

# **ASEPT**<sup>SAS</sup>

**L'Hygiène dans la Qualité**

Laboratoire, Formation, Conseil, Expertise

## RAPPORT DE SYNTHÈSE

### RECONDUCTION DE VALIDATION AFNOR DE LA MÉTHODE CHROMagar™ Listeria SELON LA NORME NF EN ISO 16140

Ce document comporte 14 pages.

Rédacteur : Muriel COIGNARD

Référence : ER/CHR-21/1-12/01

ASEPT SAS - Rue des Docteurs Calmette et Guérin – BP 2047 – 53020 Laval Cedex 9  
Tél. 02 43 49 22 22 Fax 02 43 53 36 53 E-mail : [asept@asept.fr](mailto:asept@asept.fr) Internet : <http://www.asept.fr>

SOCIÉTÉ PAR ACTIONS SIMPLIFIÉE au capital de 80 000 euros – 428 713 036 RCS Laval - N° SIRET 428 713 036 000 13 - APE 743B



Accréditation  
N°1-0186  
Portée communiquée  
sur demande

Version 1 rédigée le 17/03/2006

Seuls les essais réalisés conformément à la méthode ISO 112190-1/A1 (2004) sont couverts par l'accréditation.

# 1 - Introduction

L'étude de reconduction de validation de la méthode CHROMagar™ Listeria a été confiée par la Société CHROMagar à la SAS ASEPT :

CHROMagar  
4 Place du 18 Juin 1940  
75006 Paris  
Tél. 01 45 48 05 05  
Fax : 01 45 48 06 06  
M. RAMBACH, M. TRAN

ASEPT SAS  
Rue des Docteurs Calmette et Guérin  
BP 2047  
53020 LAVAL Cedex 9  
Tél. 02 43 49 22 22  
Fax : 02 43 53 36 53  
Mme COIGNARD

L'étude préliminaire de cette étude de reconduction de validation a été réalisée du 15 avril au 15 octobre 2005.

## 1.1 Référentiel de validation

Les essais pour la validation ont été réalisés conformément au référentiel NF EN ISO 16140.

## 1.2. Protocole et principe de la méthode alternative

La méthode CHROMagar™ Listeria est une méthode incluant un bouillon d'enrichissement Fraser 1/2 et un milieu chromogène pour la détection spécifique de *Listeria monocytogenes*.

La confirmation des échantillons suspects est réalisée par les tests classiques des méthodes normalisées ou par réalisation d'un spot sur CHROMagar™ Identification Listeria directement à partir d'une colonie sur CHROMagar™ Listeria.

## 1.3 Domaine d'application demandé

La validation est demandée pour la recherche de *Listeria monocytogenes* sur tous produits d'alimentation humaine et sur les prélèvements d'environnement.

## 1.4 Méthode de référence

La méthode de référence utilisée pour les essais est la méthode NF EN ISO 11290 1/A1 (2004).

## 1.5 Historique de la validation

La méthode a été validée le 13 décembre 2001. Il n'y a pas eu d'extension de validation ni de reconduction depuis cette date.

L'étude de validation a été refaite complètement, compte-tenu du changement de référentiel de validation : aucun résultat antérieur n'est repris dans ce rapport.

## 2. Etude comparative

### 2.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

#### 2.1.1 Nombre et nature des échantillons

Les catégories étudiées, les types de produits analysés et le nombre d'échantillons analysés par catégorie sont indiqués dans le tableau 1.

**Tableau 1**

Catégories	Types de produits	Nombre de positifs *	Nombre de négatifs	Nombre total d'échantillons analysés
Produits carnés	Viandes crues	7	18	25
	Produits transformés prêt à cuire	9	26	35
	Produits prêt à consommer	16	11	27
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>55</b>	<b>87</b>
Environnements	Prélèvements de surface	11	21	32
	Prélèvements de siphons	8	12	20
	Résidus, poussières, eaux	12	10	22
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>43</b>	<b>74</b>
Produits laitiers	Fromages au lait cru	16	25	41
	Laits crus	12	31	43
	Fromages pasteurisés	9	12	21
	<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>68</b>	<b>105</b>
Produits de la pêche	Produits crus	11	11	22
	Poissons fumés	10	21	31
	Produits transformés	10	34	44
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>66</b>	<b>97</b>
Produits végétaux et divers	Végétaux crus bruts	9	17	26
	Ovoproduits, pâtisseries	10	10	20
	Salades composées	14	16	30
	<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>43</b>	<b>76</b>
<b>TOTAL</b>		<b>164</b>	<b>275</b>	<b>439</b>

\* Résultats positifs par l'une ou l'autre des deux méthodes étudiées.

Au total, pour chacune des catégories, un minimum de 60 échantillons a été analysé, avec au minimum 30 échantillons positifs, répartis dans chaque type.

#### 2.1.2 Contamination artificielle des échantillons

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

76 échantillons sont positifs suite à contamination artificielle, sur 164 échantillons positifs, soit un pourcentage de 46 %. 33 échantillons artificiellement contaminés ont été retrouvés non contaminés par la méthode alternative et par la méthode de référence.

88 échantillons naturellement contaminés positifs, soit un pourcentage de 54 %.

### 2.1.3 Résultats des essais

Le tableau 2 présente les résultats globaux toutes catégories confondues.

**Tableau 2**

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	150	3
Méthode alternative négative (A-)	11 (1)	275 (1)

A+ = positifs confirmés

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

(1) dont 0 échantillon positif présomptif non confirmé.

Les tableaux 3 à 7 présentent les mêmes résultats par catégorie de produits.

**Tableau 3 : Produits carnés**

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	28	2
Méthode alternative négative (A-)	2	55

**Tableau 4 : Prélèvements d'environnement**

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	30	0
Méthode alternative négative (A-)	1	43

**Tableau 5 : Produits laitiers**

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	31	1
Méthode alternative négative (A-)	5	68

**Tableau 6 : Produits de la pêche**

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative	29	0

positive (A+)		
Méthode alternative négative (A-)	2	66

**Tableau 7 : Produits végétaux et divers**

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	32	0
Méthode alternative négative (A-)	1	43

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

L'ensemble de ces résultats permet de calculer l'exactitude relative, la sensibilité relative et la spécificité relative. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8**

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	AC (%)	N+ = PA+ND	SE (%)	N- = NA+PD	SP (%)
Produits carnés	28	55	2	2	87	95,4	30	93,3	57	96,5
Environnements	30	43	1	0	74	98,6	31	96,8	43	100
Produits laitiers	31	68	5	1	105	94,3	36	86,1	69	98,5
Produits de la pêche	29	66	2	0	97	97,9	31	93,5	66	100
Produits végétaux	32	43	1	0	76	98,7	33	96,9	43	100
TOTAL	150	275	11	3	439	96,8	161	93,2	278	98,9

PA : Accord Positif

NA : Accord négatif

AC : Exactitude relative

SP : Spécificité relative

$AC (\%) = \frac{PA+NA}{N} * 100$

$SE (\%) = \frac{PA}{N+} * 100$

$SP (\%) = \frac{NA}{N-} * 100$

ND : Déviation négative

PD : Déviation positive

SE : Sensibilité relative

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

Exactitude relative : AC = 96,8 %

Spécificité relative : SP = 98,9 %

Sensibilité relative : SE = 93,2 %

En considérant uniquement 150 échantillons positifs, les pourcentages deviennent les suivants :

Exactitude relative : AC = 95,5 %

Spécificité relative : SP = 98,0 %

Sensibilité relative : SE = 93,2 %

Sensibilité en tenant compte de l'ensemble des échantillons positifs confirmés :

Méthode alternative :  $(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 93,3 \%$

Méthode de référence :  $(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,2 \%$

## 2.1.5 Analyse des discordants

Selon l'annexe F de la norme NF EN ISO 16140, le nombre de discordants  $Y = ND + PD$  est de 14.

Les deux méthodes ne sont pas statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

## 2.2 Niveau de détection relatif

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

Le tableau 9 présente les résultats obtenus.

**Tableau 9**

<b>Couples (matrice-souche)</b>	<b>Niveau de détection relatif (UFC / 25 g ou 25 ml) selon le test de Spearman-Kärber *</b>	
	<b>Méthode de référence</b>	<b>Méthode alternative</b>
Rillettes – Lm 4e	0,4 (0,2 ; 1,0)	0,4 (0,2 ; 1,0)
Saumon fumé – Lm 1/2b	0,3 (0,1 ; 1,0)	0,3 (0,1 ; 1,0)
Salade – Lm 1/2a	0,9 (0,5 ; 1,6)	0,9 (0,5 ; 1,6)
Lait cru – Lm 1/2a	0,5 (0,2 ; 1,3)	0,5 (0,2 ; 1,3)
Eau de process – Lm 1/2a	0,7 (0,3 ; 1,9)	0,9 (0,3 ; 2,)

\* « 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 ».

Le niveau de détection relatif est compris entre 0,083 et 1,928 pour la méthode de référence et entre 0,083 et 2,223 pour la méthode alternative.

Le niveau de détection relatif de la méthode alternative est similaire à celui de la méthode de référence.

## 2.3 Inclusivité / exclusivité

### 2.3.1 Protocoles d'essai

- Pour l'inclusivité

Chacune des souches de *Listeria monocytogenes* a été cultivée en bouillon TSB (Tryptone Soya Broth) 24 h à 37 °C, à l'exception de quelques souches spécifiques cultivées en bouillon adapté à leur croissance. Des dilutions ont été réalisées afin d'inoculer entre 1 et 100 cellules dans 225 ml de bouillon d'enrichissement Fraser 1/2. Le protocole de la méthode alternative a été suivi dans son ensemble. Toutes les souches donnant des colonies caractéristiques ont été confirmées par le test CHROMagar™ Identification Listeria à partir d'une colonie bien isolée sur CHROMagar™ Listeria.

- Pour l'exclusivité

Les différentes souches négatives ont été cultivées en bouillon TSB 24 h à 37 °C puisensemencées à un taux supérieur à  $10^5$  / ml dans 225 ml de bouillon d'enrichissement Fraser 1/2. Les souches donnant des colonies caractéristiques ont été confirmées par le test CHROMagar™ Identification Listeria.

### **2.3.2 Résultats**

Au niveau de l'exclusivité, aucune réaction croisée n'a été mise en évidence. Seules les souches de *Listeria ivanovii* donnent un aspect typique : la confirmation permet de les distinguer des *Listeria monocytogenes*.

Toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ont donné des colonies typiques bleues avec halo blanc sur gélose CHROMagar™ Listeria et une coloration rose à mauve avec halo sur le test CHROMagar™ Identification Listeria.

### 3. Etude interlaboratoire

#### 3.1 Organisation de l'étude

Cette étude a été réalisée par un essai interlaboratoires impliquant 14 laboratoires collaborateurs et le laboratoire organisateur.

La matrice utilisée pour l'étude a été un mélange à 50 % de lait demi-écrémé et de lait entier pasteurisé. Ce lait a été contaminé par une souche de *Listeria monocytogenes* isolée de lait cru, de sérotype 1/2a. Vingt-quatre échantillons de lait, dont huit échantillons non contaminés ont été adressés à chaque laboratoire collaborateur.

#### 3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

##### 3.1. Taux de contamination

Les niveaux de contamination, et la stabilité des contaminations dans le temps sont présentés dans le tableau 10.

**Tableau 10**

Taux visés (bactéries / 25ml)	Taux réels (bactéries / 25ml)	Estimation de la limite inférieure de la contamination par 25 ml d'échantillon	Estimation de la limite supérieure de la contamination par 25 ml d'échantillon
0	0	0	0
3	3,6	2	5
30	34,6	30	39

##### 3.2. Températures à réception

Pour tous les laboratoires collaborateurs, la température était conforme car inférieure à 8,4 °C.

Tous les laboratoires ont reçu leur colis le lendemain de l'envoi soit le 17/01/2006 avant 14 h.

Tous les laboratoires ont réalisé les essais sur les 24 flacons de lait le mardi 17/01/2006.

Aucun laboratoire ne peut être exclu selon ces critères.

### 3.3 Résultats des analyses

#### 3.3.1. Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs

Les tableaux 11 et 12 présentent les résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs par la méthode de référence et par la méthode alternative.

**Tableau 11** : Résultats positifs obtenus avec la méthode de référence

Laboratoires	Niveau de contamination		
	L <sub>0</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>
A	0/8	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	0/8	8/8	8/8
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	8/8	8/8
M	0/8	8/8	8/8
N	0/8	8/8	8/8
Total	0	112	112

**Tableau 12** : Résultats positifs obtenus avec la méthode de référence

Laboratoires	Niveau de contamination		
	L <sub>0</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>
A	0/8	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	0/8	8/8	8/8
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	8/8	8/8
M	0/8	8/8	8/8
N	0/8	8/8	8/8
Total	0	112	112

**Tableau 5** : Résultats positifs obtenus avec la méthode alternative

#### 3.3.2. Commentaires

Trois laboratoires n'ont pas respecté le protocole décrit dans les instructions :

Ces trois laboratoires sont exclus de l'analyse finale et globale des résultats.  
Cependant, leurs résultats sont conformes aux résultats attendus.

### 3.4. Calculs

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

Le pourcentage de spécificité, pour le niveau  $L_0$  est calculé pour chaque méthode selon la formule suivante :  $SP = 1 - (FP/N_-) \times 100 \%$

FP : nombre de faux positifs

$N_-$  : nombre total de tous les essais  $L_0$

Le pourcentage de sensibilité, pour les niveaux  $L_1$  et  $L_2$  est calculé pour chaque méthode selon la formule suivante :  $SE = (TP / N_+) \times 100 \%$

TP : nombre de vrais positifs

$N_+$  : nombre total de tous les essais  $L_1$  et  $L_2$

Le tableau 13 présente les résultats obtenus.

**Tableau 13** : Calculs de SP et SE

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	SP ou SE	LCL %	SP ou SE	LCL %
$L_0$	SP% = 100 %	98	SP% = 100 %	98
$L_1$	SE% = 100 %	98	SE% = 100 %	98
$L_2$	SE% = 100 %	98	SE% = 100 %	98
$L_1+L_2$	SE% = 100 %	98	SE% = 100 %	98

#### 3.4.2. Calcul de l'exactitude relative (AC)

Les résultats pour tous les niveaux confondus sont présentés dans le tableau 14.

**Tableau 14** : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 160	PD = 0	160
-	ND = 0	NA = 80	80
<b>Total</b>	<b>N = 160</b>	<b>N- = 80</b>	<b>N = 240</b>

L'exactitude relative (AC), exprimée en pourcentage, est calculée avec la formule suivante :  $AC = ((PA + NA) / N) \times 100 \%$ .

N : nombre d'échantillons soumis à essais,

PA : nombre d'accords positifs

NA : nombre d'accords négatifs

#### 3.4.3. Etude des discordants

Tous les résultats attendus ont été trouvés par les laboratoires collaborateurs. Il n'y a pas de discordant.

### 3.5. Interprétation

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

Les valeurs obtenues pour ces paramètres lors de l'étude préliminaire et au cours de l'étude collaborative sont reportées dans le tableau 15.

**Tableau 15** : comparaison des valeurs de AC, SP et SE entre étude préliminaire et étude collaborative

	Etude préliminaire	Etude collaborative
Exactitude relative	95,5 %	100 %
Sensibilité	93,2 %	100 %
Spécificité	98,0 %	100 %

#### 3.5.2. Degré d'accord

Le tableau 16 présente les valeurs par niveau et par méthode.

**Tableau 16** : degré d'accord

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L <sub>0</sub>	100 %	100 %
L <sub>1</sub>	100 %	100 %
L <sub>2</sub>	100 %	100 %

#### 3.5.3. Concordance

Le tableau 17 présente les valeurs par niveau et par méthode.

**Tableau 17** : concordance

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L <sub>0</sub>	100 %	100 %
L <sub>1</sub>	100 %	100 %
L <sub>2</sub>	100 %	100 %

#### 3.5.4. Odds ratio (COR)

Il est calculé avec la formule suivante :  $COR = (\text{degré d'accord} \times (100 - \text{concordance})) / (\text{concordance} \times (100 - \text{degré d'accord}))$ .

Les odds ratio pour la méthode de référence et la méthode alternative sont présentés dans le tableau 18.

**Tableau 18** : odds ratio

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L <sub>0</sub>	100 %	100 %
L <sub>1</sub>	100 %	100 %
L <sub>2</sub>	100 %	100 %



## **4. Etude de praticabilité complète**

### **4.1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode**

CHROMagar™ Listeria base : coffret contenant 4 flacons de milieu déshydraté permettant la fabrication de 250 ml de milieu de base chacun

CHROMagar™ Listeria supplément : coffret contenant 4 flacons de poudre déshydratée permettant la fabrication de 250 ml de milieu complet par ajout au milieu de base précédent.

N.B : une présentation prêt à l'emploi existe.

CHROMagar Identification Listeria : géloses coulées en boîte de Petri de diamètre 55 mm et prêtes à l'emploi.

N.B : une présentation déshydratée existe.

### **4.2. Volume des réactifs**

Le milieu CHROMagar™ Listeria est préparé à partir des flacons de poudre fournis par le fabricant. 15 à 20 ml de milieu sont coulés en boîtes de Petri.

### **4.3. Conditions de stockage des éléments et péremption des produits non ouverts**

Les milieux déshydratés sont stockés à l'obscurité et à l'abri de l'humidité (entre 2 et 30°C pour la base et au froid entre 2 et 8 °C pour le supplément). Une date de péremption est indiquée sur chaque flacon.

Le milieu est fabriqué, autoclavé et coulé le jour même.

Les boîtes de milieu se conservent une journée à température ambiante ou deux semaines à une température comprise entre 2 et 8°C et à l'obscurité.

Les boîtes prêtes à l'emploi ont une péremption de 3 mois.

### **4.4. Modalités d'utilisation après première utilisation**

La totalité du flacon (250 ml) est utilisée à chaque préparation de milieu.

### **4.5. Equipements ou locaux spécifiques nécessaires**

Il n'y a pas d'équipement ou de locaux spécifiques pour cette méthode. Toutefois, il faut disposer de locaux de bactériologie équipés des matériels et dispositifs de sécurité nécessaires à la manipulation de micro-organismes pathogènes.

### **4.6. Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer**

Les modalités pour la reconstitution de CHROMagar™ Listeria base ainsi que le supplément à ajouter à CHROMagar™ Listeria base sont précisés dans la notice CHROMagar™ Listeria.

### **4.7. Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode**

La durée de formation d'un technicien réalisant de façon courante la méthode ISO 11290-1 est de un jour à une semaine (maîtrise de l'isolement, maîtrise de la lecture et du test de confirmation).

#### **4.8. Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser**

Le temps nécessaire à l'analyse d'un échantillon positif par la méthode ISO 11290-1/A est de 23 minutes contre 10 minutes pour la méthode alternative.

Le temps nécessaire à l'analyse d'un échantillon négatif par la méthode ISO 11290-1/A est de 6 minutes contre 4 minutes pour la méthode alternative.

#### **4.9. Délais d'obtention des résultats**

La méthode CHROMagar™ Listeria permet l'obtention de résultats positifs en 3 jours lorsque le test CHROMagar™ Identification est utilisé pour la confirmation et jusqu'à 7 jours si l'on met en oeuvre la confirmation telle que décrit dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (incluant la purification). Les résultats négatifs sont obtenus en 2 jours.

Pour la méthode ISO 11290-1, les résultats positifs sont obtenus dans un délai de 8 à 11 jours. Les résultats négatifs sont obtenus en 5 jours (si absence de colonies typiques) à 11 jours.

#### **4.10. Type de qualification de l'opérateur**

La qualification de l'opérateur est identique à celle requise pour la réalisation de la méthode ISO 11290-1

#### **4.11. Etapes communes avec la méthode de référence**

La première étape d'enrichissement primaire en Fraser 1/2 est commune aux deux méthodes.

#### **4.12. Traçabilité des résultats**

Il existe deux types de traçabilité : la traçabilité interne au laboratoire et la traçabilité du fournisseur.

Traçabilité interne au laboratoire : les analyses font l'objet d'un suivi au travers de fiches de suivi sur lesquelles sont notées la date limite d'utilisation du milieu, l'opérateur, la date de réalisation des essais, les résultats...

Traçabilité du fournisseur : le fournisseur émet un certificat d'analyse sur lequel sont indiqués le numéro de lot du milieu et la date d'expiration.

#### **4.13. Maintenance par le laboratoire**

Sans objet.

## 5. Conclusion générale

La méthode CHROMagar™ *Listeria* pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans les aliments et les prélèvements d'environnement présente les caractéristiques suivantes :

- aucune réaction croisée avec d'autres espèces de *Listeria* ou d'autres genres.
- 100 % des souches de *Listeria monocytogenes* étudiées ont été détectées par la méthode.
- Le niveau de détection relatif est comparable à celui de la méthode de référence.

La méthode alternative n'est pas statistiquement différente de la méthode de référence en termes d'exactitude relative avec des valeurs d'exactitude relative à 95,5 %, de spécificité relative à 98,0 % et de sensibilité relative à 93,2 %.

La variabilité de la méthode alternative est identique à celle de la méthode de référence, compte-tenu des résultats de l'étude collaborative.

Muriel COIGNARD,  
Chef du Laboratoire