

ETUDE DE LA VALIDATION AFAQ AFNOR  
CERTIFICATION DU TEST BACTRAC 4300 POUR LA  
DETECTION DES ENTEROBACTERIES SELON LA  
NORME NF EN ISO 16140

**RAPPORT DE SYNTHÈSE**

Ce rapport d'analyse ne concerne que les objets soumis aux analyses. Sa reproduction n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 20 pages.

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

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

Fabricant : **SY-LAB**  
Tullnerbachstrasse 61-65  
A-3011 Neupurkersdorf  
AUTRICHE

Laboratoire expert : **I. S. H. A.**  
25, avenue de la République  
91300 MASSY

En vue de la validation AFAQ AFNOR Certification selon la norme  
NF EN ISO 16140 du test BACTRAC 4300 pour la détection des  
entérobactéries avec confirmation.

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
1.1	Référentiel de validation.....	4
1.2	Méthode alternative.....	4
1.3	Domaine d'application.....	5
1.4	Méthode de référence (*).....	5
<b>2</b>	<b>RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative.....</b>	<b>6</b>
2.1.1	Nombre et nature des échantillons.....	6
2.1.2	Contamination artificielle des échantillons.....	6
2.1.3	Protocole de confirmation.....	7
2.1.4	Résultats des essais.....	7
2.1.5	Calcul de l'exactitude relative, de la spécificité relative et de la sensibilité relative.....	7
2.1.6	Analyse des résultats discordants.....	8
<b>2.2</b>	<b>Niveau de détection relatif de la méthode alternative et la méthode de référence.....</b>	<b>8</b>
2.2.1	Matrices utilisées.....	8
2.2.2	Protocole de contamination.....	8
2.2.3	Résultats des essais.....	9
2.2.4	Conclusion.....	10
<b>2.3</b>	<b>Sélectivité.....</b>	<b>10</b>
2.3.1	Protocoles d'essai.....	10
2.3.2	Résultats des essais.....	10
<b>2.4</b>	<b>Praticabilité.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>ETUDE COLLABORATIVE.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Mise en œuvre de l'étude collaborative.....</b>	<b>12</b>
3.1.1	Laboratoires collaborateurs.....	12
3.1.2	Vérification de l'absence d'entérobactéries dans la matrice utilisée.....	12
3.1.3	Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé.....	13
3.1.4	Préparation et inoculation des échantillons.....	13
3.1.5	Etiquetage des échantillons.....	13
3.1.6	Expédition des échantillons.....	14
3.1.7	Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs.....	14
<b>3.2</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>14</b>
3.2.1	Température et état des échantillons à réception.....	14
3.2.2	Dénombrements de la flore totale.....	15
3.2.3	Résultats du laboratoire expert.....	15
3.2.4	Résultats des laboratoires collaborateurs.....	16
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>20</b>

# 1 Introduction

## 1.1 Référentiel de validation

L'étude préliminaire a pour but d'évaluer les performances du test BACTRAC 4300 par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 21528-1 selon le référentiel NF EN ISO 16140.

Les caractéristiques suivantes sont étudiées :

- Détermination de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative de la méthode alternative et de la méthode de référence,
- Niveau de détection relatif de la méthode alternative et de la méthode de référence,
- Sélectivité de la méthode alternative (inclusivité et exclusivité),
- Praticabilité de la méthode alternative.

## 1.2 Méthode alternative

La méthode BacTrac 4300 est une méthode rapide et automatisée permettant la détection des entérobactéries dans les produits laitiers. Le principe est basé sur la détection électrique des métabolites microbiens, en temps réel, pendant la croissance des microorganismes en milieu liquide. Une sensibilité très élevée avec des milieux d'enrichissement hautement sélectifs caractérisent le système de mesure du BacTrac 4300. En effet, le milieu sélectif spécifique favorise la croissance des entérobactéries et empêche la flore compétitive d'atteindre le seuil de détection. La croissance des germes cibles va augmenter la charge ionique changeant ainsi le comportement électrique (résistance) du milieu. Les changements sont enregistrés par le système comme changement relatif comparé à la valeur d'impédance initiale.

Les temps de détection sont enregistrés quand le signal de croissance dépasse le seuil de détection qui est généralement situé au début de la phase exponentielle de la courbe de détection.

La courbe de développement est influencée par la charge bactérienne de l'échantillon. Des temps de détection courts indiquent donc un nombre élevé d'entérobactéries dans l'échantillon.

Un échantillon est présumé positif dès qu'une courbe de croissance est détectée.

Toutes les mesures effectuées par le Bactrac 4300 sont mémorisées automatiquement dans l'ordinateur et sont directement exploitées par le logiciel Bac Eval. Les courbes de mesure peuvent également être suivies en temps réel.

Les protocoles de la méthode alternative sont présentés en figure 1.

## Figure 1 : Protocoles de la méthode alternative

### Echantillons liquides

Transfert 1 mL de l'échantillon dans la cellule de mesure contenant  
9 mL de bouillon BiMedia 144A



Programmation de l'automate pour une incubation  
de 23 heures maximum à  $(32 \pm 0,5)^\circ\text{C}$



**Lecture des résultats**

### Echantillons solides

Prise d'essai de 10 g + 90 mL d'eau peptonée tamponnée  
Homogénéisation pendant 1 minute au stomacher



**Enrichissement**

Incubation 16 à 20 heures à  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$



Transfert 0,1 mL de la suspension mère dans la cellule de mesure contenant  
9 mL de bouillon BiMedia 144A



Programmation de l'automate pour une incubation  
de 23 heures maximum à  $(32 \pm 0,5)^\circ\text{C}$



**Lecture des résultats**

Remarque :

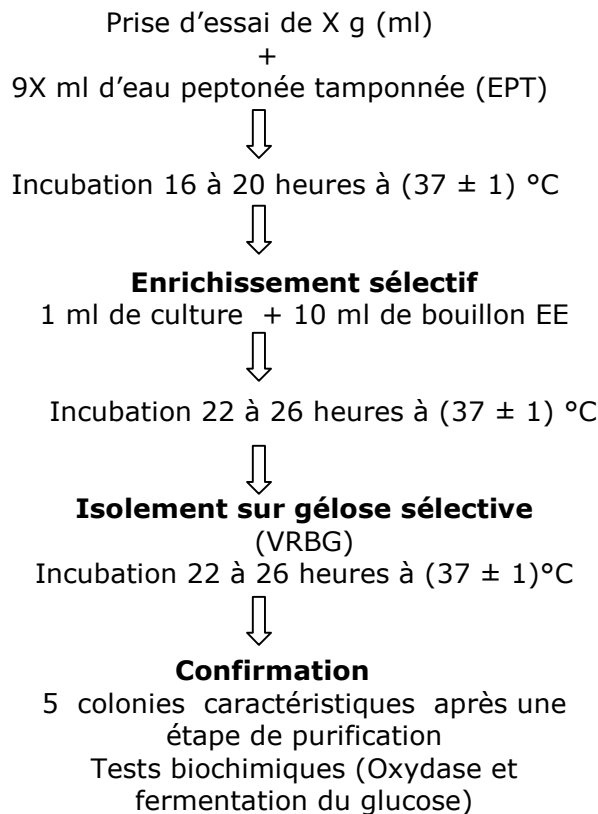
Si le résultat est présumé positif, une confirmation doit être réalisée à partir du bouillon BiMedia 144A. Des isolements sont effectués sur gélose sélective VRBG et en présence de colonies caractéristiques des tests de confirmation selon la méthode de référence sont réalisés.

### 1.3 Domaine d'application

Tous produits laitiers (à l'exclusion du lait cru) et essentiellement les aliments pour bébé.

### 1.4 Méthode de référence (\*)

La norme NF EN ISO 21528-1 (2004) (méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae*) a été utilisée pour l'étude comparative. Le protocole de la méthode est représenté en figure 2.

**Figure 2 : Protocole de la méthode de référence**

## 2 Résultats de l'étude préliminaire

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

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances des deux méthodes sur des échantillons contaminés ou non contaminés. Les analyses sont réalisées en simple par les 2 méthodes et les échantillons sont répartis dans les principaux types de la catégorie produits laitiers.

#### 2.1.1 Nombre et nature des échantillons

Seule la catégorie produit laitier a été étudiée.

64 échantillons ont été analysés, les types de matrices sont répertoriés dans le tableau suivant :

Catégories	Types	Nombre de positifs *	Nombre de négatifs	Total
Produits laitiers	Poudre de lait infantile	7	11	18
	Lait pasteurisé	6	8	14
	Glace	4	9	13
	Fromages à base de lait traité thermiquement	15	4	19
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>64</b>

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

#### 2.1.2 Contamination artificielle des échantillons

Des contaminations artificielles ont été réalisées. Les souches et les stress appliqués sont renseignés dans le tableau suivant.

Sur les 32 résultats positifs, 6 échantillons de poudre de lait ont été artificiellement contaminés, soit 81 % d'échantillons naturellement contaminés.

Type de stress	Souche	Origine	Log N (MNS) - log N (MS)
20 min à 50°C	<i>Enterobacter sakazakii</i> (I37)	Poudre de lait	0,50
7j à -20°C	<i>Enterobacter sakazakii</i> (I37)	Poudre de lait	0,51

### 2.1.3 Protocole de confirmation

La confirmation des résultats présumés positifs de la méthode alternative a été effectuée à partir du bouillon BiMedia 144A. Des isollements sont réalisés sur le milieu VRBG. Dans le cadre de cette étude, deux modalités ont été testées : une incubation à 30°C et à 37°C du milieu sélectif. Les tests de confirmation sont ensuite effectués sur chaque gélose selon la méthode de référence (purification, test oxydase et fermentation du glucose sur 5 colonies).

Remarque : en cas de suspicion de présence d'*Enterobacter sakazakii* dans les poudres de lait, un isolement supplémentaire a été effectué sur milieu ESIA.

### 2.1.4 Résultats des essais

Les résultats obtenus se répartissent de la manière suivante :

#### Produits laitiers

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 30	PD= 1
Méthode alternative négative (A-)	ND= 1 PPND = 0	NA= 32 PPNA = 3

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

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

Les résultats obtenus permettent de calculer l'exactitude relative, la spécificité relative et la sensibilité relative pour toutes les catégories testées, selon le référentiel NF EN ISO 16140.

Catégorie de produit	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	N-	Spécificité relative SP (%)
Produits laitiers	30	32	1	1	64	97	31	97	33	97

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.  
 $AC = (PA+NA)/N \times 100\%$ ,  $SE = PA/N+ \times 100\%$ ,  $SP = NA/N- \times 100\%$ ,  $N+ = PA+ND$  et  $N- = NA+PD$

Les valeurs en pourcentage obtenues pour les trois critères concernant la méthode alternative sont les suivantes :

Exactitude relative (AC) = **97 %**

Spécificité relative (SP) = **97 %**

Sensibilité relative (SE) = **97 %**

La sensibilité des deux méthodes est recalculée en tenant compte de l'ensemble des résultats positifs confirmés. Le pourcentage de sensibilité est le suivant :

Méthodes	Alternative	Référence
Sensibilité en %	$(PA+PD) / (PA+PD+ND) = 97$	$(PA+ND) / (PA+PD+ND) = 97$

### 2.1.6 Analyse des résultats discordants

Selon la norme NF EN ISO 16140, le nombre de discordants [Y=ND (1) + PD (1)] étant de 2, le test de Mc Nemar n'a pas été utilisé pour la comparaison des deux méthodes.

#### Echantillon numéro RD 1026 (PD)

Il s'agit d'un échantillon de brie. La méthode alternative a donné un résultat positif au test. Cependant la présence d'entérobactéries n'a été confirmée qu'à partir des tests effectués à 30°C (le résultat des tests d'identification indique la présence de *Serratia proteamaculans*). La méthode de référence a donné un résultat négatif. Des colonies caractéristiques ont été mises en évidence sur le milieu VRBG incubé à 37°C mais les tests de fermentation du glucose ont donné un résultat négatif sur les 5 colonies testées.

#### Echantillon numéro RD 1021 (ND)

Il s'agit d'un échantillon de poudre de lait instantané. La méthode alternative a donné un résultat positif au test, cependant aucune colonie n'a été mise en évidence sur le milieu VRBG, quelle que soit la température d'incubation de la gélose (30°C ou 37°C). La méthode de référence a donné un résultat positif confirmé. Le résultat des tests d'identification indique la présence de *Pantoea spp.*

## 2.2 Niveau de détection relatif de la méthode alternative et la méthode de référence

L'objectif est de déterminer la concentration minimale d'entérobactéries détectable dans un aliment par les deux méthodes.

### 2.2.1 Matrices utilisées

Deux couples « matrice-souche » ont été étudiés afin de tester les deux protocoles de la méthode alternative.

Souche (origine)	Aliment	Flore totale <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> (industrie laitière)	Lait frais pasteurisé	10 CFU/mL
<i>Enterobacter sakazakii</i> (poudre de lait)	Poudre de lait	<1 CFU/g

a : CFU/g ou mL

### 2.2.2 Protocole de contamination

Cinq à six niveaux de contamination ont été testés dont le contrôle négatif.

Six répétitions ont été réalisées pour chaque niveau.

Deux protocoles de contamination ont été appliqués en fonction de la nature de la matrice (liquide ou solide).

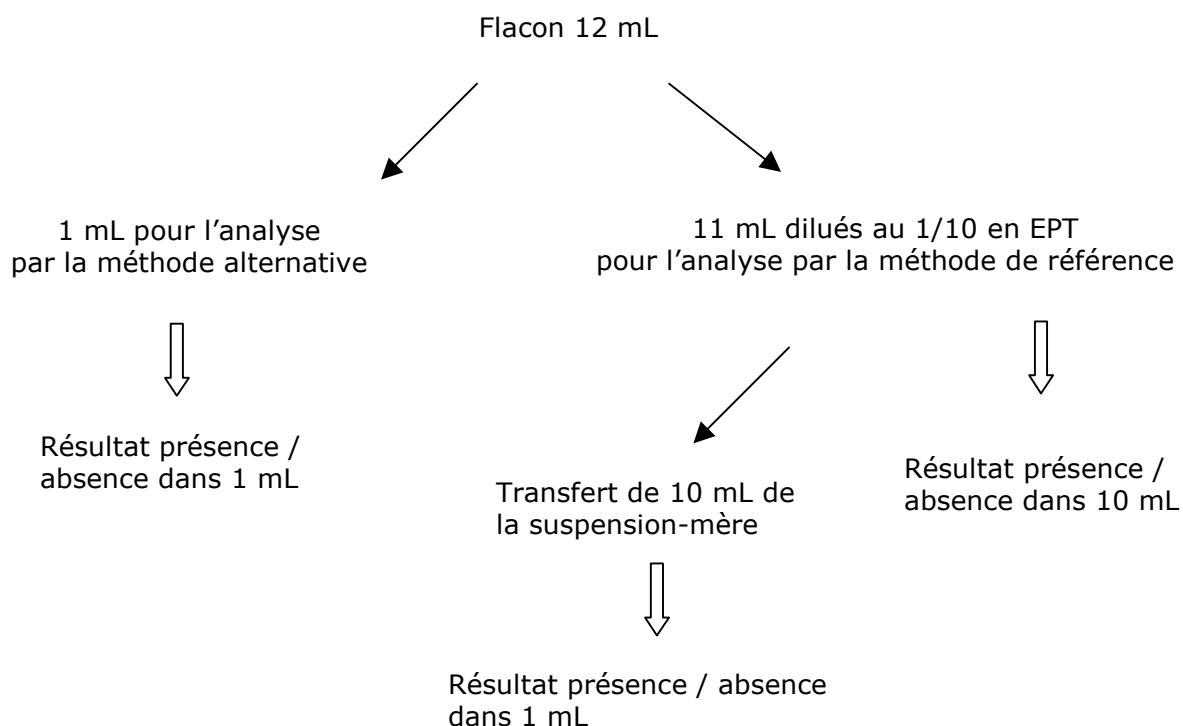
Protocole 1 : matrice lait frais pasteurisé.

Des suspensions d'environ 100 cellules par mL (suspension initiale) sont calibrées.

A partir de la suspension initiale, des volumes de 0,3 mL et 0,1 mL sont prélevés pour contaminer respectivement 6 flacons de 11,7 et 12 mL de lait pour les deux premiers niveaux. En parallèle, la suspension initiale est diluée au demi, au 1/4 et au 1/8. Un volume de 0,1 mL de ces 3 suspensions est prélevé pour contaminer 6 flacons de 12 mL de produit. Pour l'ensemble des niveaux de contamination, l'homogénéité des inoculés est vérifiée par 30 dénombrements en gélose TSA et le calcul de l'intervalle de confiance selon la loi de Poisson est effectué.

Chacun des flacons, contaminé ou non, est soigneusement homogénéisé.

Puis la mise en analyse pour chacune des méthodes suit le schéma suivant :



#### Protocole 2 : matrice poudre de lait

Les contaminations ont été réalisées directement dans les bouillons de pré-enrichissement pour les deux méthodes, avant incubation.

Des suspensions d'environ 10 cellules par mL (suspension initiale) ont été préparées. A partir de la suspension initiale, des volumes de 0,3 mL et 0,1 mL sont prélevés pour contaminer 10 g de produit pour les deux premiers niveaux. En parallèle, la suspension initiale est diluée au demi et au 1/4. Un volume de 0,1 mL de ces 2 suspensions est prélevé pour contaminer 10g de produit. Pour l'ensemble des niveaux de contamination, l'homogénéité des inoculés est vérifiée par 30 dénombrements en gélose TSA et le calcul de l'intervalle de confiance selon la loi de Poisson est effectué.

#### 2.2.3 Résultats des essais

Les limites de détection pour chacune des méthodes sont résumées dans le tableau suivant :

Souche	Aliment	Niveau de détection relatif selon le test de Spearman-Kræber	
		Méthode de référence (*)	Méthode alternative
<i>Escherichia coli</i> (industrie laitière)	Lait frais pasteurisé	0,406 <sup>a</sup> [0,253 ; 0,653]	0,292 <sup>a</sup> [0,173 ; 0,493]
<i>Enterobacter sakazakii</i> (poudre de lait)	Poudre de lait pour nourrissons	0,647 <sup>b</sup> [0,382 ; 1,098]	0,746 <sup>b</sup> [0,440 ; 1,266]

a : CFU par 1 mL, b : CFU par 10 g

Les limites de détection avec deux chiffres significatifs sont présentées dans le tableau suivant :

Souche	Aliment	Niveau de détection relatif selon le test de Spearman-Kræber	
		Méthode de référence (*)	Méthode alternative
<i>Escherichia coli</i> (industrie laitière)	Lait frais pasteurisé	0,4 <sup>a</sup> [0,3 ; 0,7]	0,3 <sup>a</sup> [0,2 ; 0,5]
<i>Enterobacter sakazakii</i> (poudre de lait)	Poudre de lait pour nourrissons	0,6 <sup>b</sup> [0,4 ; 1,1]	0,7 <sup>b</sup> [0,4 ; 1,3]

a : CFU par 1 mL, b : CFU par 10 g

### 2.2.4 Conclusion

Pour les matrices liquides, la limite de détection de la méthode alternative varie de 0,2 à 0,5 CFU par mL alors que celle de la méthode de référence varie de 0,3 à 0,7 CFU par mL. Pour les matrices solides, la limite de détection de la méthode alternative varie de 0,4 à 1,3 CFU par 10 g alors que celle de la méthode de référence varie de 0,4 à 1,1 CFU par 10 g.

## 2.3 Sélectivité

L'objectif de cette étape est de s'assurer que toutes les souches d'entérobactéries donnent une réaction positive avec la méthode alternative et que toutes les souches non-entérobactéries donnent une réaction négative avec la même méthode.

### 2.3.1 Protocoles d'essai

Les 57 souches cibles testées subissent 2 repiquages successifs avant leur utilisation. Le dernier repiquage est réalisé dans le bouillon BiMedia 144A. Le niveau d'inoculation est de  $50 \pm 30$  CFU par 10 mL.

Les 30 souches non cibles testées subissent 2 repiquages successifs avant leur utilisation. Le dernier repiquage est réalisé dans le bouillon BiMedia 144A. Le niveau d'inoculation est d'environ  $10^5$  CFU par mL. Dans le cas où un résultat positif est obtenu, des essais supplémentaires ont été réalisés avec un taux d'inoculation de l'ordre de 100 CFU/mL.

### 2.3.2 Résultats des essais

L'ensemble des souches cibles testées ont été détectées par la méthode alternative.

Pour les souches non cibles, 21 résultats ont donné un statut positif. Cependant, l'analyse des courbes de croissance montre un profil atypique pour 13 d'entre elles (augmentation croissante dépassant ainsi le seuil) c'est pourquoi ces résultats sont considérés comme étant négatifs. De plus, les tests de confirmation ont donné un résultat négatif.

Pour les 8 souches donnant un résultat positif avec une courbe de croissance typique ou douteuse, des isollements ont été réalisés sur gélose VRBG.

Trois souches ne se développent pas sur le milieu sélectif. Il s'agit des 3 souches appartenant au genre *Enterococcus* et plus particulièrement d'une souche d'*Enterococcus faecalis* (R200 : ATCC 33186), d'une souche d'*Enterococcus faecium* (I29 : Industrie laitière) et d'une souche d'*Enterococcus hirae* (R5 : CIP 58.55).

Cinq souches se développent sur le milieu sélectif mais les tests de confirmation sont négatifs (test oxydase positif). Il s'agit des 5 souches appartenant au genre *Pseudomonas*.

## 2.4 Praticabilité

La praticabilité est étudiée en renseignant les 13 critères définis par le Bureau Technique.

### 1- Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Le kit est conditionné en un coffret contenant 120 cellules de mesure.

## 2- Volume des réactifs

Chaque cellule de mesure contient 9 mL de bouillon BiMedia 144A.

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

La température de stockage des réactifs est de 2 à 8°C (conservation 6 mois après fabrication).

## 4- Modalités d'utilisation après première utilisation

Cellules de mesures unitaires à usage unique.

## 5- Equipements ou locaux spécifiques nécessaires

Un impédancemètre (BACTRAC 4300) lié à un ordinateur sur lequel sont installés les logiciels BacMonitor et BacEval.

## 6- Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer

Essais réalisés avec des réactifs prêts à l'emploi.

## 7- Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode

Pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie, la formation à la technique nécessite un jour.

## 8- Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique

Etape	Temps en minutes					
	M.A.			M.R.		
	1 analyse	10 analyses	50 analyses	1 analyse	10 analyses	50 analyses
Prise d'essai	2 min	20 min	100 min	2 min	20 min	100 min
Mise en suspension Inoculation des bouillons sélectifs				1 min	8 min	40 min
Paramétrage du test Bac Trac – Description des échantillons	1 min	8 min	40 min	/	/	/
Inoculation et incubation Des milieux sélectifs	1 min	10 min	50 min	1 min	10 min	50 min
Lecture des boîtes	0,5 min	5 min	25 min	0,5 min	5 min	25 min
Confirmation biochimique	3 min	30 min	150 min	3 min	30 min	150 min
<b>Total</b>	<b>7,5 min</b>	<b>73 min</b>	<b>365 min</b>	<b>7,5 min</b>	<b>73 min</b>	<b>365 min</b>

## 9- Délai d'obtention des résultats

Premier cas : échantillons négatifs liquides

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Résultat Bac Trac	J1	-
Inoculation et incubation du bouillon sélectif	/	J1
Inoculation et incubation du milieu sélectif	/	J2
Lecture des boîtes	/	J3
Confirmation biochimique après purification	/	J4 à J5

## Deuxième cas : échantillons négatifs solides

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Inoculation et incubation du bouillon sélectif	J1	J1
Résultat du test Bac Trac	J2	/
Inoculation et incubation du milieu sélectif	/	J2
Lecture des boîtes	/	J3
Confirmation biochimique après purification	/	J4 à J5

## Troisième cas : échantillons positifs liquides

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Résultat Bac Trac	J1	-
Inoculation et incubation du bouillon sélectif	/	J1
Inoculation et incubation du milieu sélectif	J1	J2
Lecture des boîtes	J2	J3
Confirmation biochimique après purification	J3 à J4	J4 à J5

## Quatrième cas : échantillons positifs solides

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Inoculation et incubation du bouillon sélectif	J1	J1
Résultat du test Bac Trac	J2	/
Inoculation et incubation du milieu sélectif	J2	J2
Lecture des boîtes	J3	J3
Confirmation biochimique après purification	J4 à J5	J4 à J5

10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence.

11- Etapas communes avec la méthode de référence

Le pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée pour les matrices solides.

12- Traçabilité des résultats d'analyse

Les résultats sont enregistrés dans des fichiers spécifiques au logiciel BacEval.

13- Maintenance par le laboratoire

-

### 3 Etude collaborative

#### 3.1 Mise en œuvre de l'étude collaborative

##### 3.1.1 Laboratoires collaborateurs

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

##### 3.1.2 Vérification de l'absence d'entérobactéries dans la matrice utilisée

L'absence d'entérobactéries a été vérifiée sur le lot de lait pasteurisé utilisé avant la contamination artificielle.

### 3.1.3 Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé

La stabilité de la souche, dans la matrice lait pasteurisé, a été évaluée sur 5 jours à  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

La souche utilisée est *Escherichia coli* (souche sauvage provenant de l'industrie laitière).

Deux types d'analyse ont été réalisés.

(a)- Inoculation de 30 cellules dans 10 mL de lait pasteurisé. Les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2, J+3 et J+5 par la méthode de référence et par la méthode alternative.

(b)- Inoculation d'environ  $2,5 \cdot 10^3$  cellules dans 25 mL de lait pasteurisé. Les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2, J+3 et J+5 par dénombrement sur milieu VRBG.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 1.

Jour	Méthode alternative (a)	Méthode de référence (a)(*)	Dénombrement sur VRBG (b)
J0	Présence dans 1 mL	Présence dans 1 mL	$1,1 \cdot 10^2$ CFU/mL
J+1	Présence dans 1 mL	Présence dans 1 mL	$9,3 \cdot 10^1$ CFU/mL
J+2	Présence dans 1 mL	Présence dans 1 mL	$9,9 \cdot 10^1$ CFU/mL
J+3	Présence dans 1 mL	Présence dans 1 mL	$7,9 \cdot 10^1$ CFU/mL
J+5	Présence dans 1 mL	Présence dans 1 mL	$8,1 \cdot 10^1$ CFU/mL

**Tableau 1** : Résultats de l'étude de stabilité effectuée sur la souche *E. coli* dans la matrice lait pasteurisé.

L'ensemble des résultats montre que la souche de *Escherichia coli* utilisée est stable pendant 5 jours à  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$  dans la matrice lait pasteurisé.

### 3.1.4 Préparation et inoculation des échantillons

La matrice est inoculée avec la souche de *E. coli*.

Trois taux ont été testés :

0 cellule dans 10 mL (L0),

30 cellules dans 10 mL (L1),

300 cellules dans 10 mL (L2)

La matrice a été répartie à raison de 10 mL dans des flacons stériles à capuchon étanche. Chaque flacon a été inoculé individuellement et homogénéisé. Huit échantillons par taux et par laboratoire ont été préparés. Chaque laboratoire a reçu 24 échantillons à tester et un échantillon pour quantifier la flore totale de la matrice.

Matrice alimentaire	Flore totale (CFU/ mL)	Taux cibles (cellules/10 mL)	Taux réels (cellules/10 mL)	Intervalle de confiance
Lait pasteurisé	$4 \cdot 10^4$	0	0	-
		30	$31^a$	$[20, 42]^b$
		300	$221^a$	$[191, 250]^b$

a : moyenne de 30 dénombrements, b : selon la loi normale

**Tableau 2** : Résultats de dénombrements des inocula de *Escherichia coli* et de la flore totale dans le lait pasteurisé

### 3.1.5 Etiquetage des échantillons

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

-un code permettant d'identifier le laboratoire : A à N,

-un code permettant d'identifier chaque échantillon, connu uniquement du laboratoire expert.

Les échantillons et les témoins température (échantillon d'eau contenant un thermobouton) ont été stockés à  $4^\circ\text{C}$  avant expédition.

Taux (cellules / 25 mL)	Codes échantillon
0	4/9/11/16/17/18/20/23
3	2/3/7/8/14/19/21/24
30	1/5/6/10/12/13/15/22

**Tableau 3 :** Codes échantillon attribués à chaque niveau de contamination

### 3.1.6 Expédition des échantillons

Les échantillons ont été expédiés dans un kit froid le 10 septembre 2007. Le transport a été confié à CHRONOPOST International.

### 3.1.7 Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs

Les colis sont arrivés en moins de 48 heures chez les laboratoires collaborateurs à l'exception de 2 colis.

La température du pot témoin a été prise dès réception du colis et le thermobouton expédié au laboratoire expert pour la lecture des données. Les échantillons ont été analysés dans la journée (12 septembre 2007). Le laboratoire expert a analysé, en parallèle, une série d'échantillons dans les mêmes conditions avec la méthode alternative et la méthode de référence.

Avec l'accord du Bureau Technique, les analyses ont été réalisées 2 jours après l'envoi des échantillons.

## 3.2 Résultats

### 3.2.1 Température et état des échantillons à réception

Laboratoire	Température (°C)	Etat des échantillons
A	6,1	Bon
B	6,1	Bon
C	6,9	Bon
D	3,8	Bon
E	2,0	Bon
F	8,5	Bon
G	7,9	Bon
H	6,0	Bon
I	7,6	Bon
J	8,0	Bon
K	5,5	Bon
L	6,9	Bon
M	6,1	Bon
N	7,5	Bon

**Tableau 4 :** Température et état des échantillons à réception chez les laboratoires participants

L'analyse des profils thermiques des différents thermoboutons montre, pour l'ensemble des laboratoires, une température moyenne de transport des échantillons comprise entre 2,1°C et 3,6°C.

Laboratoire	Température (°C)	
	Moyenne	Ecart-type
A	nd	nd
B	2,7	1,0
C	nd	nd
D	2,1	0,9
E	2,3	3,2
F	3,2	0,7
G	2,3	2,2
H	nd	nd
I	3,6	1,2
J	3,2	1,0
K	3,5	0,7
L	nd	nd
M	3,1	1,1
N	nd	nd

nd : thermobouton illisible

**Tableau 5** : Données des thermoboutons au cours de l'expédition des échantillons

Les profils thermiques des laboratoires A, C, H, L et N n'ont pas pu être établis. Les thermoboutons ont bien été réceptionnés mais les données n'ont pas pu être récupérées par un défaut de reconnaissance de la puce. Les données de ces laboratoires ont été intégrées dans l'analyse finale des résultats car la température du flacon témoin à réception est inférieure à 8,5°C.

Les laboratoires F et I ont réceptionné les échantillons 3 jours après envoi. Même si la valeur de la température n'a jamais excédé 8,5°C, les données n'ont pas été intégrées car l'analyse des échantillons n'a pas été réalisée le même jour que l'ensemble des laboratoires participants.

### 3.2.2 Dénombrements de la flore totale

Pour l'ensemble des laboratoires, les dénombrements de la flore totale aérobie 30°C varient entre  $2,9.10^2$  et  $1,6.10^6$  CFU/mL.

### 3.2.3 Résultats du laboratoire expert

Les résultats obtenus par le laboratoire expert sont résumés dans le tableau 6.

Niveau de contamination	Méthode alternative	Méthode de référence (*)
L0	1/8	0/8
L1	8/8	7/8
L2	8/8	8/8

**Tableau 6** : Résultats positifs obtenus par le laboratoire expert avec les deux méthodes

Les résultats obtenus montrent qu'un échantillon initialement non contaminé a donné un résultat positif uniquement avec la méthode alternative. Les tests de confirmation indiquent la présence du genre *Enterobacter* dans cet échantillon.

Un échantillon du niveau L1 a donné un résultat négatif uniquement par la méthode de référence. S'agissant d'un échantillon correspondant au plus faible taux de contamination. Il est probable qu'aucune cellule d'*E. coli* ne se trouvait dans la prise d'essai.

### 3.2.4 Résultats des laboratoires collaborateurs

L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 7.

Les données de 4 laboratoires F, G, I et M ont été exclues de l'analyse finale des résultats.

- Les laboratoires F et I n'ont pas reçu les échantillons dans les délais.
- Le laboratoire G a obtenu pour les 16 échantillons artificiellement contaminés un résultat positif au test avec des courbes typiques. Néanmoins la présence d'Entérobactéries n'a pas été confirmée pour 8 échantillons (oxydase +). Les colonies testées ont donné un résultat positif au test de l'oxydase. La température d'incubation utilisée pour le VRBG était de 32°C. La flore totale de l'échantillon témoin est de  $9,4 \cdot 10^5$  CFU/mL. Ce laboratoire n'a pas pu tester d'autres colonies car les géloses ont été détruites avant de pouvoir expliquer le résultat. C'est pourquoi, les données de ce laboratoire n'ont pas été retenues.
- le laboratoire M a obtenu 2 résultats négatifs par la méthode de référence pour des échantillons correspondant au fort taux d'inoculation. L'un d'entre eux a donné un résultat positif par la méthode alternative. La flore totale de l'échantillon témoin est de  $9,8 \cdot 10^5$  CFU/mL. Une retranscription incohérente des résultats et le manque de communication nous ont amené à ne pas prendre en compte les résultats de ce laboratoire.

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	1/8	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	-	-	-
G	-	-	-
H	1/8	8/8	8/8
I	-	-	-
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	6/8	8/8
M	-	-	-
N	0/8	8/8	8/8
Total	2/80 <sup>a</sup>	78/80 <sup>b</sup>	80/80 <sup>c</sup>

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode alternative

b TP<sub>1a</sub> : vrais positifs obtenus au niveau L1 avec la méthode alternative

c TP<sub>2a</sub> : vrais positifs obtenus au niveau L2 avec la méthode alternative

**Tableau 7** : Résultats positifs obtenus par l'ensemble des laboratoires collaborateurs pour la méthode alternative

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	0/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	2/8	8/8	8/8
D	0/8	8/8	8/8
E	0/8	8/8	8/8
F	-	-	-
G	-	-	-
H	0/8	8/8	8/8
I	-	-	-
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	8/8	8/8
M	-	-	-
N	0/8	8/8	8/8
Total	2/80 <sup>a</sup>	80/80 <sup>b</sup>	80/80 <sup>c</sup>

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode de référence

b TP<sub>1r</sub> : vrais positifs obtenus au niveau L1 avec la méthode de référence

c TP<sub>2r</sub> : vrais positifs obtenus au niveau L2 avec la méthode de référence

**Tableau 8 :** Résultats obtenus par l'ensemble des laboratoires collaborateurs pour la méthode de référence

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

	Méthode alternative	Méthode de référence
SP (niveau L0)	98%	98%
SE (niveau L1)	98%	100%
SE (niveau L2)	100%	100%
SE (niveau L1+L2)	99%	100%

SP =  $[1 - (FP/N_-)] \times 100\%$

N<sub>-</sub> : nombre total des essais L0

FP : nombre de faux positifs

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

N<sub>+</sub> : nombre total des essais L1 ou L2

TP : nombre de vrais positifs

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

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 0	PD = 2	2
-	ND = 2 PPND = 0	NA = 76 PPNA = 7	78
Total	2	78	80

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

**Tableau 9 :** Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L0

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 78	PD = 0	78
-	ND = 2 PPND = 0	NA = 0 PPNA = 0	2
Total	80	0	80

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

**Tableau 10 :** Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L1

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 80	PD = 0	80
-	ND = 0 PPND = 0	NA = 0 PPNA = 0	0
Total	80	0	80

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

**Tableau 11 :** Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L2

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 158	PD = 2	160
-	ND = 4 PPND = 0	NA = 76 PPNA = 7	80
Total	162	78	240

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

**Tableau 12 :** Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour la totalité des résultats

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

Catégorie de produit	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	N-	Spécificité relative SP (%)
Niveau L0	0	76	2	2	80	98	2	-	78	97
Niveau L1	78	0	2	0	80	98	80	98	0	-
Niveau L2	80	0	0	0	80	100	80	100	0	-
Total	158	76	4	2	240	98	162	98	78	97

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

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

#### 4-Calcul des intervalles de confiance

	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC(%)	LCL(%)	N+	SE(%)	LCL(%)	N-	SP(%)	LCL(%)
Niveau L0	80	98	96	2	-	-	78	97	96
Niveau L1	80	98	96	80	98	96	0	-	-
Niveau L2	80	100	98	80	100	98	0	-	-
Total	240	98	96	162	98	96	78	97	96

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

## 5- Analyse des résultats discordants

Au total, 6 résultats discordants ont été obtenus.

### Niveau L0

- 2 échantillons initialement non contaminés ont donné un résultat positif uniquement par la méthode de référence. Ces échantillons ont été analysés par le laboratoire C qui a mis en évidence la présence de *Serratia liquefaciens* et *Enterobacter cloacae*.
- 2 échantillons initialement non contaminés ont donné un résultat positif uniquement par la méthode alternative. Les tests d'identification indiquent la présence du genre *Enterobacter* pour un échantillon analysé par le laboratoire A, et la présence d'*Enterobacter sakazakii* pour un échantillon analysé par le laboratoire H.

Pour ces échantillons, les souches isolées appartiennent à une espèce différente de la souche utilisée pour les contaminations artificielles. Les 2 méthodes n'ayant pas d'étape commune, il semblerait que la prise d'essai différente pour chacune des méthodes soit à l'origine de ces discordances observées.

### Niveau L1

Le laboratoire L a obtenu un résultat négatif par la méthode alternative pour 2 échantillons correspondant au faible taux de contamination alors que la méthode de référence a mis en évidence la présence d'Entérobactéries dans ces 2 échantillons. Le test a donné un résultat négatif et les isollements réalisés sur gélose VRBG à partir des cellules de mesure n'ont mis en évidence aucune croissance. Il serait probable qu'aucune cellule d'*E.coli* ne se trouvait dans la prise d'essai.

Selon la norme NF EN ISO 16140, le nombre de discordants [ $Y=ND(4) + PD(2)$ ] est de 6, avec  $m=2$  et  $M=0$ . Etant donné que  $m \geq M$ , les 2 méthodes sont donc comparables.

## 6- Interprétation

### 6-1 Degré d'accord

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

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

Niveau	Méthode alternative	Méthode de référence
L0	96%	96%
L1	96%	100%
L2	100%	100%

**Tableau 13** : Degré d'accord par niveau et par méthode

### 6-2 Concordance

C'est le pourcentage de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité).

La concordance est le pourcentage de toutes les paires donnant les mêmes résultats sur toutes les paires possible de résultats.

Niveau	Méthode alternative	Méthode de référence
L0	95%	95%
L1	95%	100%
L2	100%	100%

**Tableau 14** : Concordance par niveau et par méthode

### 6-3 Odds ratio

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

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

Niveau de contamination	Méthode alternative			Méthode de référence		
	Degré d'accord	Concordance	COR	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	96%	95%	1.26	96%	95%	1.26
L1	96%	95%	1.26	100%	100%	1
L2	100%	100%	1	100%	100%	1

**Tableau 15 :** Calcul de *odds ratio* pour l'ensemble des niveaux de contamination pour les 2 méthodes

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

Lorsque  $COR>1$ , la concordance est plus petite que le degré d'accord. Deux échantillons identiques ont plus de chance de donner le même résultat s'ils sont analysés par le même laboratoire que s'ils sont analysés par des laboratoires différents.

### 6-4 Comparaison des valeurs d'exactitude relative (AC), de spécificité (SP) et de sensibilité (SE)

Le tableau 16 synthétise les valeurs obtenues pour ces paramètres pour l'étude préliminaire et pour l'étude collaborative.

	Etude préliminaire	Etude collaborative
Exactitude relative (AC)	97 %	98 %
Spécificité (SP)	97 %	97 %
Sensibilité (SE)	97 %	98 %

**Tableau 16:** Comparaison des valeurs de AC, SP et SE entre les études préliminaire et collaborative

## 4 Conclusions

Les performances du test BACTRAC 4300 pour la détection des entérobactéries sont comparables à celles de la méthode de référence NF EN ISO 21528-1. Cette étude a porté sur 64 échantillons de produits laitiers.

L'exactitude relative obtenue est de 97 %, la sensibilité relative de 97 % et la spécificité relative est de 97%. Deux résultats discordants ont été obtenus : 1 résultat positif supplémentaire et 1 résultat faux négatif.

Le niveau de détection relatif de la méthode alternative et de la méthode de référence a été évalué pour deux types de produit laitiers. Pour les matrices liquides, celui de la méthode alternative varie de 0,2 à 0,5 CFU par mL alors que celui de la méthode de référence varie de 0,3 à 0,7 CFU par mL.

Pour les matrices solides, la limite de détection de la méthode alternative varie de 0,4 à 1,3 CFU par 10 g alors que celle de la méthode de référence varie de 0,4 à 1,1 CFU par 10 g.

La spécificité test BACTRAC 4300 est satisfaisante.

Dix laboratoires européens ont analysé 240 échantillons.

Les valeurs de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative obtenues suite à l'étude collaborative sont comparables à celles obtenues lors de l'étude préliminaire. La variabilité de la méthode alternative, mise en évidence par les calculs du degré d'accord, de la concordance et des *odds ratio*, est similaire à celle de la méthode de référence.