne							0,925
Degré d'accord							93%

Méthode alternative							
Niveau L0							
Laboratoire	Nombre de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Nombre de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
A	2	0,25	0,0625	6	0,75	0,5625	0,625
D	0	0	0	8	1	1	1
G	0	0	0	8	1	1	1
H	0	0	0	8	1	1	1
J	0	0	0	8	1	1	1
K	0	0	0	8	1	1	1
N	2	0,25	0,0625	6	0,75	0,5625	0,625
O	0	0	0	8	1	1	1
R	0	0	0	8	1	1	1
S	0	0	0	8	1	1	1
Moyenne							0,925
Degré d'accord							93%

Niveau L1							
Laboratoire	Nombre de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Nombre de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
A	8	1	1	0	0	0	1
D	8	1	1	0	0	0	1
G	8	1	1	0	0	0	1
H	8	1	1	0	0	0	1
J	8	1	1	0	0	0	1
K	8	1	1	0	0	0	1
N	8	1	1	0	0	0	1
O	8	1	1	0	0	0	1
R	8	1	1	0	0	0	1
S	8	1	1	0	0	0	1
Moyenne							1
Degré d'accord							100%

Niveau L1							
Laboratoire	Nombre de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Nombre de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
A	8	1	1	0	0	0	1
D	8	1	1	0	0	0	1
G	8	1	1	0	0	0	1
H	8	1	1	0	0	0	1
J	8	1	1	0	0	0	1
K	8	1	1	0	0	0	1
N	8	1	1	0	0	0	1
O	8	1	1	0	0	0	1
R	8	1	1	0	0	0	1
S	8	1	1	0	0	0	1
Moyenne							1
Degré d'accord							100%

Niveau L2							
Laboratoire	Nombre de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Nombre de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
A	8	1	1	0	0	0	1
D	8	1	1	0	0	0	1
G	8	1	1	0	0	0	1
H	8	1	1	0	0	0	1
J	8	1	1	0	0	0	1
K	8	1	1	0	0	0	1
N	8	1	1	0	0	0	1
O	8	1	1	0	0	0	1
R	8	1	1	0	0	0	1
S	8	1	1	0	0	0	1
Moyenne							1
Degré d'accord							100%

Niveau L2							
Laboratoire	Nombre de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Nombre de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
A	8	1	1	0	0	0	1
D	8	1	1	0	0	0	1
G	8	1	1	0	0	0	1
H	8	1	1	0	0	0	1
J	8	1	1	0	0	0	1
K	8	1	1	0	0	0	1
N	8	1	1	0	0	0	1
O	8	1	1	0	0	0	1
R	8	1	1	0	0	0	1
S	8	1	1	0	0	0	1
Moyenne							1
Degré d'accord							100%

Annexe 8 – Calcul de la concordance

Méthode de référence

Niveau LO

Nombre de laboratoires **10**

Nombre de résultats négatifs par laboratoire: 8

Laboratoire	Nombre de négatifs	Paires Interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
A	6	424	576
D	8	544	576
G	8	544	576
H	8	544	576
J	8	544	576
K	8	544	576
N	6	424	576
O	8	544	576
R	8	544	576
S	8	544	576
Total		5 200	5 760
Concordance		90,3%	

Total + 4

Total - 76

Niveau L1

Nombre de laboratoires **10**

Nombre de résultats positifs par laboratoire: 8

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires Interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
A	8	576	576
D	8	576	576
G	8	576	576
H	8	576	576
J	8	576	576
K	8	576	576
N	8	576	576
O	8	576	576
R	8	576	576
S	8	576	576
Total		5 760	5 760
Concordance		100,0%	

Total + 80

Total - 0

Niveau L2

Nombre de laboratoires **10**

Nombre de résultats positifs par laboratoire: 8

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires Interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
A	8	576	576
D	8	576	576
G	8	576	576
H	8	576	576
J	8	576	576
K	8	576	576
N	8	576	576
O	8	576	576
R	8	576	576
S	8	576	576
Total		5 760	5 760
Concordance		100,0%	

Total + 80

Total - 0

Méthode alternative

Niveau LO

Nombre de laboratoires **10**

Number of negative results per laboratory: 8

Laboratoire	Nombre de négatifs	Paires Interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
A	6	424	576
D	8	544	576
G	8	544	576
H	8	544	576
J	8	544	576
K	8	544	576
N	6	424	576
O	8	544	576
R	8	544	576
S	8	544	576
Total		5 200	5 760
Concordance		90,3%	

Total + 4

Total - 76

Niveau L1

Laboratories number **10**

Nombre de résultats positifs par laboratoire: 8

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires Interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
A	8	576	576
D	8	576	576
G	8	576	576
H	8	576	576
J	8	576	576
K	8	576	576
N	8	576	576
O	8	576	576
R	8	576	576
S	8	576	576
Total		5 760	5 760
Concordance		100,0%	

Total + 80

Total - 0

Niveau L2

Nombre de laboratoires **10**

Nombre de résultats positifs par laboratoire: 8

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires Interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
A	8	576	576
D	8	576	576
G	8	576	576
H	8	576	576
J	8	576	576
K	8	576	576
N	8	576	576
O	8	576	576
R	8	576	576
S	8	576	576
Total		5 760	5 760
Concordance		100,0%	

Total + 80

Total - 0